



005010335

На правах рукописи

Кирилл Владимирович

ГАВРИЛИН
Кирилл Владимирович

ПРОТОЗОЙНО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ
БОЛЕЗНИ ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ И МЕРЫ БОРЬБЫ С НИМИ

03.02.11 – паразитология

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

9 ФЕВ 2012

Москва – 2012

Работа выполнена в ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина» Россельхозакадемии

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Горохов Владимир Васильевич

доктор биологических наук
Жохов Александр Евгеньевич

доктор биологических наук, профессор
Григорьева Галина Ивановна

Ведущая организация: ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства»

Защита состоится «14» марта 2012 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.011.01 при ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина» Россельхозакадемии (ГНУ «ВИГИС» Россельхозакадемии)

по адресу: 117218, Москва, ул. Большая Черемушкинская, д. 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «ВИГИС».

Автореферат размещен на официальном сайте ВАК РФ.

Автореферат разослан «27» февраля 2012 г.

Ученый секретарь Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
доктор биологических наук, профессор



Бережко В.К.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Мировая аквакультура является одной из наиболее быстро развивающихся отраслей сельскохозяйственного производства. По данным Федерального агентства по рыболовству (www.fish.gov.ru) ежегодный прирост валовой продукции составляет в среднем около 10,6%. При этом аквакультура не ограничивается только производством продуктов питания. Она выполняет еще целый ряд важнейших функций, таких как рекреационная, декоративная и исследовательская. Декоративное рыбоводство является высокорентабельным сегментом мировой аквакультуры и обладает высокой экономической и, как следствие, социальной значимостью. Например, только в аквакультуре Малайзии за год выращивается 800 миллионов экземпляров аквариумных рыб на сумму 2,7 миллиардов рублей при уровне рентабельности предприятий до 60%.

В настоящее время неуклонное развитие аквакультуры обеспечивается внедрением высокоинтенсивных методов выращивания рыб. При этом они обуславливают резкий рост эпизоотической значимости условно-патогенных возбудителей, появление ранее неописанных инфекционных и инвазионных агентов. Кроме того, в последние годы возникли проблемы, связанные с интенсивным трансграничным обменом гидробионтами. Он приводит к контакту паразитов с ранее несвойственными им хозяевами и формированию паразитарных систем нехарактерных для данного региона и конкретного рыбоводного предприятия. Поэтому закономерно повышение требований к пониманию механизмов возникновения и развития заболеваний культивируемых гидробионтов и обеспечению их контроля.

С этой точки зрения ассоциативные заболевания относятся к актуальным, но малоизученным аспектам охраны здоровья рыб. Контроль этих опасных патологий связан с рядом принципиальных трудностей. Слабо изучены механизмы формирования и развития ассоциативных инвазий и инфекций. Имеются сложности в диагностике этих заболеваний. Они объясняются необходимостью комплексного использования паразитологических и микробиологических методов исследований. Терапия ассоциативных заболеваний затруднена различным уровнем чувствительности к лекарственным препаратам филогенетически удаленных друг от друга групп паразитов.

Цель и задачи исследований. Предметом настоящего исследования были протозойно-бактериальные заболевания рыб. Данная работа выполнена с целью изучения паразитарно-бактериального паразитоценоза и его взаимодействия с организмом хозяина. На основе полученных эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, характеризующих рассматриваемый тип патологий - создание и внедрение в рыбоводную практику методов диагностики, профилактики и терапии ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Изучить распространенность протозойно-бактериальных заболеваний и определить их место в структуре заразных патологий рыб. Описать механизмы формирования эпизоотической обстановки по паразитарным болезням рыб в декоративной аквакультуре РФ.

- Выявить основные группы протозойных и бактериальных возбудителей, участвующих в формировании ассоциативных заболеваний, описать их экологические особенности в условиях замкнутых аквасистем.

- Исследовать механизмы развития различных типов протозойно-бактериальных заболеваний путем изучения взаимодействия протозойно-бактериального паразитоценоза с организмом рыбы и окружающей средой. Описать развивающиеся клинические и патолого-анатомические изменения.

- Разработать методы профилактики протозойно-бактериальных заболеваний рыб на стадии их перевозки и карантинирования.

- Осуществить скрининг антипротозойных и антибактериальных субстанций для создания комплексных антипротозойно-бактериальных препаратов.

- Разработать прототипы антипротозойно-бактериальных препаратов с различным позиционированием.

- Провести экспертизу соотношения потенциальной пользы к рискам при их применении.

Научная новизна. Получены новые данные по механизмам формирования ассоциативных протозойно-бактериальных болезней рыб, оценена их эпизоотическая значимость в различных регионах – импортерах рыб и роль в формировании обстановки по заразным болезням рыб на территории РФ. Впервые осуществлен мониторинг антибиотикочувствительности наиболее распространенных групп бактериальных патогенов рыб. Разработаны и внедрены в рыбоводную практику первые в РФ комплексные антипаразитарно-бактериальные препараты. Даны рекомендации по использованию иммуномодулирующих препаратов, анестетиков и антиоксидантов для профилактики заразных патологий рыб. Разработаны нормативные документы регламентирующие проведение комплекса терапевтических, профилактических и карантинных мероприятий, обеспечивающих поступление в розничную торговую сеть здоровых гидробионтов.

Теоретическая и практическая значимость. Исследование паразитарно-бактериальных паразитоценозов является вкладом в изучение водных паразитарных систем и в развитие паразитологии и микробиологии. Изучение нового типа патологий рыб повысило имеющийся научно-практический потенциал, обеспечивающий нормальное функционирование предприятий аквакультуры. Разработанные методы и средства управления паразитарными системами в искусственных аквасистемах были апробированы и успешно используются в ряде отечественных предприятий декоративной аквакультуры.

Внедрение результатов исследований. Проведенные исследования легли в основу Инструкций по применению, стандартов организации (СТО) и

формирования отчетов по доклиническим и ветеринарным исследованиям препаратов «Антибак ПРО» и «Ихтиовит Антибак». Номера регистрационных свидетельств: ПВР - 2-5.6/01759 от 14 ноября 2006 г., учетная серия 77/32-2-5.6-1091; ПВР - 2-8.7/02054 от 21 декабря 2007 г., учетная серия 77/32-2-8.7-2098.

На основании проведенных исследований разработаны «Методические рекомендации по борьбе с эктопротозойно-бактериальными заболеваниями пресноводных декоративных рыб», одобренные секцией «Инвазионные болезни животных» РАСХН 25 сентября 2008 г.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на XV, XVI, XVII Международных ветеринарных конгрессах (2007, 2008, 2009 г.г., Москва); IV, VI, VII научно-практических конференциях «Аквариум, как средство познания мира» (2007, 2009, 2010 г.г., Москва); секции «Инвазионные болезни животных» РАСХН (2008 г., Москва); Всероссийской научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (2008, 2010 г.г., Москва); Международной паразитологической конференции «Проблемы ихтиопатологии в начале XXI века» (2009 г., С. Петербург); Научно-консультативном совете по болезням рыб ФГУ «Межведомственная ихтиологическая комиссия» и Секции патологии рыб и охраны гидробионтов Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2009 г., Москва); III международной научной конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб» (2011 г., п. Борок, Ярославская область).

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 32 печатных работах, из них 17 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертаций. В опубликованных работах представлены материалы и выводы настоящей работы.

Личный вклад соискателя. Автор лично проводил исследования, результаты которых изложены в настоящей диссертации. Работы по сбору первичных эпизоотологических данных проведены совместно с главным ихтиопатологом ООО «Аргус» Мамыкиной Г.А. Исследование безопасности «Антибак ПРО» проведено совместно с научным сотрудником ГНУ «ВИГИС», к.в.н. Ершовой Т.А. Ряд иммунологических исследований осуществлен совместно с сотрудниками Института биологии внутренних вод РАН им. И.Д. Папанина: заведующим лабораторией иммунологии к.б.н. Микряковым Д.В., старшим научным сотрудником, к.б.н. Силкиной Н.И., аспирантом Суворовой Т.А.

Автор выражает благодарность за научно-консультативную и техническую поддержку в проведении исследований руководству ГНУ «ВИГИС»: директору института, член-корреспонденту РАСХН, профессору Успенскому А.В., заместителю директора по научной работе, профессору Архипову И.А.; руководству ООО «НВЦ Агроветзащита»: генеральному директору, д.в.н., профессору Енгашеву С.В., заместителю генерального директора по вопросам аквакультуры, к.в.н. Енгашеву В.Г.; трудовому

коллективу ООО «Рыбколхоз им. И.В. Абрамова» и особо генеральному директору Ершову А.Л., ихтиопатологу Воробьеву Н.А.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Значительная часть протозойных инвазий рыб протекает в форме ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний, которые занимают одно из ведущих мест в структуре заразных патологий рыб.

2. В основе механизмов формирования протозойно-бактериальных заболеваний лежит разрушение защитных барьеров макроорганизма паразитическими простейшими, нарастание численности и вирулентности условно-патогенных микроорганизмов, подавление иммунитета, что приводит к развитию системной бактериальной инфекции и гибели рыбы.

3. Ущерб от протозойно-бактериальных заболеваний, приходящийся в настоящий момент на декоративную аквакультуру, обусловлен факторами, препятствующими сохранению динамического равновесия в системе паразит – хозяин и высоким уровнем стресса у импортируемых гидробионтов.

4. Лечение протозойно-бактериальных заболеваний с использованием комплексных антипротозойно-бактериальных препаратов существенно превосходит по терапевтической и экономической эффективности антипротозойную и антибактериальную монотерапии.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 343 страницах компьютерного текста, содержит нижеследующие разделы: введение, обзор литературы, выбор направления исследований, материалы и методы, собственные исследования, заключение, выводы, список литературы. В работе представлены 64 таблицы и 17 рисунков (графики, диаграммы, фотографии, микрофотографии, картограмма). Список литературы включает в себя 253 источника, в том числе 69 иностранных. Работа имеет приложения на 24 страницах.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

«Ассоциативные болезни рыб и методы их терапии»

В разделе представлены материалы по ассоциативным болезням рыб и других животных, описаны механизмы их формирования и развития. Рассмотрены основные группы протозойных и бактериальных патогенов, участвующие в развитии рассматриваемого типа патологий. Описаны методы и средства борьбы с протозойными инвазиями и бактериальными инфекциями рыб.

3. ВЫБОР НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Раздел посвящен разработке гипотетической модели формирования и развития протозойно-бактериальных заболеваний рыб. С этой целью рассматривается воздействие членов паразитарно-бактериального паразитоценоза на организм рыбы, обсуждаются причины летальных исходов при протозойных инвазиях.

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в период с 2004 по 2011 г.г. в лаборатории экспериментальной терапии ГНУ «ВИГИС» (г. Москва). Материал для исследований собран в лаборатории «Московской ветеринарной ихтиопатологической клиники» при ООО «НВЦ Агроветзащита» (г. Москва), в ЗАО «Аква-Лого» (г. Москва), в ООО «Аргус» (г. Лыткарино, Московской области), в ФГУП «Нацрыбресурс» (г. Москва), в ООО «Аквариум Экзотик Фиш» (г. Москва) и в ООО «Рыбколхоз им. И.В. Абрамова» (г. Семикаракорск, Ростовской области).

4.1 Эпизоотологические методы исследований. Проводили ихтиопатологическое исследование партий рыб поступающих в карантинные аквариальные комплексы. При анализе первичной информации использовали разработанные электронные формуляры (Microsoft Exel 2003).

Всего было обследовано 567 партий рыб (56401 экз.) из основных регионов экспортеров (Малайзии, Южного Китая, Сингапура и Индонезии) следующих видов: *Pangasius hypophthalmus*, *Corydoras gosseii*, *C. julii*, *C. melanotaenia*, *Pterygoplichthys gibbiceps*, *Poecilia velifera*, *Lebistes reticulatus*, *Cyprinus carpio* (декоративные карпы – кои), *Labeo frenatus*, *L. bicolor*, *Colisa lalia*, *Trichogaster trichopterus*, *T. leeri*, *Xiphophorus helleri*, *Botia macracantha*, *Paracheirodon innesi*, *Astronotus ocellatus*, *Pterophyllum scalare*, *Carassius auratus* (селекционные формы), *Barbus tetrazona*, *Cichlasoma sp.*, *Aristogramma casatuoides*, *A. elisabethae*. Также исследовано 38 партий (15200 экз.) *Poecilia sphenops* выращенных в аквариумных условиях на территории РФ и 47 партий (380 экз.) обыкновенного карпа (*Cyprinus carpio*), выращенного в прудах.

4.2 Клинические и патологоанатомические методы исследований. Ихтиопатологические исследования осуществляли согласно общепринятым методикам (Рекомендации, ... 1968). В ряде случаев проводили микроскопическое исследование компрессионных препаратов ткани почек, печени и селезенки.

