

РГБ ОД

20.11.1999

На правах рукописи

УДК 597-12:639.371.13

**БЕЗГАЧИНА
ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА**

**ДИАГНОСТИКА ВИБРИОЗА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ
В АКВАКУЛЬТУРЕ**

Специальность - 03.00.10. - иктиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 1998

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте
рыбного хозяйства и океанографии
Департамент по рыболовству Минсельхозпрода России

Научные
руководители:

Заслуженный деятель науки Российской
Федерации, доктор ветеринарных наук,
профессор К.В.Шумилов

Кандидат ветеринарных наук, старший
научный сотрудник О.Д.Скляров

Официальные оппоненты:

1. Доктор биологических наук Е.М.Малкин (ВНИРО).
2. Кандидат биологических наук, доцент Л.И.Грищенко (МГВА и Б
им. К.И.Скрябина)

Ведущее учреждение - Всероссийский государственный научно-
исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации вете-
ринарных препаратов

Защита диссертации состоится 25 марта 1998 г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 117.01.02 при
Всероссийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и
океанографии (ВНИРО) по адресу: 107140, Москва, В. Красносельская, д. 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИРО

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 1998 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.В.Астафьева

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рыбоводство является одной из перспективных отраслей экономики многих странах мира, в том числе, и Российской Федерации. В свою очередь форелеводство является важной составляющей рыбоводства.

Целесообразность разведения радужной форели объясняется рядом факторов. Во-первых, эта рыба выделяется среди других лососевых высокой степенью эврибионтности. Во-вторых, она обладает отличными вкусовыми качествами и диетическими свойствами. В-третьих, дает высокий выход продукции с единицы площади культивирования, в сравнении с другими объектами рыбоводства

Успешному развитию и выращиванию радужной форели мешает восприимчивость ее ко многим инфекционным заболеваниям и, в частности, к вибриозу.

Возбудителя данной болезни впервые выделил Bergmann в 1909 году от больных угрей. Он описал это заболевание как краснуху или бубонную чуму угрей. Позднее, аналогичное заболевание у угрей, мигрирующих в Балтийском море, регистрировал Schaperclaus в 1927 и в 1934 годах. Впервые в Японии бактерии *Vibrio anguillarum* описал Muroga et al. в 1976 году, а в Северной Америке Crosta et al. - в 1977 году. В нашей стране первые работы по изучению заболевания рыб Каспийского моря, вызванного вибрионами, выполнены Вылегжаниным (1958, 1967, 1973). Впервые о бактериологическом подтверждении этиологии эпизоотии вибриоза сообщили Ыун А.И. и Щукина И.Н. (1976).

Вибриоз является одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний радужной форели в пресной, солоноватой и морской воде.

Быстрая диагностика вибриоза рыб имеет важнейшее значение, так как она определяет стратегию и тактику профилактических и лечебных мероприятий.

Разработкой методов диагностики болезней рыб и, в частности, вибриоза занимались многие отечественные ученые. Эти методы достаточно подробно представлены в работах Щербины (1973), Иванова (1976), Радина (1976), Ыун и Щукиной (1976), Гончарова (1980), Бауэра и др. (1981), Луллу и др. (1982), Ыун и Луллу (1982), Юхименко (1980) и др.

В нашей стране диагноз на вибриоз устанавливают по результатам эпизоотологического, клинического и бактериологического метода исследования. Но даже выделение чистой культуры бактерий, по морфологическим и культуральным свойствам идентичных *Vibrio anguillarum*, предполагает их идентификацию по результатам исследования в биохимических тестах. В целом, диагностика вибриоза радужной форели требует значительных затрат времени и средств. Методы серологической диагностики заболевания в РФ не разработаны, хотя согласно сообщениям многих зарубежных исследователей и на основании результатов собственных исследований их можно считать перспективными.

С учетом важности успешного развития форелеводства в стране, исследования, посвященные разработке новых методов идентификации возбудителя вибриоза рыб, способствующих более быстрой и точной диагностике заболевания, являются вполне актуальными.

Цель и задачи исследований

Целью настоящего исследования являлось усовершенствование диагностики вибриоза рыб на модели радужной форели с использованием метода серологической идентификации возбудителя болезни.

Для достижения указанной цели на разрешение были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать штаммы *Vibrio anguillarum*, пригодные для изготовления диагностических агглютинирующих сывороток.
2. Разработать схему гипериммунизации кроликов культурами штаммов *Vibrio anguillarum* с целью получения агглютинирующих сывороток.
3. Изготовить моноштабные агглютинирующие сыворотки против *Vibrio anguillarum* и проверить их активность до и после лиофилизации в РА на стекле и в пробирках.
4. Испытать активность и специфичность агглютинирующих сывороток в РА на стекле и в пробирках с культурами гомологичных и гетерологичных штаммов *Vibrio anguillarum* и культурами штаммов других видов рода *Vibrio* и семейства *Vibrionaceae*, вызывающими у рыб заболевания сходные с вибриозом.
5. Испытать агглютинирующие сыворотки против *Vibrio anguillarum* и установить их рабочий титр в РА на стекле и в пробирках с полевыми культурами, выделенными из патологического материала от рыб, культивируемых в Черноморском и Балтийском бассейнах.
6. Разработать нормативную документацию на сыворотку агглютинирующую против *Vibrio anguillarum*, предназначенную для идентификации возбудителя вибриоза рыб и диагностики данного заболевания.

Научная новизна работы

1. Впервые установлено антигенное родство между бактериями *Vibrio anguillarum*, выделенными из патологического материала от радужной форели и стальноголового лосося в Черноморском бассейне и от радужной форели в Балтийском бассейне.
2. Впервые установлено, что активность агглютинирующих сывороток против *Vibrio anguillarum* не снижается в процессе их лиофилизации.
3. Разработан метод изготовления агглютинирующей сыворотки против *Vibrio anguillarum*, позволяющей идентифицировать культуры *Vibrio anguillarum* разных биотипов.

Новизна полученных результатов подтверждена Авторским свидетельством № 1268172 от 8.07.1986 г. "Способ получения сухой агглютинирующей сыворотки для диагностики вибриоза лососевых рыб".

Практическая значимость работы

Для практического применения предложена сыворотка агглютинирующая против *Vibrio anguillarum*, позволяющая идентифицировать возбудителя вибриоза рыб от других бактерий, патогенных для рыб. Использование данной сыворотки значительно ускоряет и упрощает диагностику вибриоза радужной форели. Сыворотка предназначена также для контроля активности антигена эритроцитарного для диагностики вибриоза рыб и контроля антигенной активности культур штаммов *Vibrio anguillarum* при изготовлении вакцины бивалентной инактивированной против вибриоза рыб..

