



004606701

На правах рукописи

**Дрошнев Алексей Евгеньевич**

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «ВИТАРОЛ-Е»  
ДЛЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ  
ЗАЩИТЫ КАРПОВЫХ РЫБ ПРИ АЭРОМОНОЗЕ**

**03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Щелково 2010**

На правах рукописи

Дрошнев Алексей Евгеньевич

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «ВИТАРОЛ-Е»  
ДЛЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ  
ЗАЩИТЫ КАРПОВЫХ РЫБ ПРИ АЭРОМОНОЗЕ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

06.02.02– ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Щелково 2010

Работа выполнена в ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко» (ВИЭВ)

Научные руководители:

доктор ветеринарных наук, профессор

**Лучко Михаил Александрович**

доктор биологических наук

**Гринь Светлана Анатольевна**

Официальные оппоненты:

Заслуженный ветеринарный врач РФ,

лауреат Государственной премии СССР,

доктор биологических наук, профессор

**Скичко Николай Данилович**

кандидат биологических наук

**Бычкова Лариса Ивановна**

Ведущая организация – ФГУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория (ЦНМВЛ)

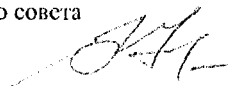
Защита диссертации состоится 18 июня 2010 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.069.01 при ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Россельхозакадемии по адресу: 141142 Московская область, Щелковский район, п/о Кашинцево, пос.Биокомбината, ВНИИТИБП; e-mail: vnitibp@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИТИБП.

Автореферат разослан 17 мая 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

 Фролов Ю.Д.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Аквакультура - искусственное выращивание рыб, гидробионтов, растений в контролируемых и управляемых человеком условиях. Из всех продовольственных отраслей это наиболее динамично развивающийся сектор (Мамонтов Ю.П., 2006).

Уплотненное содержание, неправильное кормление, техногенные факторы, стрессы различного характера оказывают негативное влияние на организм животных и рыб, что, как правило, приводит к угнетению иммунной системы и возникновению различных патологических процессов (Федоров Ю.Н., 2003; Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., 2007). И только у некоторой части рыб, при этом, развиваются адаптивные реакции, направленные на сохранение вида и, довольно длительное время отрицательно сказывающиеся на их продуктивности (Leung K.Y.et.al., 1994, Mikryakov B.R., 1999, Kozinska A. et.al., 2000).

Многолетний опыт использования противомикробных лекарственных средств при бактериальных болезнях рыб показал, что некоторые из них со временем оказываются малоэффективными. Поэтому в последнее время предпочтение отдают лекарственным средствам и кормовым добавкам, обеспечивающим нормализацию неспецифической резистентности макроорганизма (Новоскольцева Т.М., 2002; Leszek G. et.al., 2004).

Другим важным механизмом, обеспечивающим высокую резистентность животного организма к неблагоприятным внешним и внутренним факторам является антиоксидантная защита (АОЗ) (Regoli F. et.al., 1995; Sakai M et.al., 2001; Wink D.A. et al., 2001). Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и АОЗ находятся в динамическом равновесии. Их нарушение приводит к развитию у рыб различных патологий (Богдан В.В., 2002, Герунова Л.К., 2004).

Аэромоназ рыб семейства карповых – сложный патологический процесс, затрагивающий различные стороны обмена веществ, вызываемый условнопатогенной бактерией *Aeromonas* и сопровождающийся гибелью до

70% поголовья рыб (Афанасьев В.И., 1979; Грищенко Л.И., 2007; Асадчая Р.Л., 2008). В современной практике рыбоводства для профилактики и борьбы с аэромонозом пресноводных рыб, широко используют различные антибактериальные лекарственные средства, вопросам же коррекции про- и антиоксидантных процессов уделяется еще недостаточно внимания.

**Цель работы** - изучить изменения в течении свободнорадикальных процессов и системе антиоксидантной защиты в норме и при заболевании рыб аэромонозом, усовершенствовать меры борьбы и профилактики болезни путем повышения естественной резистентности организма рыб, с использованием антиоксидантных и антибактериальных препаратов.