4.3 Паразитологические методы исследований. При изучении протозойных инвазий изготавливали компрессионные препараты слизи с поверхности тела, жабр, слизистой оболочки кишечника, содержимого кишечника, экскрементов рыб и микроскопировали, используя микроскоп МИКМЕД-5 (ЛОМО, Россия). Результаты подсчета эктопаразитов выражали в экз./п.з.м. (среднее количество паразитов в поле зрения микроскопа при увеличении 180 раз, при просмотре 10-15 полей), а эндопаразитов экз. в 100 мкл материала или так же экз./п.з.м.

При необходимости использовали модифицированный (с применением анестетиков) метод прижизненного паразитологического исследования (Енгашев, 1975).

Определяли следующие характеризующие инвазию величины: экстенсивность (ЭИ) – процент особей в группе, у которых обнаружены паразиты, интенсивность (ИИ) – среднее количество

паразитов обнаруженных у пораженных особей, индекс обилия паразитов (ИО) – количество паразитов приходящихся на каждую особь в выборке.

Обнаруженных простейших идентифицировали до вида или до рода при помощи соответствующего определителя (Определитель..., 1984).

4.4 Микробиологические методы исследований. С 0,5 см² поверхности тела рыбы стерильным тампоном через гибкую пластиковую рамку брали соскоб. После отмытки тампона в стерильном физиологическом растворе делали высев 50 мкл на плотные питательные среды – МПА (ОАО им. И.И. Мечникова, Россия) или Standard method agar (Novamed, Израиль). Рыбу асептически вскрывали и иссекали 0,05-0,2 г материала печени, суспензировали в стерильном физиологическом растворе и делали высев по 50 мкл на плотные питательные среды Standard method agar и McConkey agar (Novamed, Израиль) или Эндо (HiMedia Laboratories, Индия). Для контроля стерильности кровь отбирали прижизненно из хвостовой вены. Затем по 200 мкл ее высевали на плотную питательную среду McConkey agar.

Результат представляли в виде КОЕ/см² (колониеобразующие единицы на 1 см² поверхности тела) или КОЕ/г (в 1 г печени), КОЕ/мл (в 1 мл крови).

При исследовании микробиоценоза кишечника рыб его содержимое после ряда 10-ти кратных разведений высевали по 50 мкл на плотные питательные среды Standard method agar и McConkey agar. Результат выражали в КОЕ/г первичного материала.

Пробы исследуемых кормов засевали на Standard method agar, McConkey agar, среду Сабуро (Novamed, Израиль). Общую оценку качества корма проводили согласно существующим нормативным документам (Ветеринарно-санитарные нормы..., 1997).

Изучение микробиоценозов воды проводили путем посева проб (50 мкл) на плотные питательные среды Standard method agar, McConkey agar, Pseudomonas agar (Novamed, Израиль).

Дальнейшую идентификацию микроорганизмов проводили путем изучения биохимических характеристик штамма при помощи дифференциально-диагностического агара Клиглера (Novamed, Израиль), тест-набора на цитохромоксидазу (НИЦФ, Россия), тест полосок на образование индола Indol Strips (Novamed, Израиль) и многофазной среды EnteroPlus (Novamed, Израиль). При необходимости проводили дополнительные тесты.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли согласно 9-му изданию Определителя бактерий Берджи (Определитель..., 1997).

Вирулентность выделенных штаммов аэромонад оценивали по ДНК-азной активности (Юхименко, Викторова, 1987) с использованием ДНК-азного агара с толудином синим (Novamed, Израиль). Способность бактериальных штаммов продуцировать гемолизины изучали на кровяном агаре (HiMedia Laboratories, Индия).

Исследования антибиогамм выделенных микроорганизмов проводили диско-диффузионным методом и методом серийных разведений в бульоне (микрометод) в соответствии с МУК 4.2.1890-04 (Методические указания...,

2004). При изучении антибиограмм использовали стандартные индикаторные диски с различными антибактериальными субстанциями (НИФЦ, Россия).

4.5 Гидрохимические методы исследований. Для исследования основных гидрохимических параметров использовали химические тест-системы (Tetra GmbH, Sera GmbH, Германия; Seachem, США). Содержание кислорода в воде измеряли термооксиметром марки ОКЦ 30Е (ИЧП Марина, Россия).

4.6 Иммунологические методы исследований. Бактерицидную активность сыворотки крови определяли с помощью фотонепелометрического колориметрирования согласно методике, описанной О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (Смирнова, Кузьмина, 1966) адаптированной для рыб (Микряков, 1991); показатель завершеного фагоцитоза согласно методическим указаниям (Методические указания..., 1987).

4.7 Токсикологические методы исследований. Изучение токсикологических характеристик разрабатываемых препаратов проводили на основании существующих методических рекомендаций (Хабриев и др., 2005).

Эксперименты по определению степени опасности препаратов для теплокровных животных (острой и субхронической токсичности) проводили на белых беспородных мышках. В желудок животным вводили препарат «Ихтиовит Антибак» с 2% крахмальным гелем, а «Антибак ПРО» - в виде водной суспензии, грызунам контрольных групп - гель без препарата. При изучении острой токсичности препараты вводили однократно (или дробно с небольшими интервалами), субхронической - двадцатикратно (20 дней подряд). Через 1 и 10 дней после отмены препарата, проводили определение гематологических (количество гемоглобина, г%; количество эритроцитов, 10^{12} клеток/л; и лейкоцитов, 10^9 клеток/л), биохимических (активность аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы, ммоль/час; количество общего белка, г/л) показателей и функционального состояния печени (Методические рекомендации..., 1986). В работе использовали автоматический биохимический анализатор Spectrum II (Abbot, США) с соответствующими тест-системами (Human, США).

При исследовании токсичности препарата «Антибак ПРО» для рыб использовали *Clarias gariepinus* и *Labeo frenatus*. При тестировании «Ихтиовит Антибак» использовали *Cyprinus carpio* (карпы кои), *Lebistes reticulatus*, *Trichogaster trichopterus* и *Cichlasoma sp.* Для изучения острой и субхронической токсичности рыбам с кормом вводили различные дозы «Антибак ПРО» (однократно и 20-тикратно в течение 20 дней). С этой же целью рыб помещали в растворы «Ихтиовит Антибак» различной концентрации (на 24 часа и 14 суток).

4.8 Методы оценки безопасности лекарственных препаратов для беспозвоночных гидробионтов и водных растений. В растворы «Ихтиовит Антибак» с концентрацией 25 мг/л и 50 мг/л на 14 дней помещали беспозвоночных животных *Planorbis vortex*, *Ampullaria australis*, *Melanoides*

tuberculata, молодь *Macrobrachium rosenbergii* и водные растения *Cryptocoryne* sp., *Echinodorus* sp. и *Nymphaea* sp. Результаты оценивали по выживаемости беспозвоночных и динамике прироста фитомассы растений.

4.9 Методы исследования стабильности лечебных водных растворов «Ихтиовит Антибак». В аквариумах с пресной и морской водой (изготовлена из концентрата) оснащенных аэраторами и 60 W лампами приготовили раствор «Ихтиовит Антибак» с концентрацией 25 мг/л. Из каждой емкости ежедневно проводили отборы проб лечебных растворов.

Определение концентрации ципрофлоксацина и метронидазола в лечебном растворе проводили методом ВЭЖХ на хроматографе «Waners» с спектрофотометрическим детектором. Определение концентрации этакридина лактата - методом спектрофотометрии.

Фактическое содержание действующих веществ сопоставляли с расчетным и на основании этого судили о стабильности лечебных водных растворов.

4.10 Методы клинических исследований лекарственных препаратов. Из спонтанно пораженных *Flexibacter* spp. *Barbus tetrazona*, *Hexamita* sp. *Colisa lalia*, комплексом патогенов (*Aeromonas hydrophila*, *Chilodonella* sp., *Hexamita* sp.) *Xiphophorus helleri* формировали опытные и контрольные группы. Рыб опытных групп подвергали лечению с использованием различных схем применения испытуемых препаратов. Рыб контрольных групп оставляли без лечения.

Производственные испытания препаратов проводили основываясь на ранее установленных оптимальных схемах их применения. Проведено лечение спонтанно возникших ассоциативных заболеваний рыб в рыбоводных предприятиях: ФГУП «Нацрыбресурс» (г. Москва); ЗАО «Аква-Лого» (г. Москва); ЗАО «Дискус-1» (г. Москва); УЗВ ФГУП «ВНИИПРХ» (п. Рыбное, Дмитровского р-на); ООО «СКАТ», (г. Москва); ООО «Аргус», (г. Москва); ООО «Натуралист» (г. Москва); ЗАО «Строй Спецсервис-96» (г. Москва).

4.11 Математические и статистические методы. Статистическую обработку данных, полученных в токсикологических опытах, проводили при помощи прикладной программы для ПК: «LD₁₆, LD₅₀, LD₈₄, LD₁₀₀ evaluation V.0.2» (НПП «Наука Плюс», Россия).

Корреляционный анализ проводили методом квадратов (Гланц, 1998).

При оценке достоверности наблюдаемого терапевтического эффекта использовали критерий χ^2 (Беленький, 1963).

Для статистической обработки данных, полученных при определении активности фагоцитоза (реакция завершеного фагоцитоза), использовали методику «Определение концентрации живых микроорганизмов путём их высева на плотные питательные среды» (Ашмарин, Воробьев, 1962).

Значимость различий между средними по исследуемым группам показателей оценивали при помощи t-критерия Стьюдента (Беленький, 1963) при уровне достоверности 95 и 99%.

При обработке данных использовали пакет прикладных программ для ПК Microsoft office Excel 2003.

Объем проведенных исследований. В ходе данной работы было подвергнуто клиническому осмотру более 71981 экз. рыб; патологоанатомическому исследованию - 960 особей; паразитологическому и микробиологическому исследованиям - 1960 и 1840 особей соответственно. Выделено и идентифицировано 5987 культур микроорганизмов; изучены антибиогаммы 728 культур. Иммунологические показатели определены в 260 пробах крови. В экспериментах с искусственным заражением ихтиофтириозом и аэромоназом использовано 378 особей рыб. При изучении токсикологических характеристик препаратов было использовано 278 мышей и 228 рыб. Предрегистрационные клинические исследования препаратов проведены на 2500 особях рыб различных видов.

5. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 Протозойно-бактериальные болезни рыб

5.1.1 Анализ ряда клинических случаев протозоозов рыб. В данном разделе рассмотрены случаи протозоозов, не поддающиеся лечению апробированными химиотерапевтическими средствами. Согласно информации, представленной на интернет – ресурсах (www.aqa.ru, www.1-aqua.ru, www.aqbest.ru и т.д.), такие патологии рыб имеют широкое распространение.

Комплексные исследования выявили поражение рыб одновременно простейшими и условно-патогенными для рыб микроорганизмами (УПМ). Установлено, что неудачи в проведении терапевтических мероприятий обусловлены вторичными бактериальными инфекциями, против которых применяемые антипротозойные средства неэффективны.

5.1.2 Распространенность ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний и их место в структуре инвазионных патологий рыб. Импорт служит основным источником (до 90%) поступления декоративных гидробионтов на отечественный рынок. В связи с этим, оценивали общую структуру заболеваемости рыб, завозимых из определенной страны - экспортера и выращиваемых на территории РФ (таблица 1).

Анализ эпизоотической ситуации в декоративной аквакультуре показывает, что патологии с участием представителей родов *Chilodonella*, *Trichodina*, *Ichthyophthirius*, *Costia*, *Cryptobia*, *Ariposoma*, *Trichophrya* имеют широкое распространение (в среднем 35,8% общего числа зарегистрированных случаев заразных патологий рыб). При этом в среднем 64,5% протозоозов протекает в форме протозойно-бактериальных заболеваний.

Ассоциативное поражение рыб вышеуказанными простейшими и бактериями (*Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Escherichia* spp., *Proteus* spp., *Flavobacterium* spp.) составляет, в среднем, 22,3% от всех случаев заразных патологий, занимая одну из ведущих позиций по частоте

встречаемости. Учитывая, что около 70% обследованных партий рыб являются носителями тех или иных паразитов, можно говорить о высокой эпизоотической значимости этого типа заболеваний. У прудовых карпов отмечено носительство единичных эктопаразитических инфузорий родов *Trichodina*, *Ichthyophthirius*, *Apiosoma* не ассоциированных с генерализованными бактериальными инфекциями.