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены в годовых отчетах научной диагностической лаборатории болезней рыб и других гидробионтов на заседании Ученого совета ВНИРО за 1990-1995 гг; на заседании секции марикультуры научно-методического совета ВНИРО 30 ноября 1991 года; на V Всесоюзном симпозиуме по инфекционным болезням рыб (Москва, 1986); на I Всесоюзном совещании по болезням морских гидробионтов (Большой Утриш, 1986); На Всероссийской конференции "Научно-технические проблемы марикультуры в стране" (Владивосток, 23-29 октября 1989 года); на IX Всесоюзном совещании по паразитологии и болезням рыб (Петрозаводск, март 1991 год); на научно-практической конференции "Развитие аквакультуры на внутренних водоемах", посвященной 50-летию кафедры прудового рыбоводства МСХА (Москва, 1995); на Международном симпозиуме по марикультуре (Краснодар, п. Небуг, 24-27 сентября 1995 года); на Всероссийском совещании "Проблемы товарного выращивания лососевых рыб России" (Мурманск, 1-4 августа 1995 года); на Международном симпозиуме "Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре" (Адлер, 1996); на Всероссийском совещании "Состояние и перспективы научно-практических разработок в области марикультуры России" (Ростов-на-Дону, 1996); на VIII Международной конференции "Болезни рыб и гидробионтов" (Шотландия - Эдинбург, 1997); на объединенном коллоквиуме научной диагностической лаборатории болезней рыб и других гидробионтов, отдела управления реализации МКЦП "Марикультура" ВНИРО и отдела препаратов против хронических болезней животных ВГНКИ 30 июля 1997 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ .

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 94 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения, список литературы и приложение на 26 страницах

Работа иллюстрирована 14 таблицами и 4 рисунками. Список использованной литературы содержит 134 источников, в том числе 85 иностранных.

К основным положениям диссертационной работы, выносимым на защиту, относятся результаты, показывающие возможность идентификации возбудителя вибриоза рыб в РА с помощью агглютинирующей сыворотки против *Vibrio anguillarum*.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась в лаборатории марикультуры и в научной диагностической лаборатории болезней рыб и других гидробионтов ВНИРО, на базе рыбного хозяйства на Большом Утрише Анапского района Краснодарского края и в Латвийской республиканской лаборатории особо опасных инфекций животных, в рыбколхозе "Банга" в Латвии, в рыбколхозе "Им. В.И.Ленина" Выборгского района Ленинградской области в период с 1983 по 1997 годы.

Для исследования использовали культуры 236 штаммов микроорганизмов, а также вибриозный антиген для РА; антиген сальмонеллезный моновалентный Холера суис; антиген сальмонеллезный Тифи муриум; антиген сальмонеллезный моновалентный аборта овец; антиген бруцеллезный единый для РА, РСК, РДСК; сыворотки вибриозные (кампилобактериозные) моноспецифические агглютинирующие, сыворотки агглютинирующие для идентификации различных микроорганизмов.

Клиническому, патологоанатомическому и бактериологическому исследованию было подвергнуто 3500 экземпляров лососевых, в том числе 3200 экземпляров радужной форели и 300 экземпляров стальноголового лосося.

Для выделения, выращивания и типирования культур штаммов *Vibrio anguillarum* использовали стандартные питательные среды: полужидкий, плотный мясо-пептонный агар (МПА) с 1,5% хлористого натрия и дифференциально-диагностический агар (ДДА).

Для изготовления агглютинирующих сывороток использовали 80 кроликов массой 2,5-3,0 кг.

Работу проводили руководствуясь общепринятыми в бактериологии методами.

Принадлежность исследуемых культур к виду *anguillarum* определяли в соответствии с оценками результатов изучения их свойств в различных тестах (Гончаров, 1973; Радин, 1976; Ыун, Щукина, 1979; Бауэр и др., 1981; Лулу и др., 1982).

Ориентировочную дифференциацию вибрионов от других микроорганизмов проводили по оценке роста колоний на ДДА.

Приготовление антигенов для РА

Для приготовления антигена испытуемые односуточные культуры, выращенные на МПА с содержанием 1,5% хлористого натрия, суспендировали в физиологическом растворе с содержанием 0,3% формалина. После инактивирования бактериальную массу дважды отмывали физиологическим раствором с содержанием 0,3% формалина путем центрифугирования при 3000 об/мин в те-

чение 30 мин. После второго центрифугирования надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок суспендировали в идентичном растворе с таким расчетом, чтобы в 1 см^3 суспензии содержался 1 млрд. микробных клеток по оптическому стандарту мутности ГИСК и использовали в качестве антигенов.

Приготовление антигенов для гипериммунизации кроликов

Односуточные второй генерации культуры штаммов суспендировали в стерильном 0,3%-ном формализированном физиологическом растворе и определяли концентрацию микробных клеток в 1 см^3 , путем сравнения их мутных последовательных разведений с оптическим стандартом мутности ГИСК. После чего готовили суспензии вибрионов каждого штамма с концентрацией 5 млрд. микробных клеток в 1 см^3 и использовали их для гипериммунизации кроликов.

Постановка и учет РА на стекле.

Для постановки реакции использовали обезжиренные предметные стекла. Стекло делили на 3 равные части путем нанесения восковым карандашом поперечных линий. На первую часть стекла наносили каплю агглютинирующей сыворотки против *Vibrio anguillarum*, разведенной 1:40 физиологическим раствором, на вторую - каплю нормальной сыворотки крови кролика в идентичном разведении, на третью - каплю физиологического раствора (отрицательные контроли). На стекло рядом с каждой каплей наносили бактериологической петлей небольшое количество исследуемой культуры и тщательно ее суспендировали. После каждого суспендирования петлю прожигали и охлаждали. Учет реакции проводили визуально в течение 4 минут, слегка покачивая стекло. Если в пробе с агглютинирующей сывороткой наблюдалось просветление жидкости и образование хлопьев агглютината, а контрольные пробы оставались гомогенными реакцию оценивали как положительную. Если исследуемая проба оставалась гомогенной реакцию оценивали отрицательно. При образовании хлопьев агглютината в контрольных пробах результаты реакции считали неспецифическими.

