

На правах рукописи

КАРАЙЧЕНЦЕВ ВИКТОР НИКОЛАЕВИЧ

**ИНФЕКЦИОННЫЙ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,
ВЫЗЫВАЕМЫЙ MORAXELLA BOVIS
(лабораторная диагностика,
специфическая профилактика)**

**16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

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



Москва - 2005

Работа выполнена в Белгородском институте переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса и в Харьковском зооветеринарном институте.

Научный консультант – доктор ветеринарных наук,
профессор Субботин Владимир Викторович

Официальные оппоненты: Доктор ветеринарных наук, профессор
Бурлаков Валентин Александрович

Доктор ветеринарных наук, профессор
Скородумов Дмитрий Иванович

Доктор ветеринарных наук
Тугаринов Олег Алексеевич

Ведущая организация - Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности

Защита состоится «28» декабря 2005 г в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 006 033. 01. по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им ЯР Коваленко (109428, Москва, Рязанский проспект, 24, к 1, ВИЭВ)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИЭВ

Автореферат разослан «_____» _____ 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
профессор

Н.П. Овдиенко

2007-4
8046

24/1809

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

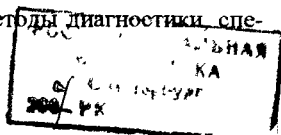
Актуальность темы. Одной из сложных и актуальных проблем в современной ветеринарной медицине является инфекционный кератоконъюнктивит. Высокий уровень заболеваемости крупного рогатого скота ведет к значительному экономическому ущербу, за счет выбраковки животных, уменьшения молочной продуктивности у коров и привесов у телят, ухудшения нагулов животных, что отрицательно влияет на качественное воспроизводство стада и производство продукции.

По мнению многих исследователей, данное заболевание занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии крупного рогатого скота, которое протекает в форме энзоотий или эпизоотий и внесено в список опасных и экономически значимых бактериальных болезней (Русинов А. Ф. 1964- 1989, Cox P.I., Liddel I.S., Mattikson A. O., 1981, Eugster 1984, Rogers D.G., Cheville N.F., Pug G.W., 1987).

Исходя из того, что инфекционный кератоконъюнктивит является новым, слабо изученным заболеванием, его диагностика в нашей стране практически не разработана, поэтому весьма актуальным является конструирование питательных сред на основе отечественных компонентов, разработка методов выделения, условий культивирования и идентификации *Moraxella bovis*, изучение биологических свойств возбудителя и на этой основе разработка технологии изготовления вакцины.

Исследованиями последних лет установлено, что инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота вызывается *Moraxella bovis* (Русинов А.Ф. 1964-1989, Cox P.I., Liddel I.S., Mattikson A. O., 1981, Eugster 1984, Pug G.W., Donald Ir. Mc., 1986, Rogers D.G., Cheville N.F., Pug G.W., 1987).

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что в некоторых странах изучены некоторые вопросы эпизоотологии, разработаны методы изоляции возбудителя из патологического материала, изучены основные биологические свойства *Moraxella bovis*, разработаны методы диагностики спе-



цифической профилактики и мероприятия по диагностике, профилактике и борьбе с данной болезнью (Pug G.W. 1981, Pinkeye, 1982, Cox P I 1984, Novak S , Konradova R , Rejko I. 1985).

В ряде зарубежных стран разработаны и широко используются для специфической профилактики болезни инаktivированные вакцины. О положительном эффекте от применения вакцины сообщают многие исследователи (O Greer, K B Pinkeye, 1985, Gil-Turnes, C., Souza, R., Araujo, F.L , Reyes, I, 1986, Bateman, K G , Leslie, K.E , Scholl, T P , 1986, Mazock, M , 1987).

Установлено, что оздоровление неблагополучных хозяйств от инфекционного кератоконъюнктивита возможно только при осуществлении комплекса организационно-хозяйственных, зоотехнических, ветеринарно-санитарных, зоогигиенических и специфических мероприятий, направленных на повышение резистентности организма крупного рогатого скота, а также на предотвращение заражения животных возбудителем болезни *Moraxella bovis*. Особое место в мероприятиях по борьбе с кератоконъюнктивитом занимает диагностика и специфическая профилактика (Pugh G W , Mc.Donald T I., Hughes D E , 1980, Кopecky K.E , Pugh G.W., Mc Donald T.I., 1981, Gerhardt Rein R , Flittn John W., 1982, Mazock, M 1987, Greene Wallace H , Burns B.M., Howitt C J , Esdale C R , 1988, Das R.G., Patnaik R K , Misra R.P., 1988)

В Российской Федерации, несмотря на широкое распространение инфекционного кератоконъюнктивита, особенно в южных регионах, вопросы микробиологии и иммунологии болезни изучены очень слабо. До сих пор не изучены вопросы этиологии возбудителя, не имеется надежных методов выделения и идентификации моракселл, нет методов диагностики болезни, не изучен иммунитет и не разработаны средства специфической профилактики.

Исходя из вышеизложенного, весьма актуальным является разработка методов выделения, условий культивирования *Moraxella bovis*, изучение биологических свойств и определения их роли в этиологии болезни и на этой основе – разработка методов диагностики, специфической профилактики и ме-

роприятий по диагностике, профилактике и борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*

Цель и задачи исследований. На основе изучения биологии и экологии *Moraxella bovis* разработать методы лабораторной диагностики, специфической профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и внедрить их в ветеринарную практику.

В соответствии с обозначенной целью, на разрешение были поставлены следующие задачи:

- разработать метод выделения, культивирования и идентификации культур *Moraxella bovis* от крупного рогатого скота, больного инфекционным кератоконъюнктивитом, выделить эпизоотические культуры *Moraxella bovis* и изучить их биологические свойства, изучить вирулентность выделенных культур для телят с целью доказательства их роли в этой патологии;
- на основании этих данных разработать методические рекомендации по выделению и культивированию *Moraxella bovis*, предложить и апробировать схему лабораторной диагностики болезни,
- из выделенных и изученных эпизоотических культур отобрать штамм *Moraxella bovis* с типичными свойствами и адгезивным антигеном, отработать регламент изготовления инактивированной вакцины, изготовить опытные образцы вакцины и испытать их иммуногенность на восприимчивых животных;
- разработать технологию изготовления вакцины и изучить ее иммунологическую и эпизоотологическую эффективность в неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота регионах;
- разработать рекомендации по диагностике и мероприятия по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемым *Moraxella bovis*.
- разработать рекомендации о мероприятиях по борьбе и профилактике с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемым *Moraxella bovis*.

Научная новизна Впервые в России разработаны питательные среды на основе отечественных компонентов, на которых с большой частотой удается выделять из патологического материала культуры *Moraxella bovis* и использовать их при изучении биологических свойств и получения бактериальной массы для изготовления вакцины.

От крупного рогатого скота разного возраста, больного инфекционным кератоконъюнктивитом, выделено 659 культур, которые по совокупности культурально-морфологических и биохимических свойств соответствовали виду *Moraxella bovis*. Отработаны методы культивирования и длительного хранения в лабораторных условиях культур *Moraxella bovis*. Выделенными культурами, идентифицированными как *Moraxella bovis*, воспроизведено заболевание глаз у телят, полностью соответствующее по клиническим признакам заболеванию в естественных условиях. От экспериментально зараженных телят выделены культуры, соответствующие по свойствам штамму, используемому для заражения. На основании этих данных представляется возможным считать доказанным, что выделенный от больных животных микроорганизм, идентифицированный нами как вид *Moraxella bovis*, является возбудителем наблюдаемого нами кератоконъюнктивита у крупного рогатого скота, так как он обнаруживается при микроскопии в экссудате, на конъюнктиве и роговице больных глаз, выделяется в чистой культуре на разработанных нами средах, и эти культуры вызывают кератоконъюнктивит у телят при введении их в конъюнктивальный мешок. Научно обоснована, апробирована и предложена схема лабораторной диагностики инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, в которой отражены методика отбора материала для исследования и схема бактериологического исследования.

Дано экспериментальное обоснование экспресс-идентификации *Moraxella bovis* по тестам восстановления нитратов в жидкой и на плотной питательных средах и на этой основе разработаны методические рекомендации по новому способу определения восстановления нитратов у микроорганизмов.