Таблица 1. Распространенность основных типов заразных заболеваний декоративных рыб в зависимости от региона происхождения

Тип патологии	Встречаемость группы заболеваний, % от общего количества зарегистрированных заразных заболеваний				
	Малайзия	Китай	Сингапур	Индонезия	Выращивание на территории РФ
Протозоозы	23,2	30,3	12,9	8,3	-
Бактериозы	15,9	6,5	25,9	16,7	44,7
<i>Протозойно-бактериальные</i>	<i>15,9</i>	<i>43,5</i>	<i>20,4</i>	<i>13,3</i>	<i>18,4</i>
Моногеноидозы	13,7	4,4	5,6	15,3	2,6
Моногеноидозы осложненные бактериозами	-	-	5,6	11,7	-
Крустацеозы	8,7	-	-	-	-
Прочие заболевания и патологии неустановленной этиологии	22,6	15,3	29,6	34,7	34,3
<i>Заболевания с участием простейших</i>	<i>39,1</i>	<i>73,8</i>	<i>33,3</i>	<i>21,6</i>	<i>18,4</i>
<i>Протозоозы осложненные бактериозами, % случаев протозоозов</i>	<i>40,7</i>	<i>58,9</i>	<i>61,3</i>	<i>61,6</i>	<i>100,0</i>

Наиболее восприимчивы к этим заболеваниям оказались *Poecilia sphenops*, различные селекционные формы *Carassius auratus*, *Lebistes reticulatus* и *Pangasius hypophthalmus*. Всего из 24 массово обследованных видов декоративных рыб протозойно-бактериальные заболевания обнаружены у 23. Исключение составили представители семейства *Logisgaridae*, имеющие на поверхности тела массивные костяные пластины. Хотя отдельные спорадические случаи ассоциативных поражений наблюдали и у них.

При сравнении средних показателей смертности по всем исследованным группам при различных типах патологий установлено, что при бактериозах она составляла 12,4 % поголовья, при протозоозах 9,8%, при протозойно-бактериальных заболеваниях 21%. Для сравнения при микстинвазиях простейшие + моногены - 15,6 %.

В ходе проведенных исследований не удалось выявить таксоны простейших, превалирующие при ассоциативных заболеваниях. Исключение составили сидячие формы инфузорий, при паразитировании которых вторичные бактериальные осложнения развивались редко.

5.1.3 Механизм формирования ассоциативных заболеваний как результат комплексного воздействия паразитоценоза на организм рыбы. Учитывая то, что разрушение эктопаразитическими простейшими покровных тканей приводит к образованию большого количества клеточного детрита, рост количества паразитов, должен приводить к увеличению трофности рассматриваемой экологической ниши и возрастанию количества ее микробного населения. В связи с этим исследовали группы импортированных гидробионтов, спонтанно инвазированные различными экологическими типами простейших паразитов. *Costia* spp. представляла группу подвижных паразитов, использующих ткани рыб для прикрепления и питания. *Trichodina* spp. - подвижных паразитов, использующих рыбу для прикрепления. *Apiosoma* spp. - неподвижных паразитов, использующих рыбу для прикрепления. Значение коэффициентов корреляции между параметрами, характеризующими инвазию и обсемененность поверхности тела представлены в таблице 2.

Таблица 2. Значение коэффициентов корреляции между основными параметрами, характеризующими инвазию и бактериальную обсемененность поверхности тела рыб

Вид рыб	Паразит	Коэффициенты корреляции		
		ЭИ/КОЕ на см ²	ИИ/КОЕ на см ²	ИО/КОЕ на см ²
<i>Xiphophorus helleri</i>	<i>Costia</i> sp.	0,78±0,23	0,31±0,11	0,93±0,13*
<i>Poecilia velifera</i>	<i>Costia</i> sp.	0,86±0,19*	0,98±0,07*	0,75±0,25
<i>Xiphophorus helleri</i>	<i>Trichodina</i> sp.	0,99±0,05*	0,74±0,16	0,80±0,22**
<i>Poecilia velifera</i>	<i>Trichodina</i> sp.	0,97±0,09*	0,89±0,16*	0,99±0,05*
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Trichodina</i> sp.	0,76±0,07	0,71±0,12	0,72±0,7
<i>Xiphophorus helleri</i>	<i>Apiosoma</i> sp.	0,83±0,20**	0,77±0,24	0,92±0,14*
<i>Poecilia velifera</i>	<i>Apiosoma</i> sp.	0,84±0,20**	0,84±0,20**	0,71±0,26
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Apiosoma</i> sp.	0,69±0,19	0,64±0,08	0,68±0,11

Примечание: *- данные статистически достоверны (P<0,01), ** - данные статистически достоверны (P<0,05).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в большинстве случаев существует прямая сильная связь между инвазированностью рыб различными простейшими и количеством микроорганизмов на поверхности тела. Причем все три исследованных параметра достаточно информативны.

Обобщение значительного количества фактического материала позволило установить, что в норме микробиоценоз поверхности тела рыб представлен на 80% различными УПМ (*Aeromonas* spp., *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp.) и на 20% грампозитивной кокковой микрофлорой при общей обсемененности 6,6-11,3 КОЕ/см².

При развитии патологии качественные изменения в составе микробиоценоза характеризуются снижением доли грампозитивной микрофлоры до 4% и многократным повышением общей обсемененности. При этом можно наблюдать тенденции к росту видового разнообразия грамотрицательных микроорганизмов. Подвижные аэромонады и неферментирующие щелочеобразователи дополняются представителями семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Flavobacterium*. В условиях эвтрофикации экологической ниши преимущества получают бактерии, приспособленные к утилизации высокомолекулярной органики, а ими в водных биотопах являются преимущественно УПМ.

Дальнейший путь развития инфекции позволяет проследить сопоставление количественных и качественных характеристик микробиоценозов поверхности тела и печени рыб (таблица 3).

Таблица 3. Сравнительная характеристика микробиоценозов поверхности тела и печени рыб

Вид рыб	Микробиоценоз поверхности тела		Микробиоценоз печени	
	КОЕ/см ²	Состав	КОЕ/г	Состав
<i>Xiphophorus helleri</i>	9,3±3,0	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	0,0	-
<i>Poecilia velifera</i>	11,3±3,4	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	0,0	-
<i>Poecilia velifera</i>	31,6±3,2	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	0,0	-
<i>Poecilia velifera</i>	48,6±6,8	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp.	4,6±1,3	<i>Aeromonas</i> spp.
<i>Xiphophorus helleri</i>	54,0±7,3	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	3,8±1,9	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp.
<i>Xiphophorus helleri</i>	60,0±7,7	<i>Moraxella</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	100,0±10,0	<i>Moraxella</i> spp.
<i>Xiphophorus helleri</i>	98,6±9,9	<i>Moraxella</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp.	120,0±10,6	<i>Moraxella</i> spp.

Единичные микроорганизмы во внутренних органах появляются при выделении с поверхности тела рыбы от 48,6 до 54,0 КОЕ/см² (около 25000 КОЕ/мл слизи). Складываются благоприятные условия для развития

септического процесса по экзогенному пути, так как поврежденный простейшими эпителий непосредственно контактирует со слизью обильно обсемененной УПМ. После того как общее микробное число (ОМЧ) достигнет вышеуказанных величин между количеством микрофлоры на поверхности тела и в печени так же возникает прямая сильная связь (0,91±0,16). Во внутреннюю среду организма проникают преимущественно штаммы УПМ обладающие высоким уровнем продукции факторов агрессии. Так количество гемолитических штаммов в печени рыб было почти в два раза больше, чем среди бактерий, обнаруженных только на поверхности тела (46,6 и 28,3% соответственно).

При изучении динамики развития эктопротозойно-бактериальных заболеваний в экспериментальных условиях, объектами исследования служили: *Cichlasoma* sp. средней массой 14±2 г; *Carassius auratus* массой 36±5 г, *Cyprinus carpio* (обыкновенный карп) массой 24±1 г, по 60 особей каждого вида. Для экспериментального заражения выбрали инфузорию *Ichthyophthirius multifiliis*. Данные, характеризующие динамику развития заболевания, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Динамика развития протозойно-бактериального заболевания у различных видов рыб в экспериментальных условиях

Сутки	ЭИ, %	ИИ		Обсемененность поверхности тела, КОЕ/см ²	Обсемененность печени, КОЕ/г
		Количество трофонтов экз./рыба	Количество теронтов, экз. п.з.м.		
0	0,0	0,0	0,0	8,2±2,8	0,0
	0,0	0,0	0,0	11,4±3,0	0,0
	0,0	0,0	0,0	8,5±2,9	0,0
4	80,0	10,0±2,0	1,5±0,5	58,0±9,2	5,0±2,2
	80,0	12,0±3,0	1,0±0,5	64,4±8,0	7,0±2,6
	80,0	8,0±1,6	3,8±2,0	18,7±4,3	0,0
8	100,0	36,0±6,4	5,0±1,0	148,8±11,6	31,2±15,6
	100,0	41,0±6,6	6,0±1,5	150,2±12,6	29,2±4,4
	100,0	45,0±12,6	4,0±1,0	97,5±9,9	31,0±5,9
12	о-п	о-п	о-п	о-п	о-п
	100,0	120,0±18,4	11,5±4,0	400,2±29,0	196,0±11,8
	100,0	128,0±16,6	10,0±2,0	398,1±22,0	164,3±11,9
16	о-п	о-п	о-п	о-п	о-п
	100,0	290,0±24,8	9,5±4,5	412,0±20,3	536,0±23,2
	100,0	219,0±30,6	12,4±5,0	492,9±22,8	314,6±16,7

Примечание: данные по различным видам рыб представлены по строкам: первая строка - данные по *Cichlasoma* sp., вторая - по *Carassius auratus*, третья - по *Cyprinus carpio*; о-п - опыт прекращен во избежание не оправданной массовой гибели рыб.

Динамика численности трофонтов и теронтов ихтиофтириуса свидетельствовала о том, что длительность его жизненного цикла составляла

около 4 дней. К 8 дню наблюдения у отдельных особей появились признаки, характерные для бактериальных инфекций (гиперемия крупных сосудов на мордочках, кровоизлияния в плавниках). В ходе опытов, подтверждены ранее полученные результаты: на определенной стадии развития инвазия приводила к началу инфекционного процесса. При этом отмечена различная видовая чувствительность к ассоциативным заболеваниям. У *Cichlasoma* sp. и *Sarassius auratus* генерализованный септический процесс начинался при ЭИ - 80%, ИИ 10-12 паразитов на рыбе и обсемененности поверхности тела 58,0-64,4 КОЕ/см² (что хорошо согласуется с данными полученными на *Poecilia velifera* и *Xiphophorus helleri*). У *Cyprinus carpio* ниже: ЭИ - 100% и ИИ 45,0 паразитов и 97,5 КОЕ/см². Скорость увеличения обсемененности поверхности тела и печени у карпа была также ниже, чем у декоративных рыб. Низкая видовая чувствительность карпа, вместе со спецификой условий рыбоводных прудов (меньшая плотность популяции рыб, по сравнению с аквасистемами; более сложная и устойчивая экосистема; существенные колебания гидрологических и гидрохимических параметров), видимо и обуславливают низкую эпизоотическую значимость протозойно-бактериальных заболеваний в прудовом рыбоводстве.

В ходе экспериментов были сделаны наблюдения подтвердившие мнение о том, что микроорганизмы, обладающие наиболее развитыми факторами агрессии, первыми проникают во внутреннюю среду организма и дают начало инфекционному процессу. Первоначально находящиеся на поверхности тела *Cichlasoma* sp. микроорганизмы (*Bacillus* spp., *Sarcina* spp., *Flavobacterium* spp.) не обладали гемолитической активностью. На 4-е сутки появились аэромонады (*Aeromonas sobria*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila*), из которых только *A. eucrenophila* обладала гемолитической активностью. Представителей этого же вида обнаруживали во внутренних органах и они так же обладали способностью к гемолизу. Аналогичные наблюдения удалось сделать при исследовании бактериальных культур выделенных от золотых рыбок и карпов.

Кишечный микробиоценоз рыб формирующийся под влиянием микрофлоры воды и корма, представлен преимущественно УПМ. Следовательно, при эндопротозойной инвазии потенциальные сочлены паразитоценоза находятся в непосредственном контакте.

Изучение влияния эндопротозойных инвазий на микробиоценоз кишечника провели на молоди *Pterophyllum scalare*. ОМЧ воды, в которой содержали рыб, составляло 680 КОЕ/мл (20% *Aeromonas hydrophila*, 20% *A. caviae*, 20% *A. schubertii*, 10% *Edwardsiella tarda*, 20% *Bacillus* spp., 10% *Listeria* spp.). ОМЧ корма составляло 72400 КОЕ/г (20% *Bacillus mesentericus*, 20% *Bac. sp.*, 10% *Sarcina* spp., 10% *Listeria* spp., 10% *Staphylococcus* spp., 30% *Edwardsiella tarda*).

Микробиоценоз кишечника здоровых рыб характеризовался ОМЧ - 2,7 x 10⁶ ± 164900 КОЕ/г (30% *Aeromonas hydrophila*, 30% *A. schubertii*, 30% *Edwardsiella tarda*, 10% *Staphylococcus* spp. и *Listeria* spp.). При поражении *Hexamita* sp. (ЭИ - 100% ИИ - 180-260 экз./100 мкл) ОМЧ составило 3,1 x 10⁶

± 248000 КОЕ/г (34% *Aeromonas hydrophila*, 20% *A. caviae*, 20% *A. schubertii*, 8% *Edwardsiella tarda*, 6% *Listeria* sp., 10% Deuteromycetes, 2% *Staphylococcus* spp.).