Постановка и учет РА в пробирках

Агглютинирующую сыворотку против *Vibrio anguillarum* разводили физиологическим раствором, содержащим 0,3% формалина, в соотношении 1:12,5; 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200. Количество рядов пробирок с содержанием по $0,5 \text{ см}^3$ каждого разведения сыворотки готовили в соответствии с количеством исследуемых антигенов, приготовленных из испытуемых культур, плюс один ряд - для положительного контроля с гомологичным антигеном. В пробирки с разведениями сыворотки вносили по $0,5 \text{ см}^3$ испытуемых и контрольного антигенов.

Для контроля антигенов на самоагглютинацию в пробирки с $0,5 \text{ см}^3$ раствора, применяемого для разведения сыворотки и с $0,5 \text{ см}^3$ нормальной кроличьей сыворотки в разведении 1:25 вносили по $0,5 \text{ см}^3$ антигенов.

После добавления антигенов штативы с пробирками встряхивали и помещали в термостат при температуре 37-38°C на 15 - 20 часов, затем их выдерживали их при температуре 18 - 22°C в течение 3 - 4 часов и проводили учет реакции. За титр сыворотки принимали ее последнее разведение, в котором произошла агглютинация испытуемого антигена с оценкой не менее чем на три креста. При этом контрольный антиген из культуры *Vibrio anguillarum* (положительный контроль) должен агглютинироваться сывороткой до ее предельного титра и оба антигена должны давать отрицательный результат (отрицательный контроль) в реакции с нормальной кроличьей сывороткой в разведении 1:25 и с физиологическим раствором, содержащим 0,3% формалина.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. ПОДБОР ШТАММОВ *Vibrio anguillarum* ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК

Отбирая штаммы вибрионов, которые могли бы быть использованы для получения диагностических агглютинирующих сывороток против *Vibrio anguillarum*, мы руководствовались рядом соображений. Штаммы должны были:

- быть выделенными из патологического материала от рыб с клиническими признаками вибриоза;
- быть патогенными для рыб по результатам биопробы;
- быть выделенными в разных регионах страны;
- обладать выраженными антигенными свойствами.

Согласно паспортным данным, требованиям первых трех пунктов отвечали штаммы *Vibrio anguillarum* № 1, 2, 3, 4, 5 и 19.

Путем микроскопирования мазков культур штаммов было установлено, что морфологически все исследуемые штаммы представлены грамтрицательными, тонкими, короткими, слабоизогнутыми палочками с одним полярным жгутиком.

Результаты изучения дифференциально-диагностических свойств данных штаммов показали, что по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам они не различаются. Причем, все штаммы обладают свойствами, характерными для бактерий вида *anguillarum* биотипа А, а именно, не растут на питательной среде без хлорида натрия, дают положительную реакцию в тесте на индолообразование, ферментируют глюкозу, сахарозу, лактозу, арабинозу, маннозу, маннит без образования газа и не ферментируют инозит.

Антигенные свойства штаммов изучали в опыте на кроликах. Односуточные культуры вибрионов, выращенные на МПА с 1,5% хлорида натрия, скопшенном в пробирках, суспендировали в физиологическом растворе. Суспензии каждого штамма в объеме по 1 см³ с концентрацией 10 млрд. микробных клеток в см³ по оптическому стандарту мутности ГИСК вводили кроликам внутривенно. Каждый антиген вводили двум кроликам. Пробы сыворотки крови исследовали в пробирочной РА с использованием гомологичных и гетерологичных

инактивированных антигенов с концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1 см³ через 7, 14, 21, 28 и 42 дня после иммунизации (табл. 1). За титр антител принимали наибольшее разведение сыворотки, агглютинирующей антиген с оценкой не менее чем на три креста (+++).

Из материалов таблицы видно, что исследуемые штаммы различаются по агглютиногенным свойствам. В частности, максимальные титры сыворотки крови кроликов, иммунизированных культурами штаммов № 2, 4, 19, при исследовании через 28 суток составили 1:400. Титры сыворотки крови кроликов, привитых культурами штаммов № 1, 3, 5, были в этот период вдвое меньше.

Для определения антигенной специфичности двухсуточные агаровые культуры штаммов вибрионов, исследовали в РА на стекле с сыворотками, полученными в опыте по проверке агглютиногенных свойств штаммов и с разными диагностическими сыворотками. Культуры штаммов *Vibrio anguillarum* № 1, 2, 3, 4, 5, 19 агглютинировались в прямой и перекрестных реакциях с сыворотками крови, полученными на эти штаммы и разведенными физиологическим раствором 1:40. При этом реакции отличались по характеру агглютината в зависимости от используемой культуры. Так, культуры штаммов № 2, 4, 5, 19 формировали крупнозернистый, а культуры штаммов № 1 и 3 - мелкозернистый агглютинат.

Ни одна из культур испытуемых штаммов вибрионов не агглютинировалась коли-, сальмонеллезными, кампилобактериозными, псевдомонозной, холерными сыворотками и сыворотками против протей, что позволяет сделать вывод о наличии у культур штаммов № 1, 2, 3, 4, 5, 19 общего видоспецифичного антигена.

Учитывая, что штамм № 19 выделен из патологического материала радужной форели в Черноморском бассейне, а остальные штаммы - в Балтийском, что штамм № 2 при культивировании на стандартных питательных средах дает большее накопление бактериальной массы, что эти два штамма и штамм № 4 при агглютинации вибриозными сыворотками формируют крупнозернистый агглютинат, хорошо учитываемый невооруженным глазом, а также, что эти штаммы обладают выраженными агглютиногенными свойствами и видовой специфичностью, именно они были выбраны для приготовления гипериммунных агглютинирующих сывороток против *Vibrio anguillarum*.