#### **Задачи исследований:**

- определить значение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у рыб семейства карповых в норме и при аэромонозе;

- разработать рецептуру препарата на основе йодсодержащих веществ в комплексе с минеральными веществами и антиоксидантами и определить возможность коррекции состояния антиоксидантной системы защиты у карповых рыб при аэромонозе;

- разработать лабораторный регламент по производству, контролю и применению препарата «Витарол-Е» против аэромоноза карповых рыб;

- изучить сравнительную терапевтическую и профилактическую эффективность разработанного препарата *in vitro* и *in vivo*;

- в разных регионах РФ выделить от карпов, с подозрением на заболевание аэромонозом, культуры бактерий, изучить основные биологические свойства;

- провести сравнительный анализ патогенности аэромонад, изолированных из внутренних органов рыб и рыбохозяйственных водоемов;

- испытать в условиях неблагополучного по аэромонозу карпов хозяйства терапевтическую эффективность разработанного комплексного препарата.

**Научная новизна.** Определены показатели, характеризующие состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у рыб в норме, а также при спонтанном и экспериментальном аэромонозе.

Впервые показана эффективность витамина Е, природного биоантиоксиданта, для стабилизации параметров антиоксидантной защиты у карповых рыб при аэромонозе.

Проведена идентификация выделенных штаммов аэромонад в рыбхозах Московской, Владимирской, Калужской, Липецкой, Ростовской, Тверской областей по морфологическим, культурально-биохимическим и биологическим свойствам. Установлено, что наиболее вирулентными свойствами обладают виды *A.sobria*, *A.hydrophila*.

Получен патент РФ на изобретение №2344824 от 27 января 2009 года: «Препарат для лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии и способ лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии».

**Практическая ценность.** Разработана лекарственная форма препарата «Витарол-Е», обладающего выраженными антиоксидантными и антибактериальными свойствами.

Препарат «Витарол-Е» испытан комиссионно и показал высокую эффективность при аэромонозе карпов в рыбоводческом хозяйстве «Нарские острова» Московской области. Препарат используется также в других рыбоводческих хозяйствах.

Разработаны «Методические рекомендации по ветеринарному контролю, диагностике и профилактике опасных заболеваний рыб в аквакультуре», рассмотренные и одобренные на секции «Инфекционная патология», протокол №4 и утвержденные Российской академией сельскохозяйственных наук 01 ноября 2006 года. «Методические наставления по определению уровня свободнорадикального окисления и состояния системы антиоксидантной защиты организма рыб», рассмотренные и одобренные на Ученом Совете ВИЭВ 19 января 2010 года, протокол № 1.

**Апробация работы.** Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на: международной научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных» (Воронеж, 2004г.); 4-ой Национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2005г.); международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина 2005: современное состояние и актуальные проблемы обеспечения ветеринарного благополучия животноводства» (Ялта, 2005г.); заседании научно-консультативного Совета по болезням рыб Межведомственной Иктиологической комиссии и Секции патологии рыб и охраны гидробионтов Отделения ветеринарной медицины РАСХН (Москва, 2009г.); заседаниях Ученого совета ВИЭВ (2004-2009гг.); межлабораторном совещании сотрудников ВИЭВ (2010г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 научных трудов, в том числе патент РФ, 2 - в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 130 страницах и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, выводы, практические предложения, список литературы и приложения. Материалы диссертации иллюстрированы 20 таблицами, 14 рисунками. Список литературы включает 147 публикаций, в том числе 75 иностранных.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа выполнена в 2002 - 2010 гг. в лаборатории иктиопатологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко, на опытно-экспериментальной базе Вышневолоцкого отдела ВИЭВ (о. Лисий Тверской области) и в неблагополучных по аэромонозу карпов рыбоводных хозяйствах Московской, Владимирской, Калужской, Липецкой, Ростовской и Тверской

областей в рамках задания 02.01.18. РНТП «Изучить эпизоотическое состояние рыбоводческих хозяйств по вирусным и бактериальным инфекциям».