Полученные результаты позволяют говорить о значительном снижении колонизационной резистентности рассматриваемой экологической ниши, росте абсолютного количества УПМ (с 2,4 млн. до 2,5 млн. КОЕ/г), возрастании среднего уровня продуцирования ими факторов агрессии (у здоровых рыб ДНК-аза положительных штаммов *Aeromonas* spp. 40%, при средней активности 1,5 мм; у инвазированных рыб от 80 до 100% при средней ДНК-азной активности 2,8 мм). Изменения кишечного микробиоценоза в данном направлении увеличивают опасность развития септического бактериоза по эндогенному пути.

Развитие эндопротозойно-бактериального заболевания изучали на примере спонтанно пораженных *Hexamita* sp. *Symphysodon discus* массой 35 ± 5 г. На 1, 20, 30 и 40 наблюдения исследовали по 5 рыб. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Паразитологические и микробиологические исследования *Symphysodon discus*, пораженных *Hexamita* sp.

Показатель \ День	1	20	30	40
ЭИ, %	20	60	100	100
ИИ, экз. 100 мкл	68 ± 6	276 ± 68	636 ± 64	724 ± 118
Кол-во особей с обсемененной печенью, %	0	60	60	60
Уровень контаминации КОЕ/г	-	114 ± 12	480 ± 22	840 ± 29
Микробиоценоз печени	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. caviae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. caviae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Flavobacterium</i> spp.
Микробиоценоз кишечника	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. schubertii</i> <i>A. caviae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. schubertii</i> <i>A. caviae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. caviae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>A. eucrenophila</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Sarcina</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. caviae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>A. schubertii</i> <i>Flavobacterium</i> spp.

Аналогичные результаты получены при исследовании по вышеописанной схеме рыб того же вида спонтанно пораженных *Balantidium*

sp. Отмечено более медленное нарастание экстенсивности и интенсивности инвазии (к 40 дню ЭИ - 60%, ИИ - 38 ± 9 экз./100 мкл) что, видимо, связано с более медленным размножением инфузорий по сравнению со жгутиконосцами.

Таким образом, обитание эндопаразитических простейших в кишечнике рыб приводит к повреждению его эндотелия. Через разрушенные защитные барьеры во внутреннюю среду организма рыб проникают постоянно находящиеся в кишечнике УПМ.

Для понимания механизмов формирования и развития ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний предоставляют интерес эксперименты по воздействию на них антибактериальными и (или) антипротозойными средствами.

При исследовании эктопротозойно-бактериального заболевания в качестве объектов использовали *Cichlasoma* sp. со средней массой 14 ± 2 г., искусственно инвазированных *Ichthyophthirius multifiliis*. Лечение было начато при наличии $36,0 \pm 6,4$ трофантов на рыбе, микробиоценоз поверхности тела характеризовался ОМЧ - $148,8 \pm 11,6$ КОЕ/см² (*Aeromonas sobria*, *A. eucrenophila*, *Flavobacterium* spp., *Bacillus mesentericus*). Из печени было выделено $31,2 \pm 15,6$ КОЕ/г (*A. eucrenophila*).

При исследовании эндопротозойно-бактериального заболевания объектом исследования служили больные гексамитозом *Symphysodon discus*, средней массой 15 ± 3 г, завезенные из Юго-Восточной Азии. На момент начала лечения заболевание характеризовалось наличием в соскобах со слизистой оболочки кишечника $195,0 \pm 45,0$ гексамит в п.з.м. и ОМЧ печени $410 \pm 20,2$ КОЕ/г (*Aeromonas sobria* и *A. caviae*).

В качестве антипаразитарных и антибактериальных средств использовали: метронидазол (с кормом 50 мг/кг 10 суток подряд); этакридина лактат (длительные ванны 5 мг/л в течение 7 суток); CuSO_4 в малотоксичной препаративной форме (длительные ванны 0,8 мг/л в течение 6 суток); ципрофлоксацин (длительные ванны 25 мг/л в течение 5-ти суток); энрофлоксацин (с кормом 25 мг/кг в сутки в течение 10 суток подряд). В качестве комплексных агентов использовали комбинации тех же средств в аналогичных дозах: ципрофлоксацина гидрохлорид + метронидазол + этакридина лактат (при эктопротозойно-бактериальном заболевании) и энрофлоксацин + метронидазол (при эндопротозойно-бактериальном). Полученные результаты представлены в таблицах 6 и 7.

Установлено, что монотерапия, на небольшом отрезке времени (4-5 суток) повышает выживаемость рыб. Но ее недостаточно для элиминации не подвергшейся химиотерапевтическому воздействию группы патогенов. Это означает, что для излечения максимального количества особей за минимальный срок необходимо воздействие на всех сочленов паразитоценоза.

Таблица 6. Развитие патологического процесса при элиминации одного из сочленов эктопротозойно-бактериального паразитоценоза

Группа рыб (Кол-во, экз.)	Воздействие	Результаты лечения			Пало/ выжило во время лечения	Пало/ выжило после лечения	Пало/ выжило всего
		Паразитарная составляющая	Микробная составляющая				
			Трофонтов экз./рыба (Теронтов экз./п.з.м.)	Пов. тела КОЕ/см ²			
№1 (10)	АП	0,0 (0,0)	75,4± 8,7	189,6± 18,5	4/6	4/2	8/2
№2 (10)	АБ	101,5±21,5 (5,4±0,6)	0,0	0,0	2/8	7/1	9/1
№3 (10)	К	0,0 (0,0)	0,0	0,0	2/8	0/8	2/8
№4 (15)	Контроль	128,0±26,2 (8,5±2,5)	364,6± 19,0	165,0± 12,8	15/0	-	15/0

Примечание: АП – антипротозойное; АБ – антибактериальное; К – комплексное.

Первоначальный эффект от антибактериального препарата превосходил таковой от антипаразитарного. Это указывает на то, что с момента начала развития инфекционного процесса микробная составляющая наносит больший ущерб макроорганизму. Ее устранение и санация поверхности тела прекращают системное поражение внутренних органов и позволяют рыбе какое-то время выживать, даже при поврежденных покровных тканях, до внедрения новых УПМ из воды.

Аналогичные результаты (таблица 7) получены и при рассмотрении в качестве модели эндопротозойно-бактериального заболевания.

Таблица 7. Развитие патологического процесса при элиминации одного из сочленов эндопротозойно-бактериального паразитоценоза

Группа рыб (Кол-во, экз.)	Воздействие	Результаты лечения		Пало/ выжило во время лечения	Пало/ выжило после лечения	Пало/ выжило всего
		Паразитарная составляющая экз. п.з.м.	Микробная составляющая. Печень КОЕ/г			
№5 (5)	АП	0,0	390,0±130,0	1/4	3/1	4/1
№6 (5)	АБ	300,0±20,0	10,0±3,2	0/5	5/0	5/0
№7 (5)	К	2,0±2,0	0,0	0/5	0/5	0/5
№8 (5)	Контроль	253,0±93,0	555,0±90,0	1/4	4/0	5/0

Примечание: АП – антипротозойное; АБ – антибактериальное; К – комплексное.

Результаты, изложенные в таблицах 6 и 7, показывают, что данный тип патологий нельзя рассматривать как совместное независимое паразитирование различных организмов. Члены паразитоценоза оказывают комплексное отрицательное воздействие на организм рыбы, на протяжении всего патологического процесса.

5.1.4 Характеристика протозойно-бактериального паразитоценоза.

Условия формирования. Взаимодействие с окружающей средой. Необходимым условием формирования ассоциативного протозойно-бактериального заболевания является такой тривиальный фактор, как одновременное присутствие потенциальных сочленов паразитоценоза в месте паразитирования.

УПМ практически всегда есть в воде, в том числе и в качественной водопроводной (СанПиН 2.1.4.559-96), на поверхности тела и в кишечнике рыб. При рассмотрении бактериальной составляющей наиболее важными являются вопросы изменения ее численности и нарастания вирулентности за счет пассирования через организм рыб. При микробиологических исследованиях воды карантинных предприятий установлено, что в аквариумах с рыбами, пораженными простейшими, ОМЧ воды возрастало в среднем в 2,7 раза, по сравнению с емкостями со здоровыми рыбами.

Мы более подробно рассмотрели этот вопрос, проведя ряд исследований в экспериментальных условиях. Группа *Cyprinus carpio* (6 экз. средней массой 140 ± 20 г) была искусственно заражена *Ichthyophthirius multifiliis*. Рыб содержали в непроточном 30 л аквариуме. Для удобства анализа данные полученные при изучении изменения микробиоценоза воды, представлены для следующих уровней развития инвазии: 0 – до заражения рыб; I – умеренно развитая инвазия (ЭИ – 90%, ИИ – 4-18 трофонтов на рыбе); II – сильно развитая инвазия (ЭИ – 100%, ИИ – 40-120 трофонтов на рыбе). Обобщенные результаты исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8. Изменение микробиоценоза воды под влиянием протозойной инвазии

Уровень инвазии	0	I	II
Параметр			
ОМЧ, КОЕ/мл	644	1036	1512
Сапротрофы : УПМ	85:15	10:90	5:95
Качественный состав микробиоценоза	Bacillus spp. Sarcina spp. Flavobacterium spp. Aeromonas spp. Escherichia vulneris	Aeromonas spp. Flavobacterium spp. Escherichia vulneris	Aeromonas spp. Flavobacterium spp. Escherichia vulneris Плесневые грибки
Доля аэромонад в микробиоценозе, %	6,2	71,5	66,7
ДНК + аэромонад, %	30	100	100
Средний уровень ДНК-азной активности, мм	$0,8 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,8$

Как уже было отмечено в производственных условиях, микробиоценоз воды претерпевает количественные и качественные изменения. Уже на начальном этапе развития протозойного заболевания доля сапротитной микрофлоры резко снижается, а доминирующее положение занимают УПМ. Существенно возрастает доля ДНК-азы положительных аэромонад и уровень

продукции данного фактора агрессии. Отсюда следует, что паразитарно-бактериальный паразитоценоз оказывает влияние не только на саму рыбу, но и на среду ее обитания. Эти изменения не только неблагоприятны для рыб, но и позволяют сформировать депо патогенной микрофлоры вне организма рыбы.

Рассматривая паразитарную составляющую необходимо учитывать достаточно тесную взаимосвязь между рыбами, простейшими паразитами и окружающей средой. Поэтому, скорее всего, можно говорить о том, что их требования к физическим факторам весьма сходные, а биотические факторы в силу специфики замкнутых аквасистем практически отсутствуют. Вследствие этого нам не удалось определить комплекс условий, который бы существенно задерживал развитие инвазии. Установлен лишь ряд параметров влияющих на нее.

Представители рода *Chilodonella*, по всей видимости, предпочитают относительно прохладую, жесткую и слабощелочную воду. Клиническая манифестация инвазии происходила у различных видов рыб при достаточно сходных параметрах (ЭИ 40-60%, ИИ $11,6 \pm 2,4 - 26,8 \pm 1,9$ экз. п.з.м.). Но в группе *Colisa lalia* особи с клинически выраженной инвазией появились на 14 сутки, а *Neolamprologus leleupi* на 5-е сутки. Рыб содержали при благоприятных для данного вида гидрохимических параметрах: $t - 28^{\circ} \text{C}$; $\text{pH} - 6,3$; $\text{GH} - 5^{\circ} \text{dH}$ и $t - 25^{\circ} \text{C}$; $\text{pH} - 7,8$; $\text{GH} - 14^{\circ} \text{dH}$, соответственно. Включенные УФ-стерилизаторы задерживали размножение *Ariosophoma* spp., очевидно за счет подрыва их пищевой базы (сокращения численности бактериопланктона). Так в группе *Carassius auratus* при выключенном УФ-стерилизаторе на 14 сутки эксперимента инвазия была более развитой (ЭИ - 100% при ИИ - $16,5 \pm 4,3$ экз. п.з.м.), чем при включенном (ЭИ - 60% при ИИ - $7,0 \pm 1,6$ экз. п.з.м.). Аналогичную картину наблюдали и в группе *Colisa lalia* (ЭИ - 100% при ИИ - $24,0 \pm 5,1$ и ЭИ - 90% при ИИ - $6,9 \pm 1,8$, соответственно).

5.1.5 Воздействие протозойно-бактериального паразитоценоза на иммунную систему рыб. Наиболее важным, с точки зрения поставленных задач, представлялось исследование особенностей иммунного ответа организма на ассоциативное заболевание.