3.2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ПРОТИВ *Vibrio anguillarum*

Исходя из того, что в опыте по проверке агглютиногенных свойств штаммов у кроликов, иммунизированных живыми культурами вибрионов в дозе 10 млрд. микробных клеток, наблюдались негативные явления (резко выраженная угнетенность и отказ от корма), для гипериммунизации животных было решено использовать культуры вибрионов инактивированные формалином, а также уменьшить дозу бактерий вдвое и первое введение осуществлять подкожно,

Таблица 1

Результаты изучения агглютинирующих свойств культур штаммов вибрионов в пробирочной РА

Сыворотка, полученная на штамм (№)	Антиген из штамма (№№)	СРЕДНИЙ ТИТР АНТИТЕЛ				
		7-ые сутки	14-ые сутки	21-ые сутки	28-ые сутки	42-ые сутки
		1 2 3 4 5 6 7	1 2 3 4 5 6 7	1 2 3 4 5 6 7	1 2 3 4 5 6 7	1 2 3 4 5 6 7
1	1	4 2 0 0 0 0 0	4 4 3 1 0 0 0	4 4 4 3 1 0 0	4 4 4 3 1 0 0	4 4 3 2 0 0 0
2	2	4 3 0 0 0 0 0	4 4 4 3 1 0 0	4 4 4 4 3 0 0	4 4 4 4 3 1 0	4 4 4 3 2 0 0
3	3	4 1 0 0 0 0 0	4 4 3 1 0 0 0	4 4 4 3 0 0 0	4 4 4 3 1 0 0	4 4 3 2 1 0 0
4	4	4 4 3 1 0 0 0	4 4 4 3 2 0 0	4 4 4 4 3 0 0	4 4 4 4 3 1 0	4 4 4 3 2 0 0
5	5	4 3 1 0 0 0 0	4 3 2 1 0 0 0	4 4 3 3 0 0 0	4 4 4 3 2 0 0	4 4 3 2 1 0 0
19	19	4 2 1 0 0 0 0	4 4 4 3 2 0 0	4 4 4 3 2 0 0	4 4 4 4 3 1 0	4 4 3 2 0 0 0

Примечания: порядковые номера (1-7) соответствуют разведениям сывороток - 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600;

цифры, расположенные под порядковыми номерами, обозначают оценку реакции в крестах

а последующие внутривенно. Для приготовления агглютинирующих сывороток культуру рой каждого из штаммов иммунизировали по два кролика. Сыворотки, полученные от кроликов не смешивали и исследовали отдельно, поэтому результаты их испытания представлены средними титрами. Схема гипериммунизации кроликов представлена в таблице 2.

Таблица 2

Схема гипериммунизации кроликов при изготовлении агглютинирующих сывороток

Порядковый номер инъекции	Объем антигена (см ³)	Доза млрд. микробных клеток	Способ введения
1	1	5	подкожно, в область бедра
2	1	5	в ушную вену
3	2	10	в ушную вену
4	2	10	в ушную вену
5	3	15	в ушную вену

Антигены вводили кроликам с интервалом 7 дней. Через 7 дней после пятой инъекции у кроликов брали кровь из ушной вены. Пробы сыворотки крови исследовали в пробирочной РА с гомологичными антигенами. При полной агглютинации антигенов в титре 1:1600 кроликов тотально обескровливали.

В РА с гомологичными антигенами определяли титр агглютининов в сыворотке и разливали ее в ампулы из нейтрального стекла. Одну половину сыворотки в ампулах оставили в нативном виде, а другую - лиофилизировали в лаборатории инструментальных методов контроля ВГНКИ. Ампулы с нативной сывороткой запаивали без вакуума, а с лиофилизированной сывороткой - под вакуумом.

В РА с гомологичными антигенами определяли титр агглютининов в сыворотке и разливали ее в ампулы из нейтрального стекла. Одну половину сыворотки в ампулах оставили в нативном виде, а другую - лиофилизировали в лаборатории инструментальных методов контроля ВГНКИ. Ампулы с лиофилизированной сывороткой запаивали под вакуумом.

3.3. ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ПРОТИВ *Vibrio anguillarum*

Активность приготовленных агглютинирующих сывороток против

Vibrio anguillarum вначале изучали в РА на стекле с живыми двухсуточными культурами вибрионов. Культуры испытуемых штаммов агглютинировались сыворотками в достаточно высоких разведениях - от 1:50 до 1:800. Самой активной оказалась сыворотка, полученная на штамм №2. Культуры штаммов № 1, 2, 3, 4, 5 и 19 агглютинировались этой сывороткой соответственно в разведениях 1:300; 1:800; 1:75; 1:300; 1:50 и 1:50. Сыворотка, полученная на штамм № 4 в разведении 1:50 агглютинировала культуру штамма № 5; 1:200 - культуры штаммов № 1, 3, 19; 1:300 - культуру штамма № 4; 1:400 - культуру гомологичного штамма. Сыворотка, полученная на штамм №19, в титре 1:50 агглютинировала культуры штаммов № 1, 2, 3, 5; в титре 1:100 - культуру штамма №4 и в титре 1:200 - культуру гомологичного штамма. При этом ни одна из культур не давала агглютинации с нормальной кроличьей сывороткой в разведении 1:25 и с физиологическим раствором.

После изучения активности сывороток в РА на стекле их активность определили в пробирочной РА. Вначале это сделали в отношении нативных сывороток. При этом самые высокие титры агглютинина были зарегистрированы при взаимодействии сывороток с гомологичными антигенами. Так, сыворотки, полученные на культуры штаммов № 2, 4, 19, агглютинировали антигены, приготовленные из штаммов № 2, 4, 19, соответственно в титрах 1:6400; 1:4800; 1:3200. Сыворотка, полученная на штамм № 2, агглютинировала антиген из штамма № 4 в титре 1:3200, антиген из штамма №19 - 1:1600; полученная на штамм № 4, агглютинировала антиген из штамма № 2 в титре 1:3200, из штамма № 19 - 1:1600; полученная на штамм № 19, агглютинировала антиген из штамма № 2 в титре 1:400, из штамма № 4 - 1:1600.

Результаты исследования лиофилизированных сывороток представлены на гистограмме (рис. 1). Изучая гистограмму можно увидеть, что, как и при исследовании нативных сывороток, самые высокие титры лиофилизированных сывороток зарегистрированы в реакции с использованием антигенов, приготовленных из гомологичных штаммов. Так, сыворотка, полученная на штамм № 2, агглютинировала гомологичный антиген в титре 1:6400; полученная на штамм № 4 - в титре 1:4800; полученная на штамм № 19 - в титре 1:3200.

Титры сыворотки, полученной на штамм № 2, зарегистрированные в перекрестной РА с антигенами, приготовленными из штаммов 1, 3, 4, 5, 19 составили соответственно 1:1200, 1:1600, 1:3200, 1:4800, 1:600, что свидетельствуют о наличии у этих штаммов общего видоспецифического антигена. Такой же вывод можно сделать, изучая результаты РА, зарегистрированные при взаимодействии сыворотки, полученной на штамм № 4, с антигенами, приготовленными из штаммов № 1, 2, 3, 5, 19. Титры сыворотки при этом были соответственно равны 1:1600, 1:3200, 1:3200, 1:400 и 1:1600.