Экспериментально обоснована технология изготовления инактивированной формолгидроокисьалюминиевой вакцины против инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита крупного рогатого скота из селекционированного штамма *Moraxella bovis* с фенотипом продукции основных факторов вирулентности, изучена и доказана её иммунологическая и эпизоотологическая эффективность

Материалы, изложенные в научных статьях, методических рекомендациях используются в учебном процессе в Белгородском институте переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса и в Харьковской зооветеринарной академии

Научная новизна исследований подтверждена патентом на изобретение «Средство для профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и способ профилактики этого заболевания» № 2240820, от 27 ноября 2004г, с приоритетом изобретения от 10 июля 2000г

Практическая значимость На основании полученных данных впервые в стране разработаны и внедрены в ветеринарную практику

Методические рекомендации по диагностике и мероприятия по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis* Утверждены Управлением ветеринарии Минсельхоза РФ 25 08 2005г, №5-2 – 1220 – 05

Методические рекомендации по выделению и культивированию *Moraxella bovis* от крупного рогатого скота, больного инфекционным кератоконъюнктивитом Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30 06 2005г

Методические рекомендации по лабораторной диагностике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*. Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30 06. 2005г

Методические рекомендации по ускоренному микрообъемному способу определения восстановления нитратов у *Moraxella bovis* Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30 06 2005г

Методические рекомендации по определению восстановления нитратов у *Moraxella bovis* на плотной питательной среде Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30 06 2005г

Методические рекомендации о мероприятиях по борьбе и профилактике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis* Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30 06 2005г

Результаты проведенных исследований использованы при разработке и составлении нормативно-технической документации

Временная инструкция по изготовлению и контролю формолвакцины гидроокисьалюминиевой против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота – одобрена Ученым Советом Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса 21/02 – 20001г

Технические условия на формолвакцину гидроокисьалюминиевую против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота – одобрены Ученым Советом Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса 21/02 – 20001г

Наставление по применению формолвакцины гидроокисьалюминиевой против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота одобрено Ученым Советом Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса 21/02 – 2001 г

Апробация работы Основные материалы диссертации доложены на заседаниях и отчетных сессиях Ученого Совета Харьковского зооветеринарного института им Н М Борисенко (г Харьков, 1991-2003 гг); на заседаниях Ученого Совета Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса (г Белгород, 2001-2004 гг), на научной конферен-

ции: «Приоритеты современного экономического развития» (Краснодар, НИИ проблем экономической истории России XX века, 2001г.), на XIV Международной научно-практической конференции: «Новые фармакологические средства в ветеринарии» (г. Санкт-Петербург, 2002г.); на VI международной научно-производственной конференции (г. Белгород, БГСХА, 2002г.); на международной научно-практической конференции: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии (г. Ульяновск, УГСХА, 2003г.); на международной научной конференции: «Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных», посвященной 90-летию профессора В.Р. Филипова (г. Улан-Удэ, БГСХА, 2003г.); на VII –й международной научно- производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения» (г. Белгород, БГСХА, 2003г.); на XV Международной научно-практической конференции: «Новые фармакологические средства в ветеринарии», посвященной 300-летию Санкт-Петербурга (г. Санкт-Петербург, 2003г.); на XVI Международной межвузовской научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии» (г. Санкт-Петербург, 2004г.); на Международной научно-производственной конференции «Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе», посвященной 85-летию со дня рождения академика РАСХН В.П. Урбана (г. Санкт-Петербург, 2004г.); на VIII Международной научно-производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения» (Белгород, 2004г.).

Публикации Основные материалы диссертации изложены в 39 печатных работах.

Основные положения, выносимые на защиту

- схема выделения, методика культивирования и идентификация культур *Moraxella bovis*, выделенных от крупного рогатого скота, больного кератоконъюнктивитом;

- экспериментальное обоснование этиологической роли *Moraxella bovis* в возникновении кератоконъюнктивита крупного рогатого скота;

- схема лабораторной диагностики инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита крупного рогатого скота;

- экспресс-метод идентификации *Moraxella bovis* по восстановлению нитратов в жидкой и на плотной питательной среде;

- обоснование технологии изготовления, способов контроля и схемы применения формолвакцины гидроокисьалюминиевой против инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, изготовленной из штамма *Moraxella bovis* с фенотипом основных факторов вирулентности;

- результаты изучения иммунологической и эпизоотологической эффективности формолвакцины гидроокисьалюминиевой против инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита крупного рогатого скота

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 239 страницах и состоит из разделов: общая характеристика работы, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы и практические предложения. Список литературы включает 107 источников, в том числе 103 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 24 таблицами.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 1988 - 2003 гг. в Белгородском институте переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса, в Харьковском зооветеринарном институте, в Белгородской производственной ветеринарной лаборатории и в животноводческих хозяйствах Белгородской, Московской, Тамбовской и др. областей.

Работу по изоляции *Moraxella bovis* от крупного рогатого скота, больного инфекционным кератоконъюнктивитом, проводили в Харьковском зооветеринарном институте и в Белгородском институте переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса.

С 1988 по 2003 год в неблагополучных хозяйствах Белгородской, Московской, Тамбовской и др. областей проведен клинический осмотр 9803 голов крупного рогатого скота, в том числе 2151 корова, 2339 телок, 1837 телят живой массой 190-230 кг. и 3476 телят живой массой 90-130 кг

В лабораторных опытах исследовано 3823 пробы патологического материала, использовано 140 белых мышей и 13157 голов крупного рогатого скота, в производственных опытах – 88961 голова крупного рогатого скота

На основе отечественных компонентов разработали питательные среды позволяющие выделять из патологического материала культуры *Moraxella bovis* В лабораторных условиях изучили методы выделения и культивирования культур *Moraxella bovis* Опыты по выращиванию моракселл проводили при pH от 5,0 до 8,0 и температуре от +30°C до 37°C Выделение и культивирование *Moraxella bovis* из патологического материала, отобранного от крупного рогатого скота, больного инфекционным кератоконъюнктивитом проводили на кровяном агаре и сывороточном бульоне Хоттингера с 10% дрожжевого экстракта

У выделенных культур *Moraxella bovis* культурально - морфологические, тинкториальные, биохимические, серологические и патогенные свойства изучали общепринятыми методами Разработали методы длительного хранения в лабораторных условиях культур *Moraxella bovis*.

Выделенные культуры моракселл хранили в камере бытового холодильника (+4°C - 6°C) Вакцинный штамм *Moraxella bovis* 891К хранили в лиофилизированном состоянии

Окраску моракселл проводили по Граму, основным фуксином Циля, генцианвиолетом, бриллиантовым зеленым

Сроки хранения моракселл на кровяном агаре Хоттингера, в бульоне Хоттингера определяли при температуре от +4°C до +37°C, путем высевов на твердые и жидкие среды и микроскопией мазков

Восстановление нитратов у *Moraxella bovis* определяли общепринятым, ускоренным микрообъемным методом и на агаре Хоттингера

Опыт по воспроизведению инфекционного кератоконъюнктивита проводили на 70 телятах 2-3 месячного возраста.

Для изготовления вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита использовали штамм *Moraxella bovis* 891K, обладающий типичными культурально-морфологическими свойствами и стабильно сохраняющий фенотип факторов вирулентности (фимбрии, бета-гемолиз)

Бульон и агар Хоттингера готовили в соответствии с общепринятыми методиками. Исходными компонентами для приготовления питательных сред бульона и агара Хоттингера служили соли фосфатов (KH_2PO_4 , NaHPO_4), поваренная соль, пептон, дрожжевой экстракт, сыворотка крови крупного рогатого скота, высококачественный агар.