Из клинически здоровых годовиков *Syrpinus carpio*, среднештучной массой 150 ± 20 г, методом аналогов сформировали две группы по 10 экз. и провели иммунологическое исследование. Затем первая группа была подвергнута искусственному заражению *Ichthyophthirius multifiliis*. Рыб второй группы заразили путем внутривентральной инъекции сублетальной дозы ($1/4 \text{ LD}_{50}$) культуры вирулентных аэромонад (*A. caviae* 1). Параллельно при отборе проб крови для иммунологических исследований проводили контроль ее стерильности. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9. Динамика изменения напряженности антиинфекционного иммунитета рыб при различных патологических состояниях

Группа 1 (ихтиофтириоз)			Группа 2 (аэромоназ)		
Срок после заражения, сут.	Завершенный фагоцитоз, %	Септицемия	Срок исследования, сут.	Завершенный фагоцитоз, %	Септицемия
0	41,4±9,6	-	0	40,8±8,9	-
7	22,6±7,4	+	3	45,7±8,2	+
14	13,6±3,4	+	7	49,8±9,9	-
19	95,0±1,6	-	14	41,6±9,4	-
			19	42,7±7,5	-

Примечание: (+) – из крови рыб выделена микрофлора; (-) – из крови выделить микрофлору не удалось.

Как видно из вышеприведенной таблицы, начальный уровень иммунитета, выраженный в % завершеного фагоцитоза, в обеих группах практически одинаков. Рассматривая группу №2 мы наблюдаем многократно описанную в литературе динамику иммунного ответа рыб на внедрение бактериального антигена (Anderson 1974; Лукьяненко, 1989; Микряков, 1991). Напряженность иммунитета повышалась и кровь становилась стерильной.

При рассмотрении рыб пораженных ихтиофтириозом, картина существенно отличалась. Несмотря на наличие в крови микроорганизмов, напряженность иммунитета снижалась. На 14 день эксперимента, у рыб отмечали отслоение отдельных участков покровных тканей на голове и кровоизлияния на брюшке. Количество видимых невооруженным глазом трофантов составляло более 500 экз. на особь. Из крови выделены подвижные аэромонады *A. hydrophila* и *A. sobria* в сочетании с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. У нескольких особей начали отмечаться признаки прогрессирующего расстройства равновесия. В течение последующих 48 часов две особи погибли. Именно этому моменту соответствует наименьший уровень завершеного фагоцитоза. В последующие дни мы наблюдали быстрое, спонтанное выздоровление рыб. При этом, зарегистрированный нами уровень напряженности антиинфекционного иммунитета достиг очень высоких показателей и кровь выживших особей стала стерильной.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что достаточно развитая протозойная инвазия приводит к иммуносупрессии и препятствует формированию иммунного ответа на внедрение бактериальных антигенов.

5.2 Разработка мер борьбы с ассоциативными протозойно-бактериальными болезнями рыб

5.2.1 Методы профилактики протозойно-бактериальных заболеваний рыб при их перевозке. Известно, что нахождение рыб в воде, насыщенной ядовитыми метаболитами (аммиак, углекислый газ), и кислородное голодание приводят к снижению иммунитета и способствует развитию заразных заболеваний, в том числе и протозойно-бактериальных. С этой целью нами было предпринято изыскание методов, позволяющих снизить негативное влияние перевозок.

В специально сконструированной установке имитирующей транспортировку рыб (при плотности посадки *Surginus caerio* 380-400 кг/м³) было исследовано влияние препаратов, направленных на снижение выделения токсичных метаболитов и стабилизацию уровня pH (напрямую зависящего от выделения CO₂ и определяющего токсичность аммиака). Первый препарат «Хинальдин 10%», (ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.», Россия) – анестетик, широко применяемый в мировой аквакультуре использовали в концентрации обеспечивающей глубокую наркотизацию *Surginus caerio* (0,2 мл/л). Второй - Эмицидин (оксиметилпиридина сукцинат) 97% субстанция, (ООО «Тринити Фарма», Россия) использовали в трех последовательно возрастающих концентрациях (10, 20 и 30 мг/л). Это высокоактивный антиоксидант и антигипоксикант, обладающий мембранопротекторными свойствами.

Установлено, что «Хинальдин 10%» существенно снижает выделение рыбами метаболитов и, соответственно, их накопление в воде транспортной емкости. Снижение выделения CO₂, в среднем составило 35,5%; аммония 33,1%. При этом существенное снижение выделения углекислого газа привело к меньшему закислению воды (в контроле составил 6,6 ед. pH, в опыте 6,9 ед. pH). В таких условиях концентрация аммония в форме наиболее ядовитого аммиака снизилась на 30%. Обездвиживание рыб хинальдином снижает потребление ими кислорода до 2,4 раза.

Эмицидин (в концентрации 30 мг/л) проявляет антигипоксикантные свойства при снижении содержания O₂ в воде до 0,7-0,5 мг/л. Рыбы выдерживали состояние сверхглубокой гипоксии без развития жизнеугрожающих симптомов (расстройство равновесия, полная потеря реакции на внешние раздражители) в воде с добавкой эмицидина на 41% времени дольше, чем в чистой воде. При этом интенсивность потребления кислорода не менялась и составляла в среднем 147 мг/кг/ч.

На основании полученных данных можно дать следующие рекомендации. Использовать «Хинальдин 10%» при перевозке дскоративных рыб в дозе достаточной для глубокой наркотизации вида, подвергающегося транспортировке. При пересадке рыб из транспортировочных емкостей в аквариумы в них целесообразно добавлять Эмицидин в дозе 30 мг/л.

5.2.2 Разработка методов профилактики протозойно-бактериальных заболеваний рыб в период карантина. После транспортировки и размещения рыб на карантин весьма важными

представляются их ускоренная реабилитация и иммунокоррекция. Эти задачи могли решить синтетические иммуномодуляторы и регенераторы тканей - рибонуклеат натрия, метилурацил и ксимедон.

Для исследования влияния препаратов на регенерацию тканей сорока экземплярам клинически здоровых *Surginus caprio*, среднештучной массой 120 ± 20 г, искусственно нанесли одинаковые травмы. Препараты вводили с кормом (через 48 часов после нанесения травм) методом вольного группового скармливания в дозе 40 мг/кг десять дней подряд. Учет результатов опыта проводили через 48 часов после последнего введения препарата. Полученные данные представлены в таблице 10.

Таблица 10. Тканевосстанавливающая активность метилурацила, ксимедона и рибонуклеата натрия

Группа рыб	Заживление раны на голове, %	Длина видимого шрама на спинке, см	Восстановление лучей хвостового плавника, %
Контроль	$93,0 \pm 7,0$	$4,7 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0$
Метилурацил	$100,0 \pm 0,0$	$3,1 \pm 0,2^*$	$25,0 \pm 5,0^*$
Ксимедон	$97,0 \pm 4,8$	$3,0 \pm 0,4^*$	$24,0 \pm 4,8^*$
Рибонуклеат натрия	$100,0 \pm 0,0$	$3,1 \pm 0,2^*$	$29,0 \pm 3,6^{**}$

Примечание: * - различия с контролем достоверны ($P \leq 0,05$), ** - различия с контрольными и другими опытными группами достоверно ($P \leq 0,05$).

Все три исследованных вещества продемонстрировали способность стимулировать регенерацию тканей рыб. Наиболее активным регенератором тканей по сумме показателей признан рибонуклеат натрия. В ходе дальнейших исследований было отмечено положительное влияние всех трех препаратов на уровень БАСК. Иммуностимулирующий эффект метилурацила и рибонуклеата натрия достигал пика на 11 сутки эксперимента (сразу после завершения скармливания корма с препаратами) и составлял $9,84 \pm 0,04$ и $11,06 \pm 0,04\%$ соответственно, при среднем по контрольной группе показателе $9,77 \pm 0,02\%$. Аналогичный эффект ($9,96 \pm 0,03\%$) ксимедона наблюдали на 17 сутки эксперимента (7 сутки после завершения скармливания). Максимальный, за период наблюдения показатель БАСК в группе получавшей рибонуклеат натрия выше аналогичных показателей в группах получавших ксимедон и метилурацил.

Рибонуклеат натрия проявил себя как наиболее активный регенератор тканей и иммуностимулятор. Поэтому мы рекомендовали использовать его (в вышеуказанных дозах) сразу после восстановления пищевой активности поступивших на карантин рыб. При невозможности введения его с кормом можно использовать содержащие Рибонуклеат натрия кондиционеры воды – «Ихтиовит® Активар», «Ихтиовит® Аквагумат», (ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.», Россия).

5.2.3 Изыскание оптимального антибактериального компонента для комплексных антипротозойно-бактериальных препаратов. Выбор антибактериального компонента невозможен без исследования структуры и уровня антибиотикорезистентности микрофлоры доминирующей при заболеваниях рыб.

В ходе исследований были выявлены основные группы микроорганизмов, ответственные за возникновение бактериальных заболеваний (в том числе и вторичных). Наиболее распространенными были подвижные представители рода *Aeromonas* и представители семейства *Enterobacteriaceae* (по 22,5% от общего числа исследованных культур), неферментирующие щелочеобразователи родов *Moraxella* – 21,4% и *Acinetobacter* – 19,3%, родов *Flavobacterium* – 3,1% и *Staphylococcus* – 4,2%.

Данные, полученные при изучении антибиотграмм выделенных возбудителей, представлены в таблице 11.

Наибольшую активность против всех основных групп возбудителей продемонстрировал ципрофлоксацин. Цефтриаксон превосходит ципрофлоксацин по активности против энтеробактерий, но значительно уступает ему в эффективности против других групп возбудителей. Высокий уровень резистентности бактериальных возбудителей по отношению к традиционно применяемым в рыбоводстве препаратам: левомицетину и тетрациклину, обуславливает их низкую эффективность (что подтверждается лечебной практикой). Активность против достаточно большого количества штаммов возбудителей продемонстрировал гентамицин, хотя он несколько уступает ципрофлоксацину.

Дальнейшие исследования, проведенные в 2008 и 2009 г., подтвердили отмеченные ранее закономерности. Таким образом, в настоящее время для эмпирической терапии бактериозов рыб пригоден только ципрофлоксацин. Подавляющее большинство штаммов (72,8-100%), доминирующих групп возбудителей бактериозов рыб, чувствительны к нему. За период наблюдений не отмечено случаев скоротечного формирования устойчивых к нему мутантов *in vitro*.

Таблица 11. Уровень чувствительности к антибактериальным средствам доминирующих групп микроорганизмов, выделенных от больных рыб в 2006 и 2007 г.г.

Группа микроорганизмов	Уровень чувствительности	Антибактериальный препарат							Тетрациклин
		Ципрофлоксацин/ Энрофлоксацин	Цефтазидим	Цефтриаксон	Левомецитин	Гентамицин	Гентамицин		
Aeromonas	Чувств.	80,0(82,0)	50,6(75,0)	62,0(75,0)	30,5(40,0)	70,5(25,0)		0,0(0,0)	
	Пром.	10,5(12,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	9,5(0,0)	15,0(50,0)		0,0(0,0)	
	Резист.	9,5(6,0)	49,4(25,0)	38,0(25,0)	60,0(60,0)	14,5(25,0)		100,0(100,0)	
Enterobacteriaceae	Чувств.	85,0(87,0)	50,0(75,0)	87,5(75,0)	50,0(75,0)	75,0(75,0)		100,0(100,0)	
	Пром.	5,0(13,0)	12,5(0,0)	0,0(0,0)	24,1(0,0)	3,4(0,0)		0,0(0,0)	
	Резист.	10,0(0,0)	37,5(25,0)	12,5(25,0)	25,9(25,0)	21,6(25,0)		0,0(0,0)	
Moraxella	Чувств.	72,8(73,3)	25,0(42,7)	25,0(14,4)	0,0(12,5)	н/и (28,7)		50,0(25,0)	
	Пром.	13,2(10,6)	0,0(28,5)	25,0(57,1)	0,0(0,0)	н/и (14,2)		50,0(25,0)	
	Резист.	14,0(16,1)	75,0(14,2)	50,0(28,5)	100,0(87,5)	н/и (57,0)		0,0(50,0)	
Acinetobacter	Чувств.	86,0(84,0)	57,1(10,0)	57,1(0,0)	80,0(100,0)	80,0(0,0)		н/и	
	Пром.	14,0(14,8)	14,2(80,0)	28,1(50,0)	0,0(0,0)	3,6(100,0)			
	Резист.	0,0(3,2)	28,7(10,0)	14,4(50,0)	20,0(0,0)	19,4(0,0)			
Flavobacterium	Чувств.	89,1(89,0)	60,0(100,0)	н/и (100,0)	н/и (100,0)	79,1(100,0)		100,0(100,0)	
	Пром.	8,9(9,0)	24,1(0,0)	н/и (0,0)	н/и (0,0)	10,9(0,0)		0,0(0,0)	
	Резист.	2,0(2,0)	15,9(0,0)	н/и (0,0)	н/и (0,0)	10,0(0,0)		0,0(0,0)	
Staphilococcus	Чувств.	80,0(85,0)	н/и (60,0)	70,6(60,0)	н/и (100,0)	н/и (100,0)		0,0(100,0)	
	Пром.	10,0(0,0)	н/и (40,0)	14,2(40,0)	н/и (0,0)	н/и (0,0)		100,0(0,0)	
	Резист.	10,0(15,0)	н/и (0,0)	15,2(0,0)	н/и (0,0)	н/и (0,0)		0,0(0,0)	

Примечание: данные по 2006 г., данные по 2007 г., н/и – не исследовали.