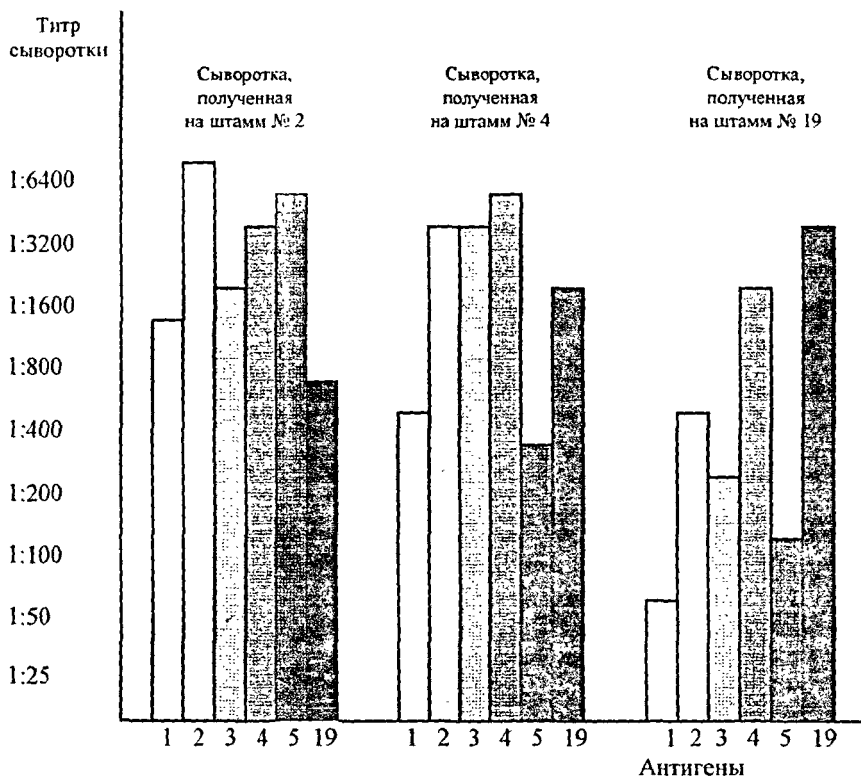


Рис. 1 Сравнительное изучение активности лиофилизированных сывороток против *Vibrio anguillarum* в пробирочной РА с антигенами, изготовленными из культуры *Vibrio anguillarum* № 1, 2, 3, 4, 5 и 19.

Результаты исследования сыворотки, полученной на штамм 19, с антигенами, приготовленными из штаммов 1, 2, 3, 4, 5, также подтверждают наличие антигенного родства между этими штаммами. Титр сыворотки в реакции с антигеном из штамма № 1 составил 1:50; с антигеном из штамма № 2 - 1:400; с антигеном из штамма № 3 - 1:200; с антигеном из штамма № 4 - 1:1600; с антигеном из штамма № 5 - 1:100.

Сравнение результатов, полученных при исследовании нативных и лиофилизированных сывороток не позволило установить различия в их активности и, таким образом, явилось основанием для вывода о том, что процесс лиофилизации не снижает активности агглютинирующих сывороток против *Vibrio anguillarum*.

3.4. ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ПРОТИВ *Vibrio anguillarum*

О специфичности опытных сывороток судили по результатам исследования их в РА на стекле и в пробирках с культурами штаммов различной видовой и родовой принадлежности и приготовленными из них антигенами.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности агглютинирующих сывороток, полученных на культуры штаммов в № 2, 4, 19. В РА на стекле сыворотки в разведении 1:40 полностью агглютинировали двухсуточные культуры штаммов № 2, 4, 19. В тоже время при исследовании культур вибрионов видов *alginalyticus*, *salmonicida*, *vulnificus*, *damsella*, *splendidas*, *diazotrophicus*, *cambelii*, *pelagius*, а также культур бактерий рода *Aeromonas* видов *hydrophila*, *anaerogenes*, *salmonicida*, рода *Pseudomonas* видов *aeruginosa*, *alcaligenes*, *Salmonella enteritidis* и *Escherichia coli*, с теми же сыворотками в тех же разведениях положительных результатов не зарегистрировали. С нормальной кроличьей сывороткой, разведенной 1:20, и физиологическим раствором антигены также не давали положительной реакции.

Вывод о высокой видовой специфичности сывороток, полученных на штаммы № 2, 4, вытекающий из настоящего опыта, подтвержден отрицательными результатами исследования этих сывороток в РА на стекле с живыми культурами *Aeromonas hydrophila* и *Vibrio parahaemolyticus*, проведенного в АЗНИИРХе зав. сектором микробиологии Бермант М.В.

Сыворотки были также исследованы с отрицательным результатом в РА на стекле с 10 живыми культурами разных штаммов *V. cholerae* 01; 10 культурами штаммов *Vibrio-Nag* и пятью культурами бактерий рода *Aeromonas*. Работа выполнялась на базе Центральной противочумной станции г.Москвы зав. лабора-

торным отделением Огневой Н.С., врачами Милютинной Л.Б. и Гусевым В.В. Сотрудником Ленинградской областной ветеринарной лаборатории Хабаровой Е.А. получен отрицательный результат при исследовании сывороток с культурой штамма *Vibrio parahaemolyticus*, выделенной от радужной форели в рыбколхозе "Им. В.И.Ленина".

При взаимодействии сывороток в РА на стекле с живой культурой *A. salmonicida*, выделенной нами в 1994 году от камбалы в экономзоне Балтийского моря, и в пробирочной РА с приготовленным из этой культуры антигеном были зарегистрированы отрицательные результаты.

Результаты изучения активности и специфичности агглютинирующих сывороток позволили дать им предварительную положительную оценку в плане применения для идентификации бактерий *Vibrio anguillarum*.

3.5. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУЛЬТУР ПОЛЕВЫХ ШТАММОВ ВИБРИОНОВ

Для окончательного ответа на вопрос о возможности практического применения агглютинирующих сывороток нами была выполнена работа по выделению возбудителя вибриоза от рыб, культивируемых в Черноморском и Балтийском бассейнах и, таким образом, по изучению распространенности вибриоза в этих регионах.

В процессе работы на Большом Утрише в Анапском районе Краснодарского края от радужной форели и стальноголового лосося, культивируемых в пресной и соленой водах, при бактериологическом исследовании были выделены соответственно 52 и 24 культуры, отнесенные по результатам изучения культуральных и морфологических свойств к вибрионам.