Бактериальную массу штамма *Moraxella bovis* 891K получали путем культивирования бактерий в сывороточно-дрожжевом бульоне Хоттингера с контролем основных показателей условий культивирования (pH, Po_2 , EH)

Уровень накопления бактериальной массы *Moraxella bovis* при культивировании на питательной среде оценивали по оптическому стандарту мутности. Биомассу *Moraxella bovis* для изготовления вакцины получали в стеклянных баллонах, заполненные на 1/3 емкости сывороточно-дрожжевым бульоном Хоттингера при культивировании в течение 15-17 часов, при температуре +37°C

Патогенные, токсикогенные свойства штаммов *Moraxella bovis*, а также безвредность образцов вакцины изучали на белых мышах массой 14-18г

Оптимальные иммунизирующие дозы вакцины определяли в опытах на 48 коровах, 56 телках, 85 телятах (масса 190-230кг) и 60 телятах (масса 90-130 кг)

Иммуногенность образцов вакцины изучали на крупном рогатом скоте, а также по титрам антител сыворотки крови животных в реакции непрямой гемагглютинации

Иммунологическую эффективность изготовленной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита изучали в опытах на 3792 головах крупного рогатого скота, а эпизоотологическую эффективность на 88961 голове крупного рогатого скота разного возраста

При разработке нормативных документов по профилактике и ликвидации инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота (наставления, ТУ, инструкция) использовали полученные нами данные

Расчет экономической эффективности осуществляли согласно "Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий", 1997г

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами (Р.Х Кармолиев, 1971; МГ Тарпис и В М Константинов, 1975)

2.2. Результаты исследований

2. 2. 1. Изучение этиологии кератоконъюнктивита

Впервые мы наблюдали массовое заболевание с поражением глаз у телят в возрасте от 2 до 6 месяцев в комплексе по выращиванию и откорму колхоза имени Жданова Белгородского района, Белгородской области в 1988г. Была изучена заболеваемость телят кератоконъюнктивитом по месяцам в течение года. Установили, что заболеваемость в январе составила 7%, в феврале - 9%, в марте - 8%, в апреле - 12%, в мае - 15%, в июне - 47%, в июле - 56%, августе - 69%, в сентябре - 44%, в октябре - 33%, в ноябре - 11% и в декабре - 4%. Таким образом, наивысшая заболеваемость телят, регистрировалась в июне, июле, августе и сентябре.

На протяжении 15 лет проводили бактериологические исследования патологического материала, взятого от больных кератоконъюнктивитом коров, телок и телят. Исследованию подверглись 2151 корова, 2339 телок, 1837 телят (масса 190-230 кг) и 3476 телят (масса 90-130кг), которые находились в самых различных условиях содержания. Исследовали 3823 отобранных проб патологического материала.

От больных и переболевших инфекционным кератоконъюнктивитом животных, из конъюнктивальных мешков, с поверхности глазного яблока, из пространства за третьим веком выделяли *Moraxella bovis*, а также различные стрептококки, стафилококки, микрококки, кипечную палочку, протей и другие микроорганизмы.

Заболеванию коров, телок и телят инфекционным кератоконъюнктивитом способствуют неблагоприятные факторы (плохие климатические условия, антисанитарное состояние в загонах, неполноценное кормление, скученность животных, неудовлетворительный микроклимат помещений, различные насекомые и др.), которые ослабляют общую резистентность, а также резистентность конъюнктивы век и глазного яблока.

2.2.2. Разработка питательных сред для изоляции и культивирования *Moraxella bovis*

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.

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.

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, дефибрированная 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 район 7,4-7,6 и стерилизовали. После автоклавирования pH 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 дефибрированной крови барана и 10% дрожжевого экстракта.

2.2.3. Выделение из патологического материала культур *Moraxella bovis* на твердой питательной среде и изучение их биохимических свойств

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 высеив на питательные среды.

За период с 1988 по 2003 гг. бактериологическому исследованию было подвергнуто 3823 пробы патологического материала от больных кератоконъюнктивитом коров, телок и телят и выделено 659 культур *Moraxella bovis*. При исследовании этого же патологического материала посевом на мясопептонный агар и питательный агар из гидролизата кильки культуры *Moraxella bovis* не были выделены. Эти данные свидетельствуют о том, что

Moraxella bovis для своего роста нуждается в ростовых факторах, содержащихся в крови животных

Частота выделения *Moraxella bovis* от животных разных возрастных групп представлена в табл 1

Таблица 1

Частота выделения культур *Moraxella bovis* из серозно-гнойного экссудата глаз крупного рогатого скота разного возраста

Крупный рогатый скот	Исследуемый материал	Исследовано проб	Выделено культур <i>Moraxella bovis</i>	
			Кол-во	%
Коровы	Серозно-гнойное истечение из глаз	841	142	16,91
Тёлки		917	136	14,87
Телята (190-230кг.)		689	119	17,36
Телята (90-130кг.)		1376	262	19,04
Всего крупного рогатого скота		3823	659	17,23

Из 841 пробы серозно-гнойного истечения из глаз коров было выделено 142 культуры *Moraxella bovis*, частота выделения - 16,91%, при исследовании 917 проб аналогичного материала от телок было выделено 136 культур *Moraxella bovis* (14,87%) Из 689 проб серозно-гнойного истечения глаз телят массой 190-230 кг было выделено 119 культур *Moraxella bovis* (17,36%), при исследовании 1376 пробы патологического материала от телят массой 90-130 кг было выделено 262 культуры *Moraxella bovis* (19,04%) В итоге из 3823 проб экссудата из пораженных глаз крупного рогатого скота разного возраста выделено 659 культур *Moraxella bovis* Частота выделения составила более 17% Приведенные данные свидетельствуют о том, что при бактериологическом исследовании истечений из глаз, отбираемых на разных стадиях развития болезни и от разных возрастных групп, частота выделения *Moraxella bovis* в предложенной нами питательной среде составляет от 14,87% до 19,11% от числа исследованных животных В целом, независимо от возраста животного, *Moraxella bovis* из серозно-гнойного истечения глаз выделяется в 17,23% случаях Поэтому для установления первичного диагноза в хозяйстве необходимо исследовать не менее 15-20 проб

У выделенных культур изучили морфологические, культуральные и некоторые биохимические свойства, а у части – вирулентность для белых мышей и телят 2-3-х месячного возраста. В мазках, приготовленных из экссудата пораженных глаз, мы обнаруживали грамотрицательные короткие, с закругленными концами палочки, располагающиеся на фоне кокковой микрофлоры одиночно, парами или короткими цепочками по 3-5 клеток. С такой морфологией бактерии обнаруживали во всех пробах материала. На кровяном агаре в 17,2% случаях обнаруживали рост характерных для *Moraxella bovis* колоний. Колонии круглые, плоские, мелкие, рыхлые, вдавленные в среду, серо-белого цвета, окруженные узкой зоной полного гемолиза (бета-гемолиза). Диаметр колоний 1-3 мм, ширина зоны бета-гемолиза 0,5-1,0 мм (некоторые штаммы не давали гемолиза).

Культуры из колоний не давали роста при отливке на мясопептонный агар и мясопептонный бульон, но росли в сыворотно-дрожжевом бульоне Хоттингера и кровяном агаре с дрожжевым экстрактом.

В бульоне при культивировании при температуре +37°C – 38°C в аэробных условиях к 24 часам выделенные и отлитые с агара культуры вызывали интенсивное помутнение, а на дне пробирки образовывался серо-белого цвета крошковатый осадок, разбивающийся при встряхивании пробирки в мелко-крупнитчатую суспензию. Через 3-4 часа осадок образовывался вновь. На кровяном агаре Хоттингера с дрожжевым экстрактом при дробном высеве вырастали кроме плоских гемолитических колоний, выпуклые, без гемолиза колонии, что указывает на неоднородность первичной культуры и наличие в популяции бактериальных клеток R и S - типа. Клетки S-типа в отличие от R-типа не синтезировали бета-гемолизин. По данным литературы (Lawrence H. Arg, 1988, Quinn P. I et al., 1998 и др.) для патогенных культур вида *Moraxella bovis*, имеющих фенотип продукции бета-гемолизина, адгезинов (пили-антигена), экзо- и эндотоксинов, как основных факторов вирулентности, наиболее характерными свойствами являются своеобразный рост в лакмусовом молоке, неспособность восстанавливать нитраты и др. свойства. При

исследовании 659 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 граммотрицательными, не кислотоустойчивыми, полиморфными, аэробными, неподвижными, короткими и толстыми с закругленными концами бактериями, с характерным парным сочленением; некоторые штаммы приближены к кокковидной форме, они не имеют спор и капсулы 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 аэробно-анаэробного роста они вызывали защелачивание молока, а в условиях анаэробно-анаэробного роста – 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 светло-синий, а нижний слой – в белый с крупинками пептонизированного молока (табл 2).

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* (Берги, 1984, Сидоров М. А., Скородумов Д. И., Федотов В.Б., 1996, Bart T., Taurek K., Nacke R-M., Gott Wald G.,

1988, Erdeger J., Aydin N., Erturk A., 1995, Arora A K., 1989, Kodjo A., Exbrayat P., Richard Y., 1994, Prieto C.I., Aguilar O. M., Yantorno O. M., 1999)

Таблица 2

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	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Катазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Следовательно, из экссудата пораженных глаз животных почти в 20% случаев выделяются чистые культуры *Moraxella bovis*, имеющие фенотипические признаки факторов вирулентности – гемолитические, адгезивные и токсические свойства.