## 2.1. Материалы и методы.

Объектом исследования служили рыбы разных видов и возраста из естественных водоемов, а также прудов рыбоводческих хозяйств. Для проведения лабораторных экспериментов рыб завозили в аквариальную лабораторию из благополучных по инфекционным болезням хозяйств. Всего в опытах было использовано 5040 экз. карпов; 510 экз. карасей, 50 экз. лещей, 40 экз. плотвы, 40 экз. красноперки; 280 экз. радужной форели.

Для исключения болезней вирусной природы работа проводилась совместно с ихтиовирусологами к.б.н. Завьяловой Е.А. и к.в.н. Пичугиной Т.Д., за что автор им искренне благодарен.

В опытах по изучению биологических свойств возбудителя аэромоназа было использовано 173 изолята аэромонад, из них 97 выделены нами от больных рыб и 76 - из воды. Морфологические, культуральные и биохимические свойства аэромонад изучали на жидких, полужидких и плотных питательных средах. Первичные посевы делали из крови, паренхиматозных органов рыб с клиническими признаками аэромоназа и прудовой воды на плотные питательные среды: МПА, TSA и селективные среды: Шмитц-Шандельс, Риппс-Кабелли. Выросшие колонии пересевали на агар Клиггера, с которого отбирали культуры ферментирующие глюкозу и не ферментирующие лактозу.

При положительной реакции на оксидазу культуры пересевали на среду Хью-Лейфсона для определения ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Оксидазоположительные культуры, ферментирующие глюкозу, рассеивали на дифференциально-диагностические среды («шестрый ряд Гисса»). Определение ферментативной активности аэромонад проводили также с использованием Системы индикаторной бумажной (СИБ), производства ФГУП НПО «Микроген», г. Москва и постановкой ускоренных



биохимических тестов (В.М.Никитин, Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов, 1986). Дифференциацию микроорганизмов и типирование до вида проводили согласно руководству по определению бактерий Берги (1997).

Чувствительность изолированных аэромонад к фуразолидону, препарату ПВЭНТИ, йодсодержащему соединению и «Витарол-Е» определяли методом диффузии в агар и путем серийных разведений в жидкой питательной среде по общепринятым в микробиологии методам.

Методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде изучали минимальную бактериостатическую и бактерицидную концентрации препаратов (МБсК, МБК) с культурами *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas sobria*, выделенными от рыб. (Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования, под ред. М.О.Биргер, 1982).

Определение уровня окислительно-антиоксидантных реакций в организме рыб в норме и при аэромонозе проводили по методам, приведенным в методических пособиях по изучению процессов ПОЛ и АОЗ у животных (Бузлама В.С., 1997, Камышников В.С., 2000).

Данная часть работы была выполнена совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии и токсикологии ВИЭВ д.в.н., профессором Сидоровым И.В. и к.в.н. Костромитиновым Н.А.

В цельной крови и плазме определяли содержание: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, пероксидазы, церулоплазмينا, альфа-токоферола (витамин Е), малонового диальдегида (МДА).

Производственные испытания терапевтической эффективности препарата «Витарол-Е» проведены в неблагополучном по аэромонозу карпово-рыбоводном хозяйстве «Нарские острова», Одинцовского района Московской области. Большую помощь в проведении производственного испытания оказала к.в.н. Борисова М.Н., за что автор выражает ей сердечную благодарность.

Более полно материалы и методы научных исследований приведены в соответствующих разделах диссертации.

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.2.1. Состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ) рыб в естественной среде и искусственных условиях содержания

На данном этапе работы было изучено течение процессов ПОЛ и АОЗ у рыб в естественных и рыбохозяйственных водоемах, в норме и при гипоксии.

Результаты представлены в табл.1.