В Латвии в рыбколхозе "Банга" от радужной форели, выращиваемой в садках в Рижском заливе, было выделено 90 культур вибрионов. Также в Балтийском регионе в форелевом питомнике "Камышевка" рыбколхоза "Им. В.И.Ленина" и на форелевом участке "Кирпа" от радужной форели, культивируемой в понтонных садках в Финском заливе, было выделено соответственно 11 и 27 культур, отнесенных при первичном исследовании к вибрионам.

При исследовании в РА на стекле все выделенные культуры агглютинировались сыворотками, полученными на штаммы №2, 4, 19 в разведении 1:50.

Результаты исследования данных культур в пробирочной РА показали, что все выделенные культуры давали положительную РА с каждой из испытуемых сывороток, причем, в достаточно высоких разведениях. Так, сыворотка, полученная на штамм № 2, агглютиновала 4,4% культур в титре 1:100 - 1:200; 29,7% - в титре 1:400; 49,5% - в титре 1:800; 12,2% - в титре 1:1600; 3,9% - в титре 1:3200, 1,9% - в титре 1:6400.

Сыворотка, полученная на штамм № 4 была также активна. Она агглюти-

нировала 2% культур в титре 1:100 - 1:200; 23,5% - в титре 1:400; 52% - в титре 1:800; 13,2% - в титре 1:1600; 4,4% - в титре 1:3200; 3,9% - в титре 1:6400.

Сыворотка, полученная на культуру штамма № 19, агглютинировала 4,9% культур в титре 1:100 - 1:200; 47% - в титре 1:400; 31,3% - в титре 1:800; 11,7% - в титре 1:1600; 4,9% - в титре 1:3200. Таким образом, эта сыворотка обладала наименьшей активностью. Однако, культуры вибрионов, давшие положительную реакцию с сыворотками, полученными на штаммы № 2 и 4 в титре 1:100 - 1:200, данной сывороткой агглютинировались при разведении её 1:800 - 1:1600 с оценкой не меньше, чем на 3 креста.

С учетом этих результатов нами была приготовлена серия лиофилизированной агглютинирующей сыворотки с использованием для гипериммунизации кроликов смеси равных количеств культур штаммов № 2 и 19. Изготовление антигенов, схема гипериммунизации кроликов, дозы микробных клеток и объем вводимой суспензии оставались такими же как и при получении моноштамменных сывороток. С той лишь разницей, что приготовленные суспензии инактивированных культур вибрионов штаммов № 2 и 19 с концентрацией 5 млрд микробных клеток в 1 см³ перед введением кроликам смешивали в равных объемах.

Приготовленную таким образом сыворотку исследовали в сравнении с моноштамменными сыворотками в пробирочной РА с антигенами из штаммов № 2, 4, 19 (рис. 2).

Из материалов гистограммы, представленной на рисунке 2, видно, что сыворотка, полученная на смесь культур штаммов №2 и 19 агглютинирует антигены, приготовленные из штаммов №2, 4, 19, соответственно в титрах от 1:6400, 1:3200 и 1:3200, то есть практически в тех же титрах, в которых с этими антигенами работают гомологичные сыворотки. Причем, необходимо отметить, что в перекрестной РА моноштамменные сыворотки работают с данными антигенами в более низких титрах. Так, сыворотка, полученная на штамм № 2 агглютинировала антигены, приготовленные из штаммов № 4 и 19 в титрах 1:3200 и 1:1600; сыворотка, полученная на штамм № 4 агглютинировала антигены, приготовленные из штаммов № 2 и 19 в титрах 1:3200 и 1:1600; а сыворотка, полученная на штамм № 19 агглютинировала антигены, приготовленные из штаммов № 2 и 4 в титрах 1:400 и 1:1600. Анализ этих данных позволил предположить, что для идентификации культур штаммов вида *anguillagum* лучше использовать не несколько моноштамменных сывороток, а одну сыворотку, полученную на смесь культур штаммов № 2 и 19. Для подтверждения этого предположения было проведено исследование антигенов, приготовленных из культур полевых штаммов, в пробирочной РА с сывороткой, полученной на штаммы №2 и 19 (таблица 2). Для сравнения в таблицу включены результаты исследования этих же антигенов в пробирочной РА с моноштамменными сыворотками.

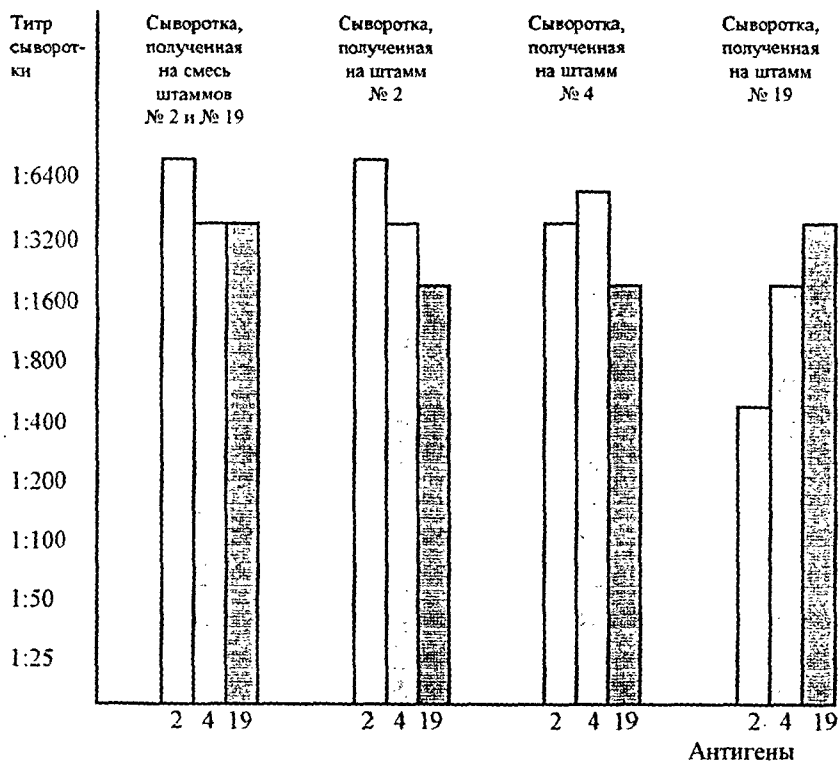


Рис. 2. Сравнительное изучение активности сыворотки, полученной на смесь штаммов *Vibrio anguillarum* № 2 и 19, с моноштаммными сыворотками в пробирочной РА с вибриозными антигенами.