2.2.4. Экспериментальное воспроизведение инфекционного кератоконъюнктивита на телятах культурами *Moraxella bovis*

С этой целью были сформированы десять групп телят по 7 голов, 2-3-месячного возраста, которые находились в одном помещении. Пять групп телят были опытными и пять групп - контрольными. На основании исследований установили, что все животные в группах были здоровыми. Для заражения телят в опытных группах были взяты, выделенные нами, вирулентные для белых мышей гемолитические культуры *Moraxella bovis*, которые хранились в лабораторных условиях. Тридцати пяти телятам в опытных группах вводили по 0,5 мл суспензии культуры *Moraxella bovis* (9-10 млрд. микробных

клеток в 1 см³) в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза. Контрольную группу из 35 телят культурами *Moraxella bovis* не заражали. После заражения за опытными и контрольными телятами в группах вели тщательное наблюдение на предмет заболевания.

Клинические признаки заболевания инфицированных глаз кератоконъюнктивитом в опытных группах телят проявились в каждой из пяти групп: у 5 из 7 телят на 7-19 день и у одного – на 22 день после заражения. Было установлено, что основным признаком заболевания является слезотечение. Затем развивались светобоязнь, гиперемия сосудов конъюнктивы, блефароспазм, серозно-гнойное истечение из глаз, а также наблюдали помутнение и изъязвление роговицы. У искусственно инфицированных телят заболевание сопровождалось уменьшением аппетита и угнетенным состоянием. Инкубационный период продолжался от 3-7 до 19-22 дней. Температура тела повышалась до 39,8°C – 41,5°C.

Таким образом, при заражении глаз у телят были получены клинические симптомы инфекционного кератоконъюнктивита, которые аналогичны симптомам, наблюдаемым в естественных условиях.

Затем от телят в опытных и контрольных группах стерильными ватными тампонами проводили отбор серозно-гнойного истечения из глаз и экссудата, из которого проводили посев на кровяной агар Хоттингера с 10% дрожжевым экстрактом.

В опытных (пять групп) группах телят с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита выделяли культуры *Moraxella bovis* из всех инфицированных глаз телят. Изолированные культуры *Moraxella bovis* идентифицировали по культурально-биохимическим свойствам. Таким образом, все 25 выделенных культур *Moraxella bovis* от телят были идентичны первоначальным культурам *Moraxella bovis*. В контрольных группах телят культуру *Moraxella bovis* не изолировали (табл. 3).

**Экспериментальное воспроизведение кератоконъюнктивита
на молодняке крупного рогатого скота**

Номер группы	Количество животных в группе	Результаты заражения			
		заболело		не заболело	
		кол-во	%	кол-во	%
1 (опыт)	7	5	71,42	2	28,58
2(конт.)	7	-	-	-	-
3(опыт)	7	5	71,42	2	28,58
4(конт.)	7	-	-	-	-
5(опыт)	7	5	71,42	2	28,58
6(конт.)	7	-	-	-	-
7(опыт)	7	5	71,42	2	28,58
8(конт.)	7	-	-	-	-
9(опыт)	7	5	71,42	2	28,58
10(конт.)	7	-	-	-	-

На основании проведенных исследований был экспериментально воспроизведен инфекционный кератоконъюнктивит на телятах вирулентными, гемолитическими культурами *Moraxella bovis*. Необходимо отметить, что клинические признаки у искусственно инфицированных телят были одинаковыми с клиническими признаками у естественно больных телят.

Таким образом, данные, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что в опытных группах из 35 инфицированных телят заболели инфекционным кератоконъюнктивитом 25 телят (71,42%). От всех инфицированных телят была изолирована культура *Moraxella bovis*.

Выделенные из пораженных глаз телят гемолитические культуры *Moraxella bovis* обладали патогенностью для белых мышей при подкожном заражении и вызывали их гибель (81,81%) через 24-72 часа.

2.2.5. Разработка способа получения вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита и характеристика производственного штамма *Moraxella bovis* 891K

Для изготовления вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита с использованием факторов вирулентности возбудителя был выделен от молодняка крупного рогатого скота, больного вышеуказанной болезнью, штамм *Moraxella bovis* 891K, который на протяжении 8-10 лет стабильно сохранял свои свойства

Штамм *Moraxella bovis* 891K получили путем пассажей на кровяном агаре Хоттингера с постоянной селекцией культур после каждого пересева по R форме колоний и по способности вызывать гемолиз на кровяном агаре. Поддержание штамма в R форме достигается хранением при $T + 2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ в лиофилизированном состоянии. Вакцинный штамм *Moraxella bovis* 891K обладает достаточной энергией роста (лаг фаза не превышает двух часов) и характеризуется следующими свойствами. Штамм *Moraxella bovis* 891K представляет собой грамотрицательные, не кислотоустойчивые, аэробные, неподвижные, короткие и толстые с закругленными концами палочки длиной 1,5-2,5 и шириной 1,0 - 1,5 мкм, с характерным парным сочленением, приближены к кокковидной форме, которые не имеют спор и капсулы, расположены одиночно, в парах или короткими цепочками.

На кровяном агаре Хоттингера с 10% дрожжевого экстракта, pH от 7,2 до 7,6 при инкубировании в течение 24 часов образует колонии диаметром 1-3 мм с шириной зоны бета-гемолиза 0,5-1,0 мм. Колонии имеют круглую форму, плоские, мелкие, рыхлые, вдавленные в среду серо-белого цвета. В бульоне Хоттингера штамм *Moraxella bovis* 891K после инкубирования в течение 48-72 часов при температуре 37°C наблюдается незначительное помутнение среды, но образуется осадок, который при встряхивании разрушается в мелко – крупнитчатую суспензию. Штамм 891K не утилизирует ацетат, не восстанавливает нитраты в нитриты, не образует индол, не ферментирует сахара и очень чувствителен к пенициллину, обладает каталазной активностью, раз-

жижает желатину, пептонизирует, свертывает лакмусовое молоко, и являются факультативным аэробом. В лакмусовом молоке через 24 часа инкубирования в верхней части столбика среды образуется темно-синяя полоса шириной 0,5-1 см, а через шесть дней инкубации формируются три отчетливые зоны: верхняя зона – жидкость темно-синяя, средняя зона – светло-синего цвета и нижний слой – коагулированный казеин – белого цвета. Штамм проявляет вирулентные свойства для белых мышей и для 1-3 месячных телят.

Разработали питательные среды для культивирования производственно-го штамма *Moraxella bovis* 891K на основе отечественных компонентов. Приготовление бульона и агара Хоттингера проводили согласно п. 2.2.2.

Штамм *Moraxella bovis* 891K хранили в лиофилизированном состоянии. Для получения посевного материала ампулу вскрывали и добавляли бульон Хоттингера, затем засекали чашки с кровяным агаром Хоттингера и 10% дрожжевым экстрактом, инкубировали в термостате при температуре +37°C в течение 24-48 часов. После микроскопии чистые культуры с кровяного агара Хоттингера смывали физиологическим раствором, суспензию объединяли в отдельный флакон и устанавливали концентрацию микробных клеток 1 млрд/мл.

Таблица 4

Получение бактериальной массы при разных условиях культивирования штамма *Moraxella bovis* 891K в бульоне Хоттингера

Показатели	Культивирование штамма <i>Moraxella bovis</i> 891K		
	штутель - аппарате	периодическое перемешивание	стационарное положение
Питательная среда	бульон Хоттингера (с добавками)		
Время инкубирования в стационарном положении (час)	2 - 3	2 - 3	–
Время инкубирования (час)	13 - 14	13 - 14	15 - 17
Концентрация <i>Moraxella bovis</i> в бульоне Хоттингера в млрд/мл	17 - 19	16 - 18	15 - 17

Для получения бактериальной массы проводили культивирование штамма *Moraxella bovis* 891K в бульоне Хоттингера (табл. 4). В приготовленную

питательную среду (п 2 2 2.) с соблюдением стерильности добавляли 5% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота, неспецифической, не консервированной, 10% стерильного дрожжевого экстракта, и 6 - 8 % суспензии бактерий штамма *Moraxella bovis* 891K. Биомассу *Moraxella bovis* для изготовления вакцины получали в стеклянных баллонах, заполненных на 1/3 емкости сывороточно-дрожжевым бульоном Хоттингера при культивировании в стационарных условиях в течение 2-3 часов, и в дальнейшем 13-14 часов при периодическом перемешивании (температура +37°C -38°C). Через 5-6 часов культивирования производственного штамма *Moraxella bovis* 891K в бульоне Хоттингера концентрация бактерий достигла 4-5 млрд/мл, штамм был чистым, без посторонних микроорганизмов.