Таблица 1

Показатели ПОЛ и АОЗ у рыб в норме  
(при содержании кислорода в воде 5-7 мг/л)

| Место взятия проб           | Вид рыбы    | МДА, мкМ/л | Каталаза, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /лхминх10 <sup>3</sup> | Пероксидаза, ед.опт.мл./лхсек | Церулоплазмин, мкМ бензохинона /лхмин | Фосфолипиды г/л |
|-----------------------------|-------------|------------|--|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Р/х Осенка»                 | Карп        | 4,4±0,7    | 4,6±0,7  | 4,4±0,6                       | 35,2±7,8                              | 1,9±0,1         |
| Р/х Парские острова»        | Карп        | 3,0±0,5    | 4,2±0,8  | 4,4±0,5                       | 30,8±1,5                              | 2,2±0,2         |
| Р/х «Цица»                  | Карп        | 2,2±0,6    | 5,1±0,4  | 4,3±0,4                       | 31,5±3,0                              | 3,3±0,7         |
| Аквариальная лаборатория    | Карп        | 3,7±0,3    | 4,0±0,8  | 4,2±0,9                       | 37,2±5,8                              | 3,1±0,8         |
| Вышневолоцкое водохранилище | Лещ         | 1,9±0,7    | 3,4±0,4  | 4,7±0,7                       | 24,5±5,5                              | 2,2±0,4         |
|                             | Плотва      | 2,1±0,2    | 3,2±0,6  | 3,0±0,6                       | 26,5±2,5                              | 5,6±0,6         |
|                             | Красноперка | 1,7±0,4    | 4,7±0,9  | 3,7±0,4                       | 39,5±4,5                              | 3,4±0,3         |

Примечание: P < 0,05

Полученные данные свидетельствуют, что расхождение значений уровня антиокислительных ферментов у рыб находится в пределах 30%, в то время как содержание конечных продуктов ПОЛ у карпов до 50%. Результаты исследований проб крови рыб, находящихся в условиях недостатка кислорода показали, что у всех видов рыб происходит активация процесса ПОЛ и снижение уровня общих фосфолипидов, при этом отмечали рост активности системы антиоксидантной защиты. Значения показателей антиокислительных энзимов у рыб в естественной среде обитания на 30-44% выше их уровня у выращиваемых рыб.

### **2.2.2. Антиоксидантная защита карпов при экспериментальном аэромонозе**

Опыты проведены в аквариальной лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ им.Я.Р.Коваленко. Объектом изучения служили пробы крови карпов в возрасте двух лет зараженных аэромонадами, внутривнутрибрюшинно, в дозе 100 млн.м.к., в 0,2 см<sup>3</sup> физраствора (LD<sub>50</sub>).

Анализ полученных данных показал, что хроническое течение аэромоноза вызывает сдвиг в системе антиоксидантной защиты. Отмечено уменьшение значений каталазы, пероксидазы, церулоплазмина. Развивающийся патологический процесс в организме рыб при инфицировании ускоряет интенсивность свободно-радикальных реакций, в результате в органах и тканях накапливаются токсические перекиси липидов, концентрация малонового диальдегида увеличивается в среднем в два раза. Емкости системы антиоксидантной защиты при этом недостаточно для стабилизации процессов окисления в пределах нормального уровня, что выражалось в снижении концентрации фосфолипидов в крови рыб и активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Таким образом, аэромонадная инфекция сопровождается нарушением баланса в системе ПОЛ-АОЗ, что приводит к избыточной активации процессов свободнорадикального окисления и является одним из факторов патогенеза данной болезни.

### **2.2.3. Разработка рецептуры препарата для лечения аэромоноза карповых рыб**

В качестве активного вещества использовали йод металлический и калий йодистый и дополнительно витамины А, В, Е и минеральные вещества.