5.2.4 Влияние ципрофлоксацина на иммунную систему рыб. Одним из основных требований к современному antimicrobial препарату является отсутствие иммуносупрессорных свойств. В связи с этим мы исследовали влияние ципрофлоксацина на уровень БАСК в группах (по 15 экз.) клинически здоровых *Surginus carpio*, средней массой 150 ± 10 г.

Уровень БАСК в контрольной группе (№1), за время наблюдения не претерпевал существенных изменений ($10,5 \pm 0,92$ - $10,95 \pm 0,87\%$, в различные сроки наблюдения). В группе (№2) иммунизированной (внутрибрюшинной инъекцией 1×10^9 клеток на особь) авирулентной культурой *Aeromonas hydrophila*, отмечали нормальный иммунный ответ на введение антигена. Средний по группе уровень БАСК, достигнув максимума ($17,00 \pm 1,87\%$) на третьи сутки после введения антигена, снижался и к 14 суткам стабилизировался на уровне немного выше первоначального ($11,50 \pm 1,25\%$).

Динамика изменения уровня БАСК в группах подвергавшихся действию ципрофлоксацина представлены в таблице 12. Рыбам группы №3 ципрофлоксацин вводили с кормом в дозе 50 мг/кг в сутки пять дней подряд. Группу №4 прокармливали ципрофлоксацином в той же дозе до иммунизации, проведенной аналогично группе №2. Группу №5 прокармливали после иммунизации.

Таблица 12. Динамика изменения БАСК в вакцинированных и интактных группах рыб

Группа \ Время	1 сутки	3 сутки	7 сутки
Группа №3	$16,40 \pm 1,36^*$	$17,40 \pm 2,42^*$	$12,85 \pm 0,79^*$
Группа №4	$15,00 \pm 2,34$	$17,20 \pm 0,66$	$19,18 \pm 0,48^*$
Группа №5	-	$31,80 \pm 3,38^*$	$11,67 \pm 0,74$

Примечание: * - различия между сопоставляемыми группами достоверно ($P \leq 0,05$).

Сравнивая динамику изменения БАСК в группах №1 и №3, можно наблюдать иммуностимулирующий эффект от введения ципрофлоксацина. На 3 сутки после завершения введения препарата, уровень БАСК превосходил аналогичный показатель в контрольной группе более чем на 60%. Сравнивая динамику изменения иммунологических показателей в группах №2, №4 и №5, можно также отметить положительное влияние ципрофлоксацина на формирование иммунного ответа при введении антигена. Пиковые уровни БАСК в группах №4 и №5 существенно превосходят аналогичный показатель в группе №2 (на 12,8 и 87,0% больше, соответственно).

Из проведенных исследований можно сделать вывод о том, что ципрофлоксацин не оказывает отрицательного влияния на работу иммунной системы рыб и является иммуностимулятором.

5.2.5 Экспериментальное определение взаимосвязи между МПК ципрофлоксацина (эритрофлоксацина) *in vitro* и терапевтическими дозами для рыб. При разработке любого антибактериального препарата большое значение имеет информация о взаимосвязи между МПК *in vitro* и ожидаемыми терапевтическими дозами.

Surginus sagrio средней массой 140 ± 20 г, путем внутривентральной инъекции (10 млн. микробных тел на особь) заражали различными вирулентными агаровыми культурами *Aeromonas* spp. Штаммы характеризовались различной чувствительностью к ципрофлоксацину (МПК 3,5-6,5 мкг/мл). Далее зараженных рыб случайным образом делили на группы (по 6 экз.) и рассаживали в отдельные аквариумы.

В первом аквариуме рыб оставляли без лечения. Во второй аквариум вносили ципрофлоксацина гидрохлорид в дозе, необходимой для создания МПК по отношению к использованному для заражения штамму. В третий и четвертый аквариум вносили дозы для создания двух- и четырехкратной МПК. Биодоступность ципрофлоксацина принимали за 100%.

Длительность лечения составляла пять суток. На следующий день после завершения курса терапии проводили учет результатов.

Эксперименты показали, что дозы ципрофлоксацина на уровне МПК обеспечивают сохранность рыб на уровне 66,6-100,0% группы при аналогичном показателе в контрольных группах 33,2-66,6%. Приводят к клиническому выздоровлению выживших рыб, но не позволяют добиться элиминации возбудителя (из крови, выделены культуры *Aeromonas* spp. в количестве 985-45 КОЕ/мл). Дозы на уровне двух МПК и более, обеспечивают 100% выживаемость группы, приводят к выздоровлению рыб и элиминации возбудителя.

5.2.6 Изыскание оптимального антипротозойного компонента для комплексных антипротозойно-бактериальных препаратов. В ходе предварительного анализа были установлены два потенциально равноценных антипротозойных компонента: этакридина лактат и акрифлавин. Для определения терапевтического индекса изучили их острую токсичность для рыб.

Среднесмертельная концентрация этакридина лактата для *Carassius auratus* LC_{50} - $25,5 \pm 0,7$ мг/л; для *Brachidanio terio* $24,4 \pm 1,0$ мг/л и для *Paracheirodon innesi* $25,0 \pm 1,0$ мг/л. Среднесмертельные концентрации акрифлавина: $21,9 \pm 0,9$ мг/л; $21,7 \pm 0,9$ мг/л и $23,8 \pm 0,7$ мг/л, соответственно. Оба соединения, согласно классификации принятой в водной токсикологии, были отнесены к умереннотоксичным веществам. Установленный уровень токсичности позволяет использовать данные соединения в дозах до 10 мг/л.

В результате проведенных исследований было установлено, что акрифлавин обладает высокой терапевтической эффективностью при лечении костиаза, хилодонеллеза и триходиноза различных видов рыб при дозе 10 мг/л (эксперименты проведены на группах 6 видов рыб общей численностью 680 экз.). При снижении дозы до 5 мг/л добиться полной

элиминации паразитов не удавалось даже при шестикратном удлинении экспозиции. Следовательно терапевтический индекс акрифлавина можно оценить как 2,1-2,3.

Этакридина лактат был эффективен против паразитических жгутиконосцев (*Costia* spp., *Cryptobia* spp., *Oodinium* spp.) и инфузорий (*Ichthyophthirius multifiliis* и *Neoichthyophthirius schlotfeldii*) в наименьшей дозе 5 мг/л, при экспозиции до 6 суток и терапевтическом индексе 5,0 (эксперименты проведены на группах 5 видов рыб, общей численностью 2510 экз.).

Исходя из вышеизложенного, в качестве антиэктопаразитического компонента был выбран этакридина лактат.

Широко используемый против эндопаразитических простейших метронидазол (10-15 мг/л при лечебных ваннах и 50-100 мг/кг в сутки перорально) удовлетворял требованиям, предъявляемым к действующим веществам, разрабатываемых комплексных препаратов.

5.2.7 Разработка препарата «Антибак ПРО». 5.2.7.1
Позиционирование препарата «Антибак ПРО». Разработка прототипа лекарственной формы. Препарат разрабатывался для комплексной антипротозойно-бактериальной терапии при эндопротозойных инвазиях. Он представляет собой комбинацию энрофлоксацина (малорастворимый в воде гомолог ципрофлоксацина) и метронидазола в таблетированной форме. Специальные наполнители обеспечивают образование клейкой суспензии при смешивании препарата с водой. «Антибак ПРО» вводится рыбам методом вольного группового скармливания (что обуславливает целесообразность использования плохо растворимого в воде антибактериального компонента) в составе различных типов кормолекарственных смесей (гранулированные, желированные, пастообразные).

5.2.7.2 Исследование антибактериальной активности прототипа препарата «Антибак ПРО» in vitro. В эксперименте использовали культуры микроорганизмов (26 шт.), выделенные от спонтанно зараженных декоративных рыб (*Aeromonas* spp., *Escherichia vulneris*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii*, *Flavobacterium* spp., *Moraxella* spp., *Acinetobacter calcoaceticum*). Среди них было 84,6% чувствительных к ципрофлоксацину/энрофлоксацину, 11,5% штаммов с промежуточной чувствительностью и 3,9% устойчивых (с ожидаемой МПК более 4 мкг/мл). Исследована чувствительность микроорганизмов в пределах от 30 до 0,206 мкг субстанции на 1 мл среды.

Усредненная МПК (указана по ципрофлоксацину) составила 0,88 мкг/мл. Учитывая данные о взаимосвязи между МПК in vitro и терапевтическим эффектом, можно говорить о необходимости создания в ткани рыб концентрации 1,8 мкг/мл. Этой концентрации будет достаточно для подавления 84,6% чувствительных штаммов. Следовательно, почти в 15 % случаев можно ожидать недостаточную антибактериальную активность.

Учитывая низкую токсичность фторхинолонов для рыб и незначительное влияние увеличения концентрации на себестоимость препарата, было решено установить терапевтическую концентрацию антибактериального компонента на уровне 10 мг/кг икhtiомассы (с учетом умеренноустойчивых штаммов с МПК 5 мкг/мл).

5.2.7.3 Экспертиза соотношения ожидаемой пользы и возможных рисков при применении «Антибак ПРО». Риски при применении рассматриваемого лекарственного средства определяются возможностью поражения людей работающих с препаратом, а также отравления и гибели рыб при лечении. Проведенные исследования позволили установить основные токсикологические характеристики препарата.

«Антибак ПРО» на основании результатов острого опыта на теплокровных животных может быть отнесен к 4 классу опасности (ГОСТ 12.1.007 – 76), LD₅₀ - 15000 мг/кг (максимально введенная доза принята за среднесмертельную).

При введении теплокровным животным «Антибак ПРО» (в течении 20 дней в дозах: 1/5, 1/10 и 1/20 от LD₅₀) их гибели на протяжении всего опыта не отмечали и клиническое состояние животных не изменялось.

У мышей первой группы, получавших наибольшую дозу препарата (3000 мг/кг массы тела), на протяжении всего опыта отмечали наименьший прирост массы тела. Однако через 10 суток после отмены препарата показатели прироста массы мышечной массы опытных групп достоверно не отличались от контроля (P>0,05). При изучении гематологических показателей (количество гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов) установлено, что средние показатели по опытным группам находились в пределах физиологической нормы (12,0±0,3-12,1±0,3 г%; 8,1±0,2-8,4±0,3 10¹²/л; 11,8±0,4-12,2±0,4 10⁹/л) и статистически не отличались от таковых в контрольной группе (11,8±0,2 г%, 8,1±0,2 10¹²/л; 11,8±0,2 10⁹/л). При исследовании биохимических показателей (активность аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы, количество общего белка) установлено, что они соответствовали физиологической норме (0,60±0,03-0,67±0,02 ммоль/час; 0,67±0,03-0,69±0,02 ммоль/час; 67,1±1,1-70,4±1,6 г/л, соответственно) и достоверно не отличались от тех же показателей в контрольной группе (0,61±0,01 ммоль/час; 0,69±0,02 ммоль/час; 69,2±0,3 г/л).

Средняя по группам продолжительность медикаментозного сна (при проведении гексеналовой пробы) у животных во всех трех группах получавших препарат (на 21 день 31,02±2,83; 32,02±1,69; 32,32±2,18 и 31 день 20,38±1,07; 22,83±1,24; 23,04±1,27), достоверно не отличалась (P>0,05) от аналогичных значений в контрольной группе (32,04±1,72 и 20,62±1,02 минут соответственно). При патоморфологическом вскрытии, выраженных дистрофических и (или) некробиотических изменений в печени и других органах у животных подопытных групп не отмечено.

Далее в ходе экспериментов были установлены среднесмертельные дозы препарата для *Clarias gariepinus* ($LD_{50} - 20,9 \pm 2,28$ г/кг) и для *Labeo frenatus* ($LD_{50} - 19,2 \pm 2,25$ г/кг).

Для оценки эффекта кумуляции препарата, рыбам в течение 22 суток вводили дозы препарата в диапазоне от 10 до 20 г/кг в сутки. Было установлено, что LD_{50} хроническое для *Clarias gariepinus* составляет 202,5 г/кг и для *Labeo frenatus* 222,5 г/кг. Признаки отравления (потеря окраски, вялость) развивались на 17-20 день введения препарата, гибель отмечали на 18-22 день с начала введения препарата. Сопоставление среднесмертельных доз при исследовании острой и субхронической токсичности препарата указывало на его слабовыраженную кумуляцию. Коэффициент кумуляции составил от 9,7 до 11,6, в зависимости от вида рыб.

Экспертизу ожидаемой пользы от применения препарата начали с определения оптимальной терапевтической дозы и длительности применения препарата при терапии спонтанных инвазий и инфекций рыб.

На первом этапе исследовали антибактериальную активность препарата «Антибак ПРО». Объектом исследования служили 100 экз. *Varbus tetrazona*, пораженных *Flexibacter* spp. На втором этапе исследовали антипротозойную активность. Объектом исследования служили 70 экз. *Colisa lalia*, пораженных *Hexamita* sp. Результаты лечения учитывали по количеству выживших и погибших рыб в каждой группе во время лечения и в течение 10 дней после него.