Согласно табличным данным сыворотка, полученная на смесь культур штаммов № 2 и 19, агглютинирует 1,4% антигенов в титре 1:100 - 1:200; 2С,5% - в титре 1:400; 54,9% - в титре 1:800; 16,1% - в титре 1:1600; 4,9% - в титре 1:3200; 1,9% - в титре 1:6400. При этом нужно отметить, что большая часть антигенов 77,8% давала положительную реакцию с сывороткой в титрах от 1:800 до 1:6400, а сыворотки, полученные на штаммы №2, 4, 19 агглютинировали в таких титрах соответственно 67,5%, 73,5% и 47,9% антигенов.

Вышеизложенные результаты позволили сделать вывод, что для идентификации вибрионов вида *anguillarum* целесообразно применять сыворотку, полученную на смесь культур штаммов № 2 и 19, а не моноштамменные сыворотки. Кроме того, они послужили основанием для идентификации всех исследованных полевых культур, как бактерий *Vibrio anguillarum* и, вытекающего отсюда вывода, что бактерии *Vibrio anguillarum*, выделенные от радужной форели и стальноголового лосося в Черноморском бассейне и от радужной форели в Балтийском бассейне имеют общий видоспецифичный антиген. Эти результаты позволили также установить, что рабочий титр сыворотки, полученной на смесь культур штаммов *Vibrio anguillarum* № 2 и 19 с предельным титром 1:3200 - 1:6400, при идентификации вибрионов в пробирочной РА составляет 1:50 оценкой агглютинации не меньше чем на 3 креста.

3.6. ИЗУЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КУЛЬТУР ПОЛЕВЫХ ШТАММОВ ВИБРИОНОВ, ОТНЕСЕННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ К ВИДУ *anguillarum*

В целом, результаты исследования культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств культур полевых штаммов позволили отнести их к *Vibrio anguillarum* и, таким образом, они полностью согласуются и подтверждают результаты серологической идентификации этих культур. Кроме того, полученные результаты позволили подразделить исследуемые штаммы на биотипы. Так как, в отличие от большинства полевых штаммов, выделенные от радужной форели и стальноголового лосося на Большом Утрише соответственно 3 и 4 культуры, а также - от радужной форели в рыбколхозе "Банга" и на участке "Кирпа" 5 и 2 культуры, росли на МПА, не содержащем хлорид натрия и не обладали способностью к индолообразованию при культивировании на переваре Хоттингера. Согласно результатам исследования из 52 и 24 культур *Vibrio anguillarum*, выделенных от радужной форели и стальноголового лосося на Большом Утрише, соответственно 94,3% и 83,3% культур были отнесены к биотипу А, а 5,7% и 16,7% к биотипу С. От радужной форели в рыбколхозе "Банга" было выделено 90 культур возбудителя вибриоза рыб, 94,4% которых типировали как биотип А, а 5,6% - как биотип С.

Результаты сравнительного изучения в пробирочной РА активности моноштамменных агглютинирующих сывороток и сыворотки, полученной на смесь культур штаммов № 2 и № 19.

Сыворотка, полученная на штамм №	Кол-во идентифицированных культур	Культуры, давшие положительную реакцию (кол-во/%)					
		1:100-1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
2	204	9/4,4	57/27,9	101/49,5	25/12,2	8/3,9	4/1,9
4	204	4/2	48/23,5	107/52,0	27/13,2	9/4,4	8/3,9
19	204	10/4,9	96/47,0	64/31,3	24/11,7	10/4,9	0
2, 19	204	3/1,4	42/20,5	112/54,9	33/16,1	10/4,9	4/1,9

Все 11 культур, выделенных от радужной форели в питомнике “Камышевка” были представлены биотипом А. Из 27 культур, выделенных от рыб форелевого участка “Кирпа,” 93,1% типировали как биотип А, а 7,4% - как биотип С. Общее количество выделенных культур *Vibrio anguillarum* составило 204. Из них 93,1% были отнесены к биотипу А, а 6,9% - к биотипу С.

Результаты биотипирования послужили основанием для вывода о том, что радужная форель и стальноголового лосося в Черноморском бассейне и радужная форель в Балтийском бассейне чаще всего инфицированы культурой *Vibrio anguillarum* биотипа А. Гораздо реже от рыб выделяют культуры вибрионов данного вида биотипа С.

4. ВЫВОДЫ

1. Бактерии *Vibrio anguillarum*, выделенные из патологического материала от радужной форели и стальноголового лосося в Черноморском бассейне и от радужной форели в Балтийском бассейне имеют общий видоспецифичный антиген.

2. Гипериммунизация кроликов культурами штаммов № 2, 4 и 19 позволяет получать высокоактивные специфичные сыворотки для идентификации в пластинчатой и пробирочной РА вибрионов вида *anguillarum* биотипов А и С.

3. Для идентификации бактерий *Vibrio anguillarum* в пластинчатой (ориентировочной) и пробирочной РА целесообразно применять агглютинирующую сыворотку, полученную на смесь культур *Vibrio anguillarum* штаммов № 2 и 19, а не моноштаммные агглютинирующие сыворотки.

4. Рабочий титр сыворотки, полученной на культуры *Vibrio anguillarum* штаммов № 2 и 19, в пробирочной РА для идентификации культур вибрионов составляет 1:50 с оценкой агглютинации не менее чем на три креста.

5. Активность агглютинирующих сывороток, полученных на культуры вибрионов вида *anguillarum*, не снижается в процессе их лиофилизации.

6. Радужная форель и стальноголового лосося, культивируемые в Черноморском бассейне и радужная форель, выращиваемая в Балтийском бассейне чаще всего инфицированы культурой *Vibrio anguillarum* биотипа А и реже - биотипа С.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического применения предложена “Сыворотка агглютинирующая против Вибрио ангвилярум”. Сыворотка применяется для идентификации культур вибрионов вида *anguillarum* в пластинчатой (ориентировочной) и пробирочной РА, для контроля активности антигена эритроцитарного для диагностики вибриоза рыб и контроля антигенной активности культур штаммов *Vibrio anguillarum* при изготовлении вакцины бивалентной инактивированной против вибриоза рыб.

Разработаны:

1. Технические условия “Сыворотка агглютинирующая против Вибрио ангвилярум” № 9384-001-00008064-98 - утверждены 23 декабря 1997 года директо-

ром ВГНКИ А.Н.Паниным, 24 декабря 1997 года зам. директора ВНИРО Б.Н.Котеневым и согласованы 8 января 1998 года с зам. начальника Департамента ветеринарии В.В.Селиверстовым.