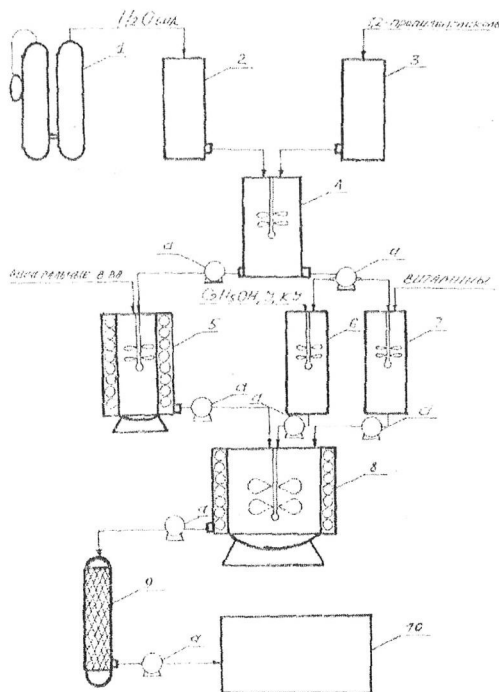
При формировании рецептуры препарата исходили из зоотехнических нормативов, чтобы уровень каждого из компонентов не превышал допустимый предел, восполняя при этом недостаток витаминов и минеральных веществ (Гамыгин Е.А. с соавт., 1989; Федорченко В.И., 1992; Канидьев А.Н., 1996). Подбор средних концентраций проводили на

основании результатов собственных исследований и литературных данных (Афанасьев В.И., 1979)

Технологическая схема изготовления препарата «Витарол-Е» представляет собой многостадийный процесс и представлена на рис. 1

Рис. 1

**Технологическая схема изготовления препарата «Витарол-Е»**



- 1 – установка для получения бидистиллированной воды;
- 2 – емкость с бидистиллированной водой;
- 3 – емкость с 1,2-пропиленгликолем;
- 4, 6, 7 – смеситель с мешалкой;
- 5 – смеситель с мешалкой и терморегуляцией;
- 8 – реактор с мешалкой и терморегуляцией;
- 9 – фильтр;
- 10 – установка розлива и укупорки
- а – насос

В смеситель 4 заливают через воронку 40 литров 1,2 – пропиленгликоля и 60 литров бидистиллированной воды. Включают мешалку на 30 минут. Полученный раствор с помощью насосов разливают по 30 литров в три смесителя (5,6,7), включают мешалки и до окончания приготовления компонентов не выключают. В смесителе 5 готовят раствор минеральных веществ. Последовательно добавляют соли: 450 г хлористого магния, растворяют в течение 90 минут, при 60°C; 420 г сульфата цинка, растворяют 60 минут при 40°C. Полноту растворения контролируют визуально путем

взятия пробы в объеме 200-300 см<sup>3</sup>. В полученный раствор добавляют 300 г янтарной кислоты, перемешивают 60 минут при 40°C. Полноту растворения контролируют визуально путем взятия пробы в объеме 200-300 см<sup>3</sup>. В смесителе 6 получают антибактериальный, йодсодержащий комплекс. Добавляют 400 см<sup>3</sup> этилового спирта 96°, 450 г калия йодистого и 150 г йода металлического. Перемешивают 60 минут при 20°C. Полноту растворения контролируют визуально путем взятия пробы в объеме 200-300 см<sup>3</sup>.

В смесителе 7 получают раствор витаминов. Добавляют 45 г витамина В<sub>6</sub>, перемешивают 30 минут. Добавляют 80 г витамина Е, перемешивают 90 минут. Компоненты из смесителей 5 и 6 сливают в реактор 8, перемешивают 30 минут. Добавляют суспензию витаминов из смесителя 7, перемешивают 120 минут. Препарат фильтруют при положительном давлении (1,5 бар) через фильтр 9 (d пор 1 мкм). Готовую лекарственную форму «Витарол-Е» с помощью дозатора 10 разливают в стерильные флаконы по 500см<sup>3</sup>. Флаконы укупоривают резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками.

Приготовленный препарат изучали при аэромонозе карпов в лабораторных экспериментах, в сравнении с другим йодсодержащим препаратом – ПВЭНТИ (включающим гидросульфат поливинил-этилнитриметилпиридол, йод металлический, калий йодистый). Сто двадцать экземпляров карпов, разделенных на шесть групп, заражали культурой *A. hydrophila* (НО 11/07.05), внутрив брюшинно, в дозе 200 мин.м.к./0,2 см<sup>3</sup> – LD<sub>100</sub>. После заражения рыбам задавали комбикорма с препаратами в дозах и курсом представленными в табл.2.

Таблица 2.