Проведенные исследования позволили установить, что оптимальной терапевтической дозой «Антибак ПРО» при лечении как протозойных, так и бактериальных заболеваний является 2,5 г препарата на кг живой массы рыб при длительности лечения 5 дней. В дальнейшем препарат использовали для терапии протозойно-бактериальных заболеваний в производственных условиях. Лечение было подвергнуто: 80 экз. *Varbus tetrazona* (*Spironucleus* sp. + *Aeromonas* spp.); 400 экз. *Tilapia* sp. (*Cryptobia* sp. + *Aeromonas* spp.); 341 экз. *Carassius auratus*, (*Balantidium* sp. + *Pseudomonas* spp.). Лечение проводили при температуре воды 26 - 28° С. Плотность посадки рыб в аквариумы составляла 400-600 г на 100 л воды.

Существенное улучшение состояния рыб наблюдали на 2-4 день после начала введения препарата. Полное выздоровление животных, включая заживление обширных язвенных поражений происходило на 10 сутки после первой дачи препарата. «Антибак ПРО» продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность (от 89,8 до 100,0%). При этом в ходе проведенных лечебных мероприятий не удалось выявить каких-либо побочных действий или осложнений, связанных с применением препарата.

В настоящее время препарат широко используется для терапии ассоциативных протозойно-бактериальных, эндопротозойных и бактериальных заболеваний рыб. В период с 2007 г. по 2010 г. обработано не менее 193000 экз. декоративных рыб различных видов. По данным ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.» информация о неэффективности, осложнениях или серьезных побочных

явлениях, связанных с применением этого препарата в адрес производителя не поступала.

5.2.8. Разработка препарата «Ихтиовит Антибак». 5.2.8.1. Позиционирование препарата «Ихтиовит Антибак. Разработка прототипа лекарственной формы. «Ихтиовит Антибак» разрабатывался для комплексной антипротозойно-бактериальной терапии при эндо- и эктопротозойных инвазиях. Представляет собой водорастворимый порошок, применяемый методом долговременных лечебных ванн. В качестве антибактериального компонента в состав препарата входит ципрофлоксацина гидрохлорид, в качестве средства против эндопаразитических простейших - метронидазол, в качестве антиэктопротозойного компонента - этакридина лактат.

5.2.8.2 Исследование антибактериальной активности прототипа препарата «Ихтиовит Антибак» in vitro. Учитывая ранее полученные данные (5.2.7.2) по МПК ципрофлоксацина терапевтическая концентрация, теоретически, должна составлять 10 мг/л. Очевидно, что данная цифра нуждается в существенной корректировке, так как этакридина лактат также обладает существенным антибактериальным действием (Ершов и др., 1993; Деева, 2000). С целью уточнения концентрации ципрофлоксацина, которая при взаимодействии с раствором этакридина лактата с ранее определенной (5.2.6) концентрацией 5 мг/л должна была оказывать стабильный бактерицидный эффект, проведены испытания антибактериальной активности прототипа препарата in vitro.

Анализ данных, полученных в ходе эксперимента, подтверждает информацию о существенной антибактериальной активности этакридина лактата. Средний показатель МПК (по ципрофлоксацину) составил 0,57 мкг/мл. МПК для наиболее устойчивого штамма снизилась до 2,0 мкг/мл. Таким образом, учитывая ранее установленную взаимосвязь между МПК и терапевтическим эффектом, терапевтическая доза ципрофлоксацина (с учетом удобства производства препарата) должна составлять 5 мг/л.

Метронидазол при растворении в воде был эффективен в дозах от 10 до 15 мг/л. Наиболее целесообразной представлялась «средняя» доза 12,5 мг/л.

Предварительная длительность применения препарата была установлена по наиболее медленно действующему компоненту (этакридину лактату) - 7 дней.

5.2.8.3 Экспертиза соотношения ожидаемой пользы и возможных рисков при применении «Ихтиовит Антибак». Результаты изучения острой токсичности «Ихтиовит Антибак» для теплокровных животных позволили отнести его к 3 классу умеренно токсичных веществ (по ГОСТ 12.1.007 – 76), LD₅₀ составляет 4244,0±369,0 мг/кг.

При изучении субхронической токсичности для теплокровных животных были использованы дозы 1/5, 1/10 и 1/20 LD₅₀ (849-212 мг/кг). В опытных и контрольной группах мышей, которым вводили «Ихтиовит Антибак», гибели животных на протяжении всего эксперимента не отмечали.

Клиническое состояние грызунов не изменялось. У мышей, получавших наибольшую дозу препарата (849 мг/кг массы тела), на протяжении опыта отмечали наименьший прирост массы тела, но через 10 суток после отмены препарата показатели прироста массы животных достоверно не отличались от контрольных ($P > 0,05$). По всей видимости, выявленное отрицательное влияние препарата на массонакопление молодых теплокровных животных проявляется только при достаточно высоких дозах и носит легкообратимый характер.

Гематологические показатели в группах опытных животных находились в пределах физиологической нормы ($11,0 \pm 0,3$ - $11,4 \pm 0,5$ г%; $7,6 \pm 0,3$ - $8,3 \pm 0,2$ $10^{12}/л$; $11,1 \pm 0,3$ - $12,0 \pm 0,3$ $10^9/л$) и на одном уровне с контролем ($11,5 \pm 0,4$ г%; $8,2 \pm 0,3$ $10^{12}/л$, $11,6 \pm 0,2$ $10^9/л$).

При исследовании биохимических показателей установлено, что у животных подопытных групп они находились в пределах физиологической нормы ($0,61 \pm 0,03$ - $0,63 \pm 0,04$ ммоль/час; $0,66 \pm 0,04$ - $0,68 \pm 0,06$ ммоль/час; $62,1 \pm 2,1$ - $69,4 \pm 2,1$ г/л), достоверно не отличались ($P > 0,05$) от тех же показателей животных контрольной группы ($0,63 \pm 0,04$ ммоль/час, $0,68 \pm 0,06$ ммоль/час, $69,4 \pm 2,1$ г/л).

У животных, получавших препарат, средняя по группам продолжительность медикаментозного сна ($35,23 \pm 4,90$; $35,12 \pm 4,02$; $34,10 \pm 6,11$ и $26,02 \pm 3,00$; $26,13 \pm 2,69$; $26,18 \pm 4,03$) достоверно не отличалась от контроля ($P > 0,05$) во все сроки исследования ($34,90 \pm 1,84$ и $25,97 \pm 1,22$ минут соответственно), что свидетельствовало о нормальной детоксицирующей функции печени.

При патоморфологическом вскрытии, проведенном после завершения основного эксперимента, выраженных дистрофических и некробиотических изменений в печени и других органах животных опытных и контрольной групп не отмечено.

Результаты экспериментов при изучении острой токсичности «Ихтиовит Антибак» позволили установить LC_{50} для ряда видов рыб: *Suyprius carpio* - $124,1 \pm 11,0$ мг/л; *Lebistes reticulatus* - $111,6 \pm 10,7$ мг/л; *Trichogaster trichopterus* - $106,1 \pm 9,2$ мг/л; *Cichlasoma sp.* - $124,1 \pm 11,0$ мг/л.

После определения уровня острой токсичности была исследована субхроническая токсичность препарата. В эксперименте использовали те же виды рыб. Рыб помещали на 14 дней в раствор препарата в дозе 1/5 и 1/10 от LC_{50} . Гибели рыб в опытных и контрольных группах не отмечали. Гидробионты не демонстрировали никаких отклонений от нормального состояния.

Учитывая, что препарат предназначен для свободной реализации, можно предположить, что он будет использоваться не только в карантинных, но и в экспозиционных аквариумах. Поэтому было предпринято изучение его влияния на различные виды водных беспозвоночных и растений.

Установлено, что «Ихтиовит Антибак» в удвоенной терапевтической дозе (50 мг/л) не вызывает отравления и гибели представителей наиболее распространенных групп аквариумных беспозвоночных животных.

Установлено, что «Ихтиовит Антибак» в терапевтической дозе (25 мг/л) не оказывает отрицательного влияния на наиболее распространенные в декоративной аквакультуре виды растений. В удвоенной терапевтической дозе он существенно тормозит их рост. Средний прирост их фитомассы составил *Cryptocogone* sp. - 2,5; *Echinodorus* sp. - 2,0 и *Nymphaea* sp. - 0,4 г, при приросте в контроле 10,2; 9,4; 0,8 г соответственно. При этом препарат не вызывает видимого повреждения и гибели растений. Таким образом, результаты опытов указывают на возможность широкого применения препарата, как в карантинных, так и в экспозиционных аквариумах.

Оценку ожидаемой пользы от применения препарата начали с экспериментального определения оптимальной дозы и уточнения срока лечебного купания декоративных рыб. Объектом исследования служили 105 особей *Xiphophorus helleri* спонтанно пораженных комплексом бактериального (*Aeromonas hydrophila*) и протозойных патогенов (*Chilodonella* sp. и *Hexamita* sp.).

Установлено, что высокая терапевтическая эффективность (90%) отмечена в группах, обработанных дозами 25-30 мг/л при экспозиции 7-9 суток. Оптимальной терапевтической дозой «Ихтиовит Антибак» при лечении бактериальных и протозойных заболеваний декоративных рыб целесообразно считать наименьшую – 25 мг/л при экспозиции 7 суток.

В дальнейшем мы использовали препарат для терапии спонтанно возникавших ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний различных видов рыб в рыбоводных предприятиях. Лечение подвергнуто: 150 экз. *Xiphophorus helleri* (*Hexamita* sp. + *Aeromonas* spp.); 400 экз. *Botia madesta* (*Trichodina* sp. + *Flexibacter* spp.); 183 экз. *Lebistes reticulatus* (*Costia* sp. + *Aeromonas* spp. + *Acinetobacter* spp.); 241 экз. *Carassius auratus* с тем же комплексом патогенов; 95 экз. *Pterophyllum scalare* (*Spiroucleus* sp. + *Aeromonas* spp. + *Moraxella* spp. + *Enterobacteriaceae*). Препарат применяли при температуре воды 26-28° С. Плотность посадки рыб колебалась от 100 до 800 г на 100 л воды.

Выздоровление основной массы рыб происходило на 3-4 день после начала применения препарата. Полное исчезновение признаков заболевания у отдельных особей наблюдали на 7-10 день. Препарат продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность (от 92,9 до 99,8 %).

За период применения препарата с 2007 г. по 2010 г. им было обработано не менее 300000 экз. рыб различных видов. По данным ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.» сообщений о неэффективности, осложнениях или побочных действиях, связанных с его применением в адрес производителя не поступало.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость проведения данных исследований обуславливала ситуация, сложившаяся за последние 10 лет в декоративной аквакультуре РФ. Имеющийся научно-практический потенциал не позволял до конца расшифровать этиологию существенной части заболеваний рыб с участием простейших и рекомендовать надежные методы и средства их лечения.

Проведенные исследования позволили установить механизмы развития ассоциативного заболевания, которые базируются на комплексном отрицательном воздействии, оказываемом протозойно-бактериальным паразитоценозом на рыбу. Простейшие паразиты инициируют изменение условий существования микробных сообществ поверхности тела и кишечника рыб, обеспечивают нарастание численности, биологической агрессивности и проникновение бактерий во внутреннюю среду макроорганизма. Последние, при помощи токсинов повреждают ткани, что приводит к полиорганной недостаточности и гибели хозяина.

Специфика замкнутых аквасистем (очень большие плотности посадки рыб, отсутствие биотических и абиотических факторов элиминации простейших, стресс при частых рыбоводных манипуляциях) обуславливает крайне благоприятные условия для развития простейших паразитов и как следствие протозойно-бактериальных заболеваний. Учитывая, что основной ущерб от рассматриваемого типа патологий приходится на импортируемых гидробионтов основным пусковым механизмом заболевания можно назвать транспортировочный и адаптационный стрессы. Возможно, что при развитии товарного рыбоводства в замкнутых аквасистемах на первое место выйдут другие факторы. К условиям способствующим развитию протозойно-бактериальных заболеваний можно отнести повышенный микробный фон воды, наличие в рыбоводном модуле групп рыб пораженных УПМ.

Результатом проведенных исследований стали разработка, изучение свойств, регистрация в установленном порядке и внедрение в рыбоводную практику двух первых в нашей стране комплексных антипротозойно-бактериальных препаратов «Антибак ПРО» и «Ихтиовит Антибак». Данные лекарственные средства продемонстрировали высокую терапевтическую эффективность при лечении протозойно-бактериальных заболеваний различных видов рыб. Расчет экономической эффективности применения этих препаратов показал, что затраты на «Антибак ПРО» в течение двух – трех недель принесут рыбоводному предприятию от 121,0 до 1494,3% прибыли. Аналогичная цифра по «Ихтиовит Антибак» составляет от 733,5 до 6330,4%.