Через 13-14 часов инкубирования штамм *Moraxella bovis* 891K был чистым, без посторонних микроорганизмов, концентрация бактерий в бульоне Хоттингера достигла 16-18 млрд/мл. Затем проводили инактивацию биомассы формалином, доводили её pH штамма до 7,0-7,2 и отделяли от среды путем центрифугирования. Перевод активных эндотоксинов в анатоксины проводили с использованием формалина и тепла.

Таким образом, разработали простые и технологичные способы получения бактериальной массы и её инактивации, которые были взяты за основу при разработке лабораторного регламента изготовления вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита.

2.2.6. Определение иммунизирующей дозы вакцины

В опытах, проведенных на 96 телятах, установили, что ИМД₅₀ штамма *Moraxella bovis* 891K насчитывалась 30,8 млрд микробных клеток бактерий (3,08мл вакцины).

Установили, что концентрация микробных клеток *Moraxella bovis* 891K 30,8 млрд в 3,08мл вакцины защищает 50% вакцинированных телят от заражения вирулентной культурой *Moraxella bovis*. Увеличение прививочной дозы до 6-7 мл (60-70млрд микробных клеток *Moraxella bovis*) повышал уровень защиты телят до 80-100%.

Провели подбор адьюванта и установили, что реактогенные свойства менее выражены у образцов вакцин, где в качестве адьюванта использовали 4%-ный раствор гидроксида алюминия. Установили, что внесенный в данный препарат 4%-ный раствор гидроксида алюминия полностью (99,9-100%) сорбировал клетки *Moraxella bovis* при pH среды 7,0–7,5.

Таким образом разработали технологический регламент по изготовлению вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита с использованием факторов вирулентности. Бактериальную массу получали согласно п. 2.2.6.

Затем к бактериальной массе в качестве адьюванта добавили 30% стерильного 4%-го раствора гидроксида алюминия. Вакцина была стерильной, безвредной и иммуногенной.

2.2.7. Изучение иммуногенных свойств инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины

Определили оптимальные иммунизирующие дозы вакцины и схемы вакцинации для коров, телок, телят (масса 190-230 кг), телят (масса 90-130 кг) и изучили её профилактическую эффективность при инфекционном кератоконъюнктивите в опыте прямого заражения животных.

Установили, что оптимальная прививочная доза вакцины для крупного рогатого скота с массой тела до 180 кг (телята, масса 90-130 кг) при подкожном введении в области средней трети шеи составляет: первая инъекция – 3 мл, вторая – через 21 день после первой вакцинации в той же дозе – 3 мл. Для крупного рогатого скота с живым весом свыше 180 кг (коровы, телки, телята, живой вес – 190-230 кг) оптимальная прививочная доза вакцины составила первый раз в дозе 3 мл, второй раз – через 21 день после первой вакцинации в дозе 4 мл (табл. 5).

Двукратная иммунизация коров и телят образцами экспериментальной вакцины индуцировала выработку специфических антител через 30 дней после иммунизации в титрах – $6 - 7 \log$ и $5 - 6 \log$ соответственно.

Изучили эпизоотическую эффективность вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита с использованием факторов вирулентности возбудителя в колхозах имени Ленина и «Знамя Труда» Белгородской области, неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту. Учет результатов проводили спустя девять месяцев после вакцинации коров, телок и телят.

Таблица 5

Результаты опыта по определению оптимальных иммунизирующих доз вакцины для животных разного возраста

Количество животных в группах	Доза вакцины (мл)	Доза культуры при заражении (млрд.мл)	Количество заболевших животных	% заболевших животных	Кол - во незаболевших животных	% незаболевших животных
12 коров (опыт)	3 + 4	22-24	1	8,33	11	91,67
12 коров (контроль)	-	22-24	8	66,66	4	33,34
14 телок (опыт)	3 + 4	22-24	1	7,14	13	92,85
14 телок (контроль)	-	22-24	9	64,28	5	35,72
17 телят (190-230кг)	3 + 4	22-24	3	17,64	14	82,36
17 телят (контроль) (190-230кг)	-	22-24	11	64,71	6	35,29
15 телят (опыт) (90-130кг)	3 + 3	9-10	2	13,33	13	86,67
15 телят контроль (90-130кг)	-	9-10	11	73,33	4	26,67

Через девять месяцев после вакцинации в условиях колхоза имени Ленина в опытной группе из 432 коров, 276 телок и 191 теленка заболели с диагнозом инфекционный кератоконъюнктивит 49 коров (11,34%), 34 телки (12,32%), 26 телят (13,61%), не заболели - 383 коровы (88,66%), 242 телки (87,68%) и 165 телят (86,39%).

В контрольной группе заболели инфекционным кератоконъюнктивитом 309 коров (71,53%), 215 телок (77,89%) и 169 телят (88,48%), не заболели - 123 коровы (28,47%), 61 телка (22,10%) и 22 теленка (11,52%) (табл. 6) Уровень антител в сыворотке крови иммунизированных животных через 30-40 дней после введения вакцины составил от 6 до 7 log и от 5 до 6 log

Таблица 6

Эпизоотологическая эффективность вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита в колхозе имени Ленина Белгородской области

Кол-во животных в группах	Доза вакцины (мл)	Кол - во заболевших животных	% заболевших животных	Кол - во незаболевших животных	% незаболевших животных
432 коровы (опыт)	3 + 4	49	11,34	383	88,66
432 коровы (контроль)	не вакцинированы	309	71,53	123	28,47
276 телок (опыт)	3 + 4	34	12,32	242	87,68
276 телок (контроль)	не вакцинированы	215	77,89	61	22,10
191 теленок (опыт)	3 + 3	26	13,61	165	86,39
191 теленок (контроль)	не вакцинированы	169	88,48	22	11,52

В колхозе «Знамя Труда» в опытной группе из 218 коров, 174 телки и 123 теленка заболели с диагнозом инфекционный кератоконъюнктивит 28 коров (12,84%), 16 телок (9,19%), 14 телят (11,38%), не заболели - 190 коров (87,16%), 158 телок (90,81%) и 109 телят (88,62%)

В контрольной группе заболели инфекционным кератоконъюнктивитом 147 коров (67,43%), 129 телок (74,14%) и 102 телят (82,92%), не заболели - 71 корова (32,57%), 45 телок (25,88%) и 21 теленок (17,08%) (табл. 7) Уровень

антител в сыворотке крови иммунизированных животных через 30 - 40 дней после введения вакцины составил от 6 до 7 log

Таблица 7

Эпизоотологическая эффективность вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита в колхозе «Знамя Труда» Белгородской области

Кол-во животных в группах	Доза вакцины (мл)	Кол-во заболевших животных	% заболевших животных	Кол-во незаболевших животных	% незаболевших животных
218 коров (опыт)	3 + 4	28	12,84	190	87,16
218 коров (контроль)	не вакцини- роваы	147	67,43	71	32,57
174 телки (опыт)	3 + 4	16	9,19	158	90,81
174 телки (контроль)	не вакцини- роваы	129	74,14	45	25,88
123 теленка (опыт)	3 + 3	14	11,38	109	88,62
123 теленка (контроль)	не вакцини- роваы	102	82,92	21	17,08

2.2.8. Изучение динамики формирования и продолжительности иммунитета против инфекционного кератоконъюнктивита

Определили сроки появления у иммунизированных коров, телок и телят максимально выраженного специфического иммунитета и продолжительность его сохранения.