**Эффективность препаратов йода при лечении аэромоноза карпов**

| Доза                        | Кратность кормления | Результат (% выживаемости) |             |
|-----------------------------|---------------------|----------------------------|-------------|
|                             |                     | ПВЭНТИ                     | «Витарол-Е» |
| 50 мг на 1 кг биомассы рыбы | Семь дней           | 73%                        | 75%         |
| 75 мг на 1 кг биомассы рыбы | Семь дней           | 66%                        | 89%         |
| 75 мг на 1 кг биомассы рыбы | Пять дней           | 68%                        | 89%         |

Из таблицы 2 видно, что введение препарата в дозе 50 мг/кг массы рыбы в течение 7 дней, не обеспечивало надлежащей эффективности способа лечения. Применение 75 мг/кг массы рыбы в течение пяти и семи дней дает сопоставимые результаты выживаемости рыб, соответственно лечение в течение пяти дней экономически оправданно. Проведение экспериментов с более высокими дозами препарата 100-150 мг/кг массы рыбы, при пяти – семи кратном курсе не давало более высокого результата защиты рыб при экспериментальном заражении вирулентными штаммами аэромонад.

Таким образом, испытуемый препарат по предлагаемому способу лечения оказывает более эффективное действие в сравнении с ПВЭНТИ. В дальнейших экспериментах использовалась доза 75 мг/кг массы рыбы курсом 5 дней.

#### 2.2.4. Антибактериальные и антиоксидантные свойства препарата йода и «Витарол-Е» при аэромонозе (*in vitro* и *in vivo*).

В опытах *in vivo* использовали 60 экз. двухлетков карпа, разделенных на 4 группы: две опытных и две контрольных (по 15 экз. в группе).

Были испытаны две лекарственных формы: «Витарол-Е» и антибактериальное соединение йода (комплекс йода металлического, йодистого калия и пропиленгликоля), которые задавали рыбам в составе кормов, в течение 5 дней, из расчета 5 % корма от массы рыб (согласно рыбоводным нормативам). Рыб заражали двухсуточной культурой вирулентного штамма *A. hydrophila* (НО 11/07.05), внутривентально в дозе 0,2 см<sup>3</sup> с содержанием 200 млн.м.к. – LD<sub>100</sub>. Исследования проводили по схеме, представленной в табл.3. Таблица 3.

Схема опыта

| Группа рыб, количество экземпляров |           |                                 | Препарат   |
|------------------------------------|-----------|---------------------------------|--|
| Контроль                           | I(n=15)   | Незараженные                    | -  |
|                                    | II(n=15)  | Зараженные <i>A. hydrophila</i> | -  |
| Опыт                               | III(n=15) | Зараженные <i>A. hydrophila</i> | Антибактериальный препарат йода<br>75 мг/кг x 5 дней |
|                                    | IV(n=15)  | Зараженные <i>A. hydrophila</i> | Витарол-Е<br>75 мг/кг x 5 дней                       |

Исследование антибактериального действия препаратов *in vitro* показало, что наименьшие концентрации, задерживающие рост бактерий, находятся в пределах от 0,125 до 1,00 мкг/см<sup>3</sup>. Бактерицидная активность препаратов по отношению к возбудителям аэромоноза (штаммы *A. hydrophila*) составила от 2,00 до 3,75 мкг/см<sup>3</sup>. Наиболее чувствительны культуры *A. sobria*. МБСК составила 0,125 мкг/см<sup>3</sup>, МБК 1,75-2,00 мкг/см<sup>3</sup>.

В результате экспериментов было установлено, что у карпов, получавших в течение 5 дней с кормом «Витарол-Е», значительно повышается активность системы антиоксидантной защиты. Наиболее существенно увеличивается концентрация витамина Е на 85,4% и церулоплазмина на 24,7%. В опытной группе карпов, которым задавали комбикорм с антибактериальным соединением йода разницы значений показателей с их уровнем у рыб контрольных групп не выявлено, о чем свидетельствует отсутствие статистической достоверности различий. Полученные данные дают основание полагать, что «Витарол-Е» хорошо резорбируется в кишечнике рыб, активизирует метаболические реакции в организме.