2. Временная инструкция по изготовлению и контролю сыворотки агглютинирующей против Вибрио ангвиллярум - утверждена 23 декабря 1997 года директором ВГНКИ А.Н.Паниным, 24 декабря 1997 года зам. директора ВНИРО Б.Н.Котеневым.

3. Временное наставление по применению сыворотки агглютинирующей против Вибрио ангвиллярум № 13-7-2/189 - утверждено 8 января 1998 года зам. начальника Департамента ветеринарии В.В.Селиверстовым.

6. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Безгачина Т.В. Применение реакции агглютинации в диагностике вибриоза лососевых рыб // Тезисы докладов I Всесоюзного совещания морских гидробионтов. Большой Утриш, сентябрь 1986.-М.-1986.- С. 3-4.

2. Безгачина Т.В.О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* № 4// Тезисы докладов I Всесоюзного совещания морских гидробионтов. Большой Утриш, сентябрь 1986.-М.-1986.- С. 4-5.

3. Безгачина Т.В. Агглютинирующая сыворотка для идентификации возбудителя вибриоза лососевых рыб.// Тезисы докладов V Всесоюзного симпозиума по инфекционным болезням лососевых рыб. "Профилактика лечения и диагностика инфекционных болезней рыб". - М.- 1986.- С.10-11.

4. К вопросу серологической диагностики вибриоза лососевых рыб. /Безгачина Т.В., Радин И.Д., Ыун А.И., Кязри М.К., Шумилов К.В., Бондаренко В.З., Климанов А.И.// Сб. Научных трудов. Паразиты и болезни морских гидробионтов. - Мурманск - 1987. - С.30-39.

5. Безгачина Т.В., Радин И.Д., Бондаренко В.З. Гипериммунная сыворотка кроликов для серодиагностики вибриоза лососевых.// Журн. Рыбное хозяйство.- 1989.- № 3. С.38-39.

6. Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. Диагностика вибриоза лососевых рыб в Черноморском регионе России.//Сб. Докладов Всероссийского совещания 1-4 августа 1995 года. Мурманск. Проблемы выращивания лососевых рыб в России.- Мурманск: Изд. ПИНРО.- 1995.- С. 75-77.

7. Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. Испытание антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* на специфичность для диагностики вибриоза лососевых рыб.// Сб. Докладов Всероссийского совещания 1-4 августа 1995 года. Мурманск. Проблемы выращивания лососевых рыб в России.- Мурманск: Изд. ПИНРО.- 1995.- С. 77-79.

8. Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. Идентификация возбудителей "тепловодного" и "холодноводного" вибриоза стальноголового лосося, культивируемого в Черноморском регионе на побережье Северного Кавказа в условиях ухудшения экологической среды.// Тезисы докладов Между-

народного симпозиума по марикультуре. Сентябрь, 24-27. 1995. Краснодар, п. Небуг. Россия.- М.: Изд. ВНИРО.- 1995.- С.15-16.

9. Безгачина Т.В. О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio salmonicida*, используемого при получении агглютинирующей сыворотки для диагностики болезни “Хитра” лососевых рыб в Черноморском регионе страны. //Тезисы докладов Международного симпозиума “Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре”, октябрь, 21-24. 1996. Адлер, Россия- Краснодар.- 1996.- С.38.

10. Безгачина Т. В. Испытание на активность и специфичность агглютинирующей сыворотки для идентификации бактерий *Vibrio salmonicida*, выделенной от стальноголового лосося в Черноморском регионе России. // Материалы совещания “Состояние и перспектива научно-практических разработок в области марикультуры России”. Ростов-на-Дону август, 1996.- М.: Изд. ВНИРО.- 1996.- С. 25-28.

11. Безгачина Т. В., Шумилов К.В. Идентификация возбудителя вибриоза - бактерии *Vibrio anguillarum* от радужной форели при выращивании ее на пресной воде в Балтийском регионе. // Информ. бюллетень “Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии”. МИК, РАСХН, ЦПС. - М.: 1997.- С. 41-42.

12. Безгачина Т.В., Бродинова Н.С. Выделение возбудителя фурункулеза *Aeromonas salmonicida* от балтийской камбалы. // Информ. бюллетень “Итоги научно-практических работ в ихтиопатологии”. МИК, РАСХН, ЦПС. - М.: 1997.- С. 40-41.

13. Пученкова С.Г., Безгачина Т.В. Биологические свойства ихтиопатологических аэромонад, выделенных от культивируемых рыб. // Сб. научных докладов Всесоюзной конференции “Научно-технические проблемы марикультуры в стране”. - Владивосток.- 1989.- С. 184-185.

14. Пученкова С.Г., Безгачина Т.В. Выделение потенциальных патогенов от больных и здоровых рыб, выращиваемых в Черном море у берегов Северного Кавказа. // Тезисы докладов 1X Всесоюзного совещания по паразитам и болезням рыб. - Петрозаводск, март 1991. - Л.- 1990.- С 107-108.

15. Пученкова С.Г., Безгачина Т.В. Аэромонадная инфекция у культивируемых рыб. // Журнал “Рыбное хозяйство”. - 1991. № 12.- С. 68.

16. Пученкова С.Г., Безгачина Т.В. Болезнь стальноголового лосося аэромондной этиологии. // Журнал “Ветеринария”. - 1991.- № 5.- С. 33-35.

17. Штамм бактерии *Vibrio anguillarum*, используемый для получения вакцины против вибриоза рыб. /Радин И.Д., Безгачина Т.В., Карягин В.В., Спешиллов Л.И., Грибанова Г.Н., Бондаренко В.З., Шумилов К.В., Ниязов У.Э., Климанов А.И., Шихалеева Н.А. // Авторское свидетельство № 1646292.- 3.01.1991.

18. Способ получения сухой агглютинирующей сыворотки для диагностики вибриоза лососевых рыб. / Шумилов К.В., Бондаренко В.З., Климанов

А.И., Томашевская Н.А., Радин И.Д., Безгачина Т.В., Ыун А.И., Кязри М.К. // Авторское свидетельство № 1268172.- 8.07.1986.

19. Bezgachina T.V., Shumilov K.V. Isolation of bacteria *Vibrio anguillarum* as vibriosis inducer from rainbow trout grown at freshwater farms in the Baltic Sea region. // Abstract book VIth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" European Association of Fish Pathologists. Edinburgh Conference Centre Heriot - Watt University - 1997.- P. 71.

Теря

формат 60 х 84 I/I6 Подписано к печати 17/II-98г. Тираж 100
Объем - 1,25 п.л. Заказ 28

ВНИРО, 107140, Москва, В. Красносельская, 17