Время формирования и продолжительность иммунитета, создаваемого опытными образцами вакцины, определяли в опыте прямого заражения коров, телок, телят (масса 190-230кг) и телят (масса 90-130кг) вирулентной, гемолитической культурой *Moraxella bovis* (табл 8)

Таблица 8

Иммунологическая эффективность вакцины для различных возрастных групп крупного рогатого скота через девять месяцев после вакцинации

Кол-во животных в группах	Доза вакцины мл	Доза для заражения млрд. мл	Кол-во заболевших животных	% заболеваемости	Кол-во не заболевших животных	% не заболевших
23 опыт (коровы)	3 + 4	22-24	3	13,04	20	86,96
23 контроль (коровы)	-	22-24	14	60,89	9	39,11
21 опыт (телки)	3 + 4	22-24	4	19,04	17	80,96
23 контроль (телки)	-	22-24	16	76,19	5	23,81
27 опыт (телята)	3 + 4	22-24	4	14,81	23	85,19
27 контроль (телята)	-	22-24	19	70,37	8	29,63
36 опыт (телята)	3 + 3	9-10	4	11,11	32	88,89
36 контроль (телята)	-	9-10	30	83,33	6	16,67

На основании проведенных исследований установили, что иммунизация коров, телок, телят (масса 190-230 кг), телят (масса (90-130кг)) формолвакциной гидроокисью алюминия против инфекционного кератоконъюнктивита с использованием факторов вирулентности возбудителя обладает выраженной иммуногенной активностью, спустя 14 суток после второй иммунизации и сохраняется на протяжении девяти месяцев; она стимулирует выработку напряженного иммунитета у всех возрастных групп крупного рогатого скота и обеспечивает им почти полную защиту от заражения, а также вызывает индукцию специфических антител, которые обнаруживаются в высоких титрах

(5 – 6 log) через 14 суток после второй вакцинации и сохраняются на протяжении девяти месяцев

Следовательно, максимально выраженный вакцинальный иммунитет обеспечивает практически у 86,96% - 91,31% коров, 80,96% - 90,48% телок, 85,19% - 88,89% телят (масса 190-230кг), 88,89% - 91,67% телят (масса 90-130 кг) надежную защиту от заражения инфекционными дозами вирулентных культур *Moraxella bovis*, на протяжении девяти месяцев, на которые приходится максимум заболеваемости коров – 60,89% - 73,91%, телок – 71,42% - 80,95%, телят (масса 190-230кг) – 66,66% - 81,48%, телят (масса 90-130 кг) – 77,77% - 86,11% инфекционным кератоконъюнктивитом

Годность вакцины определили по критериям качества: стерильность, безвредность, иммуногенность. Стерильность и безвредность вакцины при хранении в течение 15 месяцев стабильно сохраняются. Вакцина сохраняет свои иммуногенные свойства на протяжении девяти месяцев (срок исследования).

Таким образом, разработали технологию приготовления вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита с использованием факторов вирулентности возбудителя, которая позволяет получать стерильный, безвредный и иммуногенный биопрепарат, позволяющий эффективно профилактировать инфекционный кератоконъюнктивит.

2.2.9. Изготовление и контроль вакцины против кератоконъюнктивита для широкого производственного опыта

Выпустили опытно-промышленную серию вакцины (825 литров) с использованием факторов вирулентности возбудителя и провели производственные испытания в хозяйствах, неблагополучных по данному заболеванию.

Технологический процесс производства вакцины включал в себя следующие стадии: приготовление питательных сред для культивирования производственного штамма *Moraxella bovis* 891K, приготовление посевного материала, культивирование штамма *Moraxella bovis* 891K на питательных сре-

дах для получения бактериальной массы, инаktivирование культуры *Mogaxella bovis* 891K формалином и адсорбция на гидрате окиси алюминия, составление серии вакцины, расфасовка, укупорка, закатывание, этикетирование, контроль вакцины, упаковка, транспортировка, хранение вакцины

Вакцина была стерильной, безвредной и иммуногенной согласно критериям, предусмотренными ТУ

2.2.10. Производственное испытание вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита

Провели производственное испытание вакцины в неблагополучных хозяйствах Белгородской области

Вакцинацию 87099 голов крупного рогатого скота проводили (согласно наставлению по применению) в феврале - апреле месяце в 1995–1999 гг в 12 районах Белгородской области

Заключительный учет состояния животных провели спустя девять месяцев после иммунизации (табл 9)

В 2000–2004 годах провели производственное испытание вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в СХПК «Борец», Тамбовской области

Иммунизацию 1862 голов крупного рогатого скота (500 коров, 720 телок, 642 - молодняк крупного рогатого скота) проводили в феврале - апреле месяце. Заклучительный учет состояния животных провели спустя девять месяцев после иммунизации (табл 10)

Реактогенные свойства вакцины оценивали по клиническому состоянию привитых коров, телок, телят в течение 1-2 дней после иммунизации. В результате вакцинации у отдельных животных наблюдали пост-вакцинальные реакции, которые постепенно исчезали, не нанося вреда здоровью животных и не влияя на их продуктивность

Таблица 9

Эпизоотологическая эффективность формолвакцины гидроокисиалюминиевой против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в хозяйствах Белгородской области

Районы	Количество вакцинированных животных	Поражённость, %		Снижение заболеваемости, раз
		до вакцинации	после вакцинации	
Алексеевский	7375	78,3	9,8	7,9
Борисовский	1750	64,3	10,3	6,2
Волоконовский	1800	69,0	9,1	7,6
Губкинский	16025	76,9	8,1	9,5
Красногвардейский	6325	61,8	7,9	7,8
Новооскольский	8375	60,9	6,6	9,2
Ракитянский	4050	62,1	8,1	7,7
Ровеньской	11725	64,4	7,3	8,8
Старооскольский	9163	68,7	9,4	7,3
Шебекинский	14236	64,6	6,5	9,9
Чернянский	2375	71,2	5,1	13,9
Яковлевский	3900	71,9	8,5	8,4
Всего	87099	67,84	8,05	8,4

Таблица 10

Эпизоотологическая эффективность формолвакцины гидроокисиалюминиевой против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в СХПК «Борец» Сямпурского района Тамбовской области

Количество вакцинированных животных	Заболеваемость %		Снижение заболеваемости, раз
	до вакцинации	после вакцинации	
500 коров	88,94	11,06	8,0
720 телок	89,31	10,69	8,3
642 теленка	88,63	11,37	7,7

Формолвакцина против инфекционного кератоконъюнктивита, изготовленная из штамма *Moraxella bovis* 891K, является ареактогенной для крупного рогатого скота в использованных дозах и создает напряженный иммунитет среди вакцинированных животных в неблагополучных хозяйствах на срок до девяти месяцев с момента иммунизации.

Анализ полученных данных по результатам производственного испытания вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита с использованием

факторов вирулентности возбудителя показал, что её использование позволило снизить заболеваемость крупного рогатого скота в среднем в 7,7-8,3 раз по сравнению с аналогичным периодом предыдущего года, когда скот еще не вакцинировали (табл. 11)

Кроме того, предлагаемая вакцина обладает высоким профилактическим эффектом, позволяет надежно профилактировать инфекционный кератоконъюнктивит.

Полученные данные серологических исследований сыворотки крови коров, телок и телят, на которых испытывалась экспериментальная вакцина, показали, что её введение стимулирует выработку в организме коров, телок и телят антител в высоких титрах, которые обеспечивают им защиту от заражения вирулентными штаммами *Moraxella bovis*. Вакцина снижает заболеваемость коров, телок и телят на 88,63 – 91,3 %.

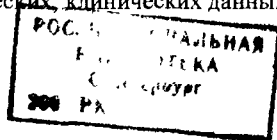
Таблица 11

Эпизоотологическая эффективность формолвакцины гидроокисью алюминия против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в хозяйствах Белгородской и Тамбовской областях

Количество вакцинированных животных	Заболеваемость %		Снижение заболеваемости, раз
	до вакцинации	после вакцинации	
87099 (Белгородская область)	67,84	8,05	8,4
1862 (Тамбовская область)	88,96	11,04	8,0
88961 (всего)	78,4	9,55	8,2

2.2.11. Диагностика и мероприятия по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*

Опираясь на материалы проведенных исследований, и используя их основные результаты, установили, что диагноз на кератоконъюнктивит устанавливают на основании анализа эпизоотологических, клинических данных, с



обязательным условием бактериологического исследования. Результаты исследований показали, что идентификацию исследуемых микроорганизмов проводят на основании изучения культуральных, морфологических, гемолитических, сахаролитических, протеолитических и редуцирующих свойств. Внутривидовую идентификацию изучают на способности восстановления нитратов до нитритов, разжижения желатина, способности вызывать гемолиз на кровяном агаре, ферментации углеводов, каталазной активности, образования индола, подвижности, свертывания и пептонизации лакмусового молока. Особое место в мероприятиях занимает разработанная диагностика.