Анализ результатов исследований проб крови карпов, зараженных вирулентной культурой аэромонад, показал, что болезнь сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления. В результате в тканях рыб увеличивается концентрация токсических веществ перекисного окисления липидов, что приводит к нарушению целостности биомембран клеток и их разрушению, и, тем самым, способствует ускоренному развитию болезни. Между клиническим проявлением патологического процесса и интенсивностью процессов свободнорадикального окисления выявлена прямая зависимость, которая выражалась динамическим уменьшением емкости антиоксидательных ферментов. Изменения отмечали у рыб в опытной группе, получавших корма с антибактериальным соединением йода, и в контрольной.

Нарушения в системе АОЗ при экспериментальном аэромозе характеризовались, в основном, дефицитом биоантиоксидантов, а именно витамина Е, концентрация которого была на 63,7 и 58,6 % соответственно ниже по сравнению со значениями показателя до инфицирования. Кроме того, было отмечено, что концентрации антиоксидантов у рыб в группе, где применяли препарат «Витарол-Е», не изменялись после заражения. При этом содержание витамина Е и СОД в крови карпов на третьи сутки после заражения были выше на 8,3 и 7,6% соответственно, чем до эксперимента. На третьи сутки эксперимента гибель рыб в контроле составила 90 %, тогда как в опытных группах клинические признаки болезни отмечали лишь у отдельных экземпляров, в группе получавшей с кормом только антибактериальное соединение йода.

В течение всего срока наблюдения у экспериментально зараженных карпов, получавших корм с «Витаролом-Е» в месте инъекции наблюдали незначительную гиперемию и воспаление, признаки которых исчезли на 10 сутки. Все подопытные рыбы при этом остались живы. Стабилизацию про-антиоксидантных процессов у карпов в опытных группах регистрировали на 14 сутки после заражения.

#### **2.2.5. Изучение токсичности препарата «Витарол-Е».**

Методика испытания токсических свойств препарата состояла из следующих этапов: 1 - изучение переносимости препарата при насильственном введении (острая токсичность); 2 - изучение переносимости различных доз препарата при включении его в состав корма (хроническая токсичность); 3 - изучение переносимости препарата в условиях отсутствия проточности (вторичная токсичность).

Опыты по изучению токсических свойств препарата в терапевтической и повышенной дозировках проводили в непроточных, аэрируемых аквариумах емкостью 200 литров, при температуре воды 18-20°C. В трех экспериментах использовали 180 экз. двухлетков карпа массой от 210 до 320 граммов. В



каждой группе находилось по 20 экз. подопытных рыб, при соответствующем контроле.

В опыте по изучению **острой** токсичности препарат в смеси с крахмальным клейстером вводили рыбам перорально с помощью пластикового катетера, соединенного со шприцем в дозе 75, 750, 1500, 2250, 3000 и 3750 мг препарата на килограмм живого веса. Для выявления местного раздражающего действия спустя 3, 5 и 8 дней проводили анатомическое вскрытие подопытных рыб (по 3 экз.). Установлено, что максимально переносимая доза препарата «Витарол-Е» превышает терапевтическую дозу в 50 раз и составляет 3750 мг. Введение препарата не оказывало раздражающего местного действия на кишечник рыб, что наблюдали при анатомическом вскрытии подопытных рыб через 3 дня после введения. После насильственного введения лекарственной формы «Витарола-Е» у рыб сохранялся аппетит и они хорошо поседали корм.

В экспериментах по изучению **хронической** токсичности препарат задавали рыбам с кормом в терапевтической и повышенной дозировках на протяжении 20 дней по 75 и 750 мг/кг массы тела. После скармливания лечебных кормов следили за поведением рыб в аквариуме. Было установлено, что препарат в терапевтической и превышающей дозах хорошо поседали рыбами и не вызывал токсикоза и гибели при скармливании на протяжении 20 дней.

Для выявления **вторичной** токсичности препарат скармливали в терапевтической дозе - 75 мг/кг массы тела, в смеси с кормом на протяжении 30 дней. Очистку дна аквариума от остатков корма и экскрементов проводили один раз в декаду. Все подопытные рыбы остались живы, поведение не отличалось от контрольной группы.