Вместе с анестетиками, антигипоксантом и иммуностимуляторами комплексные препараты образуют необходимый арсенал лечебно-профилактических средств. Разработанный комплекс карантинных мероприятий объединяет полученный научно-практический потенциал, способный эффективно контролировать ассоциативные протозойно-бактериальные заболевания рыб.

Установленные в ходе выполнения данной работы закономерности могут служить основой для изучения других типов ассоциативных заболеваний рыб и дальнейшего исследования водных паразитарных систем.

7. ВЫВОДЫ

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Протозойные инвазии декоративных рыб в 64,5% случаев протекают в форме ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний. При этом их удельный вес составляет в среднем 22,3% от всех случаев диагностированных заразных заболеваний. Данному классу патологий подвержены практически все виды пресноводных рыб при их содержании в замкнутых аквасистемах. Наиболее восприимчивы карпозубые живородящие рыбы, различные селекционные формы золотого карася и лишенные чешуи сомовые. Относительно устойчивы панцирные сомы и обыкновенные карпы.

2. Этиологический агент – комплексный, представляет собой паразитарно-бактериальный паразитоценоз. В качестве паразитарной составляющей чаще всего выступают простейшие родов: *Costia*, *Chilodonella*, *Ichthyophthirius*, *Trichodina*, *Hexamita*, *Balantidium*. При паразитировании инфузорий подотряда *Sessilina* ассоциативные заболевания практически не развиваются. В качестве бактериальной составляющей – убиквитарные условно-патогенные грамотрицательные палочки семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*, родов *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* и некоторые другие. Частота развития данного типа патологий зависит от степени развития инвазии, вирулентности и способности к ее индукции, находящихся в воде на поверхности тела и в кишечнике УПМ, иммунологической реактивности рыб. Пусковым механизмом заболевания служат факторы смещающие динамическое равновесие в системе паразит – хозяин.

3. Между параметрами, характеризующими инвазию эктопаразитов (ЭИ, ИИ, ИО) и обсемененностью поверхности тела имеется прямая сильная связь (коэффициент корреляции 0,71-0,99). После возрастания обсемененности поверхности тела УПМ с 6,6-11,3 КОЕ/см² до 50-60 КОЕ/см² (около 25000 КОЕ/мл слизи) между обсемененностью поверхности тела и печени также возникает прямая сильная связь (0,91).

Развитие ассоциативного заболевания с участием эндопаразитических простейших происходит за счет кишечной микрофлоры, в которой доминируют УПМ, наращивающие в присутствии паразитических простейших свою численность и вирулентность (при росте общей численности УПМ до 1×10^5 на один г содержимого кишечника количество ДНК-аза положительных штаммов аэромонад возрастает с 40 до 80-100%,).

4. Клиническая и патологоанатомическая картины при рассматриваемом типе заболеваний характеризуется сочетанием симптоматических комплексов характерных для протозойных инвазий и бактериемий, вызванных грамотрицательными факультативными патогенами: повышенное слизистотделение в сочетании с кровоизлияниями в плавники,

белковые оболочки глаз, геморрагии на теле, реже асцитный и язвенный синдромы. Последние могут носить слабовыраженный или стертый характер.

Развитие заболевания начинается при разрушении защитных барьеров макроорганизма, подавлении антиинфекционного иммунитета простейшими (установлено снижение показателя завершеного фагоцитоза с 41,6% при нормальном иммунном ответе до 13,6% при протозойной инвазии). Следствием этого является снижение колонизационной резистентности экологических ниш поверхности тела и кишечника рыб, накопление УПМ и повышение их вирулентности. Начавшийся в результате инфекционный процесс приводит к развитию полиорганной недостаточности и гибели рыб. Средний показатель смертности от ассоциативных заболеваний (в среднем 21% поголовья) превосходит таковой, как при моноинвазиях и инфекциях (9,8 и 12,4%), так и при микстинвазиях (15,6%).

5. Протозойно-бактериальные заболевания приводят к неблагоприятным для рыб изменениям в микробиоценозе воды. ОМЧ возрастает в среднем на 230-270%, доля УПМ увеличивается с 15 до 95%, доля вирулентных аэромонад с 30 до 100%.

6. Основой терапии ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваний может служить химиотерапевтическое воздействие одновременно на паразитарную и бактериальную составляющие паразитоценоза. Терапевтическая эффективность антибактериальной и антипаразитарной монотерапий составляет 10-20%, а при комплексном воздействии 80-100%.

В качестве терапевтических средств предложены первые в РФ комплексные антипротозойно-бактериальные препараты.

7. «Антибак ПРО» малотоксичен для теплокровных животных $LD_{50}=15000$ мг/кг (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). При 20-ти дневном введении дозы 3000 мг/кг, оказывает обратимое отрицательное влияние на массонакопление, не влияет на гематологические и биохимические показатели, а также детоксицирующую функцию печени. Безопасен для работающих с препаратом людей.

Препарат безопасен для рыб и других гидробионтов. Среднесмертельная доза колеблется от 19,2 до 20,9 г/кг икhtiомассы в зависимости от вида рыб. При терапевтическом индексе 7,7 и коэффициенте кумуляции 9,7-11,6, в зависимости от вида рыб (слабая кумуляция) обладает терапевтической эффективностью 89,9-100,0% при ассоциативных эндопротозойно-бактериальных заболеваниях.

8. «Ихтиовит Антибак» умеренно токсичен для теплокровных животных $LD_{50}=4244$ мг/кг (3 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). При 20-ти дневном введении дозы 849 мг/кг, оказывает обратимое отрицательное влияние на массонакопление, не влияет на гематологические и биохимические показатели, а также детоксицирующую функцию печени. Безопасен для работающих с препаратом людей.

Препарат безопасен для гидробионтов. Среднесмертельная концентрация колеблется от 106,1 до 124,1 мг/л в зависимости от вида рыб. При терапевтическом индексе 4,7 обладает терапевтической эффективностью 92,9-99,8% при ассоциативных протозойно-бактериальных заболеваниях. В рекомендованных дозах безопасен для основных содержащихся в аквариумах беспозвоночных животных и не оказывает отрицательного влияния на прирост массы водных растений.

9. В качестве профилактических средств можно, использовать комплекс кондиционеров воды. При перевозке рыб анестетик «Хинальдин 10%», позволяющий добиться снижения выделения токсичных метаболитов (CO_2 на 35,5%, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ на 33,1%) при снижении потребления кислорода в 2,4 раза. В качестве адаптогена - препараты на основе Эмицидина, повышающего время перенесения рыбами сверхглубокой гипоксии на 41%. Иммуностимуляторов – регенераторов тканей на основе рибонуклеата натрия, существенно ускоряющего регенерацию тканей (до 29% по отдельным показателям) и увеличивающего БАСК на 13,2%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гаврилин К.В. Лечение миксобактериозов рыб в условиях индустриальной аквакультуры // Зооиндустрия. 2005. № 5. С. 18.

2. Гаврилин К.В., Енгашев В.Г., Юхименко Л.Н., Бычкова Л.И. Результаты научных исследований по препарату «Антибак» // Сб. научных и научно-методических трудов. Проблемы аквакультуры. М.: Московский зоопарк, 2005. С. 133-134.

3. Гаврилин К.В. Эффективность «Антибака ПРО» при эндопаразитарных инвазиях декоративных рыб, осложненных бактериальной инфекцией // Тр. ГНУ ВИГИС. 2006. Том 43. С. 26-35.

4. Гаврилин К.В. Опыт использования препаратов «Антибак» в борьбе с бактериозами // Рыбоводство. 2006. № 3-4. С. 50-51.

5. Гаврилин К.В., Гончарова М.Н., Грищенко Л.И., Енгашев В.Г. Лечение миксобактериозов рыб // Рыбоводство. 2006. № 2. С. 34-35.

6. Гаврилин К.В., Ершова Т.А. Изучение токсичности антибактериально-протозойного препарата Антибак ПРО на декоративных рыбах // Тр. ГНУ ВИГИС. 2006. Том 44. С. 58-62.

7. Гаврилин К.В. Пораженность некоторых видов декоративных рыб, поставляемых из Малайзии, Индонезии и Сингапура простейшими // Ветеринарная патология. 2007. № 2 (21). С. 79-81.

8. Гаврилин К.В. Исследование терапевтической эффективности «Ихтиовит Антибака» при лечении декоративных рыб // Ветеринарная патология. 2007. № 2 (21). С. 181-185.

9. Гаврилин К.В., Мамыкина Г.А. «Антибак ПРО» для аквариумных рыб // Сб. научных и научно-методических трудов. М.: Московский зоопарк, 2007. С. 90-95.

10. Гаврилин К.В., Мамыкина Г.А. Использование нового комплексного препарата «Ихтиовит Антибак» для лечения бактериальных и протозойных заболеваний декоративных рыб // Сб. научных и научно-методических трудов. М.: Московский зоопарк, 2007. С. 82-89.

11. Гаврилин К.В. Вторичные бактериальные осложнения при протозоозах рыб // Материалы научной конференции Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. М.: Россельхозакадемия. 2008. С. 118-120.

12. Гаврилин К.В. Уровень чувствительности возбудителей бактериальных болезней рыб к антибактериальным препаратам // Ветеринарная патология. 2008. № 3 (26). С. 91-94.

13. Гаврилин К.В. Микробиоценоз аквариального карантинного цеха // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2008. № 2. С. 8-10.

14. Гаврилин К.В., Ершова Т.А. Биологические свойства антипротозойно-бактериального препарата «Антибак ПРО» // Ветеринарная патология. 2008. № 4 (27). С. 114-117.

15. Гаврилин К.В., Мамыкина Г.А. Бактериальные осложнения при эктопротозойных инвазиях рыб // Ветеринарная патология. 2008. № 2 (25). С. 37-41.

16. Гаврилин К.В., Ершова Т.А., Мамыкина Г.А. Распространенность заразных заболеваний среди тропических рыб // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2008. № 3. С. 18-20.

17. Гаврилин К.В. Методы терапии протозойно-бактериальных заболеваний рыб // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2009. № 2. С. 7-9.

18. Гаврилин К.В. Исследование механизмов развития протозойно-бактериальных болезней у рыб // Международный вестник ветеринарии. 2009. № 3. С. 49-52.

19. Гаврилин К.В. Секундарные бактериозы при эктопротозойных инвазиях // Сб. научных трудов ФГНУ «ГосНИОРХ». 2009. Вып. 38. С. 31-34.

20. Гаврилин К.В. Распространенность эктопротозойно-бактериальных заболеваний среди тропических пресноводных рыб // Сб. научных трудов ФГНУ «ГосНИОРХ». 2009. Вып. 38. С. 35-38.

21. Гаврилин К.В. Микробиоценоз тропических рыб в норме и при патологии // Ветеринарная патология. 2009. № 2 (29). С. 58-62.

22. Гаврилин К.В., Мамыкина Г.А. Опыт лечения суперинфекции мечения // Аквариум. 2009. № 5. С. 36-38.

23. Гаврилин К.В., Микряков Д.Р., Силкина Н.И., Суворова А.Т. Влияние антибактериальных препаратов и пробиотиков на гуморальные факторы неспецифического иммунитета карпа (*Cyprinus carpio*) // Ветеринария. 2010. № 6. С. 15-18.

24. Гаврилин К.В. Эффективность различных препаратов при эктопротозойно-бактериальных болезнях рыб // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2010. № 4. С. 8-10.

25. Гаврилин К.В., Микряков Д.В., Силкина Н.И., Суворова Т.А. Изменение функциональной активности гуморальных факторов неспецифического иммунитета карпа *Surginus carpio* под влиянием антибактериального препарата и пробиотика // Ветеринария Кубани. 2010. № 6. С. 14-16.

26. Гаврилин К.В. Разработка средств лечения суперинфекций декоративных рыб // Межведомственный сборник научных и научно-методических трудов. М.: Московский зоопарк. 2010. С. 74-77.

27. Гаврилин К.В. Дифференциальная диагностика эндопротозойных инвазий рыб // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2011. № 1. С. 6-9.

28. Гаврилин К.В. Методы терапии эндопротозойных инвазий рыб // Материалы докладов научной конференции Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. М., 2011. Выпуск 12. С. 107-109.

29. Гаврилин К.В. Бактериальные осложнения при эндопротозойных инвазиях рыб // Материалы докладов научной конференции Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. М., 2011. Выпуск 12. С. 109-112.

30. Гаврилин К.В. Терапия эндопротозойных инвазий рыб // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2011. № 2. С. 18-21.

31. Енгашев В.Г., Гаврилин К.В., Юнчис О.Н. «Антибак ПРО» в борьбе с бактериальными болезнями декоративных рыб // Aqua animals. 2005. № 3. С. 48-49.

32. Енгашев В.Г., Гаврилин К.В. К вопросу инфекционной безопасности живых кормов // Аквариум. 2006. № 1. С. 36-37.

Подписано в печать 18.01.2012

Объем 2 п.л.

Тираж 100

Заказ №777

Адрес: 129343, Москва, проезд Нансена, 4