2.2.12. Мероприятия по борьбе и профилактике с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*

На основании проведенных исследований, обобщения данных литературы и наблюдений разработана система по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом, которая основывается на проведении комплекса организационно-хозяйственных, зоотехнических, ветеринарно-санитарных, противоэпизоотических, зоогигиенических и специфических мероприятий, направленных на повышение резистентности организма крупного рогатого скота, а также на предотвращение заражения животных возбудителем болезни *Moraxella bovis* через объекты внешней среды и путем передачи мухами и насекомыми. Особое место в мероприятиях по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота занимает разработанная специфическая профилактика.

3. ВЫВОДЫ

3.1 В хозяйствах южного региона Российской Федерации среди крупного рогатого скота на протяжении ряда лет регистрируется заболевание, характеризующееся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов конъюнктивы, блефароспазмом, иридооспазмом, серозно-слизистым, а затем серозно-

гнойным истечением из пораженных глаз, помутнением и изъязвлением роговицы. Болезнь проявляется в виде энзоотий, преимущественно в весенне-летний период года. Заболевают животные всех возрастов, а пирокому и быстрому распространению её в стаде (ферме) способствует жаркая солнечная погода, высокая запыленность воздуха помещений и пастбищ, а также комнатные мухи.

3.2 Из экссудата пораженных глаз животных неблагополучных хозяйств, кроме различной кокковой микрофлоры, эпигрихий, протей и др., выделено 659 культур микроорганизмов, которые по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам отнесены к семейству *Neisseriaceae*, роду *Moraxella*, виду *Moraxella bovis*.

3.3 *Moraxella bovis* представляет собой грамотрицательные, не кислотоустойчивые, полиморфные, аэробные, неподвижные, короткие и толстые с закругленными концами бактерии, с характерным парным сочленением, которые штаммы приближены к кокковидной форме, которые не имеют спор и капсулы и встречается преимущественно одиночно, в парах или коротких цепочках, плохо растут или не дают роста на обычных МПБ и МПА, для роста нуждаются в сыворотке крови крупного рогатого скота и дифосфопиридин-нуклеотиде. На кровяном агаре образует круглые, плоские, мелкие, рыхлые, вдавленные в среду, серо-белого цвета колонии, окруженные узкой зоной полного гемолиза (бета-гемолиза), вызывают характерное изменение лакмусового молока – верхний слой темно-синего цвета, средний – светло-синего, а нижний – белого с крупинками пептонизированного молока. В отличие от других видов этого рода (*Moraxella lacunata*, *Moraxella nonlignifaciens*, *Moraxella phenylpyruvica* и *Moraxella osloensis*) этот вид обладает гемолитической активностью, не редуцирует нитраты, свертывает и пептонизирует лакмусовое молоко.

3.4 Сформулирована, апробирована и предложена схема лабораторной диагностики болезни, включающая правила отбора патматериала, методику посева, изоляции и идентификации *Moraxella bovis* по наиболее информатив-

ным тестам. Применение разработанной схемы исследования позволяет в течение 10-12 дней установить диагноз болезни в хозяйстве и дифференцировать её от кератоконъюнктивитов другой этиологии.

3.5 Выделенные из пораженных глаз культуры *Moraxella bovis* обладают патогенностью для белых мышей при подкожном заражении, а после введения суспензии агаровой культуры в дозе 4,5-5 млрд микробных клеток в конъюнктивальный мешок вызывают у телят 2-3 месячного возраста через 7-19 суток клинические поражения инфицированного глаза, наблюдаемые в естественных условиях, т.е. экспериментально кератоконъюнктивит воспроизводится культурами, выделенными из пораженных глаз животных в период энзоотической вспышки

3.6 В экссудате, а также в мазках с конъюнктивы и роговицы пораженных глаз систематически обнаруживаются бактерии морфологически схожие с моракселлами, а из этих же объектов выделяются в чистой культуре бактерии вида *Moraxella bovis*, вызывающие в условиях экспериментального заражения у телят кератоконъюнктивит, схожий по клиническим признакам с наблюдаемым в естественных условиях. Эти данные позволяют считать, что наблюдаемый нами кератоконъюнктивит у крупного рогатого скота в хозяйствах южного региона Российской Федерации вызывается микроорганизмом *Moraxella bovis*

3.7 На основании полученных данных рекомендуется именовать кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый моракселлами, инфекционным (моракселлезным) кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, так как в этом названии отражены вид восприимчивых животных, родовое название возбудителя, эпизоотологическая и клиническая характеристика, позволяющие дифференцировать её от кератоконъюнктивитов другой этиологии (риккетсиозный, телязиозный кератоконъюнктивиты)

3.8 Из эпизоотических культур путем серийных пассажей на кровяном агаре с дрожжевым экстрактом по бета-гемолитическому признаку и формированию колоний, типичных для продуцента адгезина, селекционирован

штамм *Moraxella bovis* 891K, обладающий стабильностью и иммуногенностью и сохраняющий фенотип факторов вирулентности. Отработаны режим и условия хранения штамма.

3.9 Для культивирования штамма *Moraxella bovis* 891K с целью получения необходимых количеств бактериальной массы при изготовлении вакцины подобран рецепт жидкой питательной среды, включающей бульон из перевара Хоттингера (аминный азот 220-230 мг%), pH 7,2-7,4, 5% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота неспецифической, неконсервированной и 10% стерильного экстракта пекарских дрожжей. Отработан режим культивирования штамма в предложенной среде, позволяющий получать бактериальную массу 16-18 млрд микробных клеток в 1 см³.

3.10 Экспериментально обоснована, сформулирована и апробирована технология изготовления и контроля инактивированной гидроокисью алюминия формолвакцины против инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита крупного рогатого скота.

3.11 Определена минимальная иммунизирующая доза приготовленной по разработанной технологии вакцины, отработаны дозы для крупного рогатого скота двух возрастов (коровы, телки и телята) и кратность инъекций. Показано, что животных необходимо вакцинировать двукратно с интервалом в 21 день, доза вакцины для коров – 3+4 мл (иммунитет у 91,7%), для телок массой 270-290 кг – 3+4 мл (иммунитет у 92,9%), для телят массой 190-230 кг – 3+4 мл (иммунитет у 82,4%), для телят массой 90-130 кг – 3+3 мл (иммунитет у 86,4%). Вакцина сохраняет выраженную иммуногенность до 9 месяцев, при условии хранения её при температуре +10°C -12°C.

3.12 После подкожного двукратного введения вакцины в указанных дозах у более чем 90% животных формируется устойчивость к экспериментальному заражению вирулентными штаммами *Moraxella bovis* к 14 дню после второй инъекции. Устойчивость к заражению у 80,9% животных сохраняется к 9-му месяцу и у 66,6% – к 12-му месяцу после вакцинации. Следовательно, при использовании предложенной вакцины по разработанной схеме у абсо-

лотного количества животных формируется иммунитет сроком до 9 месяцев, т.е. срок, достаточный для предохранения от заражения в период ожидаемой массовой вспышки заболевания. Поэтому вакцинировать животных неблагополучных хозяйств необходимо в марте и апреле месяце.

3.13 По разработанной технологии в условиях производственной лаборатории изготовлено более 800 липров формолвакцины гидроокисью алюминия против инфекционного (моракселлезного) кератоконъюнктивита. Этой вакциной, согласно вышеизложенной схемы, вакцинировано в неблагополучных хозяйствах 12 районов Белгородской области 87099 и в Тамбовской области 1862 головы крупного рогатого скота разных возрастов. В результате вакцинации заболеваемость животных в хозяйствах Белгородской области с 67,84% от общего поголовья снизилась до 8,05% (8,4 раз), а в хозяйствах Тамбовской области – с 88,96% до 11,04% (8 раз).

3.14 Научно обоснованы, апробированы и предложены методические рекомендации по диагностике и мероприятия по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*.

3.15 На основании проведенных исследований, обобщения данных литературы и наблюдений сформулирована система ветеринарно-санитарных и профилактических мероприятий по предотвращению заболевания крупного рогатого скота инфекционным (моракселлезным) кератоконъюнктивитом, предусматривающая проведение поголовной вакцинации животных неблагополучных хозяйств в марте – апреле месяце.

4. Практические предложения

1 Методические рекомендации по диагностике и мероприятия по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*. Утверждены Управлением ветеринарии Минсельхоза РФ 25.08.2005г. №5 – 2 – 1220 – 05

2 Методические рекомендации по выделению и культивированию *Moraxella bovis* от крупного рогатого скота, больного инфекционным керато-

конъюнктивитом. Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30. 06. 2005г

3 Методические рекомендации по лабораторной диагностике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*. Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30. 06. 2005г.

4 Методические рекомендации по ускоренному микрообъемному методу определения восстановления нитратов у *Moraxella bovis*. Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30. 06. 2005г

5 Методические рекомендации по определению восстановления нитратов у *Moraxella bovis* на плотной питательной среде. Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30. 06. 2005г

6 Методические рекомендации о мероприятиях по борьбе и профилактике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*. Одобрены бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 30. 06. 2005г.

7 Разработана и утверждена нормативно-техническая документация.

- Технические условия на вакцину против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Одобрены Ученым Советом Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса 21/02 – 2001г

- Временное наставление по применению вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Одобрено Ученым Советом Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса 21/02 – 2001г.

- Временная инструкция по изготовлению и контролю вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Одобрена Ученым Советом Белгородского института переподготовки и повышения квалификации кадров агробизнеса 21/02 – 2001г

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Карайченцев В Н , Дунаев Г В , Русинов А Ф., Ядыкин А И., Бабенко О.В. Изоляция *Moraxella bovis* от молодняка крупного рогатого скота с инфекционным кератоконъюнктивитом "Ветеринария" - 1992. - №2 – С 26-27

2 Карайченцев В Н Резервы увеличения производства мяса и молока Приоритеты современного экономического развития Мат науч конф - Краснодар, 2001. – Ч.III – С. 103-104.

3. Карайченцев В.Н. Средство для профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и способ профилактики этого заболевания. Патент № 2240820, от 27 ноября 2004г , с приоритетом изобретения от 10 июля 2000г.

4 Карайченцев В.Н. Изучение иммуногенных свойств формолвакцины гидроокисьюалюминиевой против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат 14-й межд науч -практ. конф. С-Пб., 2002 – С 24

5 Карайченцев В Н Иммунопрофилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения Мат 6-й межд науч - произв. конф. - Белгород, 2002.- Ч 1 – С 133.

6. Карайченцев В Н. Формолвакцина гидроокисьюалюминиевая против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат 14-й межд науч -практ. конф. С-Пб , 2002. – С. 21.

7. Карайченцев В.Н Специфическая профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения Мат 6-й межд науч - произв. конф. - Белгород, 2002. - Ч 1 – С. 134.

8. Карайченцев В.Н Эффективность иммунизации крупного рогатого скота против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота

Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат 14-й межд. науч.-практ. конф. С-Пб., 2002 – С 23

9 Карайченцев В Н Вакцинация крупного рогатого скота против инфекционного кератоконъюнктивита, вызываемого *Moraxella bovis* Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения Мат 6-й межд. науч.-произв. конф. - Белгород, 2002 - Ч 1 – С 136

10 Карайченцев В Н Специфическая профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат 14-й межд. науч.-практ. конф. С-Пб., 2002 – С. 22.

11 Карайченцев В Н Эффективность инактивированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения Мат 6-й межд. науч.-произв. конф. - Белгород, 2002 - Ч 1 – С 135

12 Карайченцев В Н Иммуногенность вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат. 14-й межд. науч.-практ. конф. С-Пб., 2002 – С 25

13 Карайченцев В Н Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат. 14-й межд. науч.-практ. конф. С-Пб., 2002. – С 26

14 Карайченцев В Н Борьба с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота - резерв увеличения производства продуктов животноводства Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения Мат 7-й межд. науч.-произв. конф. - Белгород, 2003 - Ч 1 – С 162-163

15 Карайченцев В Н Иммуногенная активность формолвакцины гидроокисьалюминиевой против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Актуальные проблемы ветеринарной медицины Мат. межд. науч.-практ. конф. - Ульяновск, 2003 – С 135

16. Карайченцев В.Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый *Moraxella bovis*. Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных. Мат. междунауч. конф. - Улан-Удэ, 2003 - С. 117

17. Карайченцев В.Н. Специфическая иммунопрофилактика формолвакцины гидроокисью алюминия против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Новые фармакологические средства в ветеринарии. Мат. 15-й междунауч.-практ. конф. С-Пб., 2003 - С. 71.

18. Карайченцев В.Н. Клинические признаки инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения. Мат. 7-й междунауч.-произв. конф. - Белгород, 2003 - Ч.1 - С. 164-165

19. Карайченцев В.Н. Иммунный ответ у животных на введение формолвакцины гидроокисью алюминия против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Мат. междунауч.-практ. конф. - Ульяновск, 2003 - С. 133

20. Карайченцев В.Н. Эпизоотическая эффективность формолвакцины гидроокисью алюминия против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Новые фармакологические средства в ветеринарии. Мат. 15-й междунауч.-практ. конф. С-Пб., 2003 - С. 72.

21. Карайченцев В.Н. Характеристика *Moraxella bovis*, выделенных от крупного рогатого скота. Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных. Мат. междунауч. конф. - Улан-Удэ, 2003 - С. 118.

22. Карайченцев В.Н. Диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения. Мат. 7-й междунауч.-произв. конф. - Белгород, 2003 - Ч.1. - С. 163-164

23. Карайченцев В.Н. Профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Новые фармакологические средства в ветеринарии. Мат. 15-й междунауч.-практ. конф. С-Пб., 2003 - С. 18

24. Карайченцев В.Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый *Moraxella bovis* и его иммунопрофилактика. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Мат. междунауч.-практ. конф. - Ульяновск, 2003. - С. 131.

25. Карайченцев В.Н. Вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных. Мат. междунауч. конф. - Улан-Удэ, 2003. - С. 119.

26. Карайченцев В.Н. Применение вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита, вызываемого *Moraxella bovis*. Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных. Мат. междунауч. конф. - Улан-Удэ, 2003. - С. 126.

27. Карайченцев В.Н. Профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в неблагополучных хозяйствах. Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных. Мат. междунауч. конф. - Улан-Удэ, 2003. - С. 120.

28. Карайченцев В.Н. Система мероприятий по борьбе с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Мат. междунауч.-практ. конф. - Ульяновск, 2003. - С. 143.

29. Карайченцев В.Н. Этиология инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Мат. междунауч.-практ. конф. - Ульяновск, 2003. - С. 122.

30. Карайченцев В.Н. Вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения. Мат. 8-й междунауч.-произв. конф. - Белгород, 2004. - С. 76 - 77.

31. Карайченцев В.Н. Экспериментальное воспроизведение инфекционного кератоконъюнктивита на молодняке крупного рогатого скота. Новые фармакологические средства в ветеринарии. Мат. 16-й междунауч.-практ. конф. С.-Пб., 2004. - С. 50 - 51.

32. Карайченцев В.Н. Определение нитратредуктазы у *Moraxella bovis* микрообъемным методом Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат 16-й межд науч.-практ конф. С-Пб., 2004 – С. 49

33. Карайченцев В Н Выделение и идентификация возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения: Мат 8-й межд. науч.-произв. конф. - Белгород, 2004. – С 54 – 55

34. Карайченцев В.Н. Определение нитратредуктазы у *Moraxella bovis* на плотной питательной среде Новые фармакологические средства в ветеринарии Мат 16-й межд. науч.-практ. конф С-Пб , 2004 – С 12-13

35. Карайченцев В Н. Эпизоотическая и экономическая эффективность противокератоконъюнктивитных мероприятий Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения: Мат 8-й межд. науч.-произв. конф - Белгород, 2004 – С 53 – 54

36 Карайченцев В Н. Профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота «Ветеринария». – 2005. - № 9. – С 12 – 13

37. Карайченцев В.Н. Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Журнал «Доклады Россельхозакадемии». - 2005 - №6. –С. 51-52

38.Карайченцев В.Н. Профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis* «Молочное и мясное скотоводство». - 2005. - №7. – С. 38.

39. Карайченцев В Н. Определение нитратредуктазы у *Moraxella bovis* «Ветеринария» - 2005. - №11. – С 30-31

Отпечатано ООО «Графика»
г Белгород, ул Мичурина, 56
тираж 100 экз.



РНБ Русский фонд

2007-4

8046

29 АЕН 2005