Полученные результаты опыта дают основание считать, что «Витарол-Е» хорошо переносим карпами при скармливании в составе лечебной кормосмеси, а также при насильственном пероральном введении, не обладает хронической токсичностью. Отмечено, что метаболиты препарата

не оказывают негативного действия через кожные покровы и жабры рыб, признаков вторичного токсикоза не выявлено.

### **2.2.6. Испытание профилактической эффективности «Витарола-Е» в аквариальных условиях.**

Для изучения эффективности препарата было сформировано 12 групп карпов по 20 экз. в каждой. Подопытным рыбам задавали корма с препаратом в дозах 50 мг/кг массы рыб, в течение 5 дней из расчета 5% корма к массе рыб. На шестой день рыбам трех опытных и трех контрольных групп внутривентрально вводили вирулентную культуру *A. hydrophila* (штамм ПО11/07/05) в дозе ( $LD_{100}$ ): сеголеткам - 100 млн.м.к., двух- и трехлеткам - 200 млн.м.к. Три разновозрастных контрольных группы карпов инъецировали внутривентрально физраствором. Рыбам контрольных групп на протяжении эксперимента задавали комбикорма, не содержащие «Витарол-Е».

У подопытных рыб, получавших препарат в смеси с кормом, через сутки после внутривентрального заражения аэромонами отмечали незначительный воспалительный очаг в месте введения, покраснение брюшка становилось заметным на третьи сутки. Через 21 день наблюдения установлено, что среди сеголетков выжило 85% особей. В старших возрастных группах - 75% двухлетков, при этом внешние клинические признаки исчезли через 14 дней. В опытных группах рыб трехлетнего возраста выживало 70% карпов.

У рыб контрольных групп первые клинические признаки болезни наблюдали спустя 12 часов после заражения, которые выражались появлением воспалительного очага в месте введения, ерошением чешуи, экзофтальмией, покраснением брюшка, выпячиванием ануса, гидремией. Все рыбы зараженного контроля погибли через 24 часа.

Полученные результаты свидетельствуют, что доза препарата 50 мг/кг массы тела при пятидневном курсе кормления обеспечивает защиту не менее 70% рыб от заболевания аэромонозом и гибели.

### 2.2.7. Биологические свойства аэромонад, выделенных от рыб.

При исследовании рыб из семи рыбоводческих хозяйств различных регионов России было выделено 97 культур аэромонад (табл.4).

Таблица 4

#### Виды аэромонад, выделенные от рыб в различных регионах РФ.

| Название хозяйства                                       | Виды аэромонад       |                  |                  |                      |                 | Общее количество культур, выделенных в хозяйстве |
|--|----------------------|------------------|------------------|----------------------|-----------------|--|
|  | <i>A. hydrophila</i> | <i>A. sobria</i> | <i>A. caviae</i> | <i>A. schubertii</i> | <i>A. media</i> |  |
| ООО «Нептун»<br>Владимирская обл.                        | 3                    | 5                | 3                | 2                    | -               | 13   |
| Охотхозяйство «Озерное»<br>Калужская обл.                | 2                    | 2                | 1                | -                    | -               | 5  |
| КФХ «Аренда»<br>Липецкая обл.                            | -                    | 2                | 2                | 1                    | -               | 5  |
| ООО «Рыбхоз Парские<br>Острова» Московская обл.          | 10                   | 13               | 7                | 7                    | 4               | 41   |
| СХЗАО «Коломенский<br>рыбхоз «Осенка»<br>Московская обл. | 5                    | 6                | 4                | 3                    | 1               | 19   |
| «Рыбхоз им. Абрамова»<br>Ростовская обл.                 | 3                    | 2                | 1                | 2                    | -               | 8  |
| КФХ «Домотканово»<br>Тверская обл.                       | -                    | 2                | 3                | 1                    | -               | 6  |

В результате идентификации аэромонад, выделенных из крови и паренхиматозных органов рыб из хозяйств Московской и Владимирской области установлено, что преобладающими видами являются – *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* и *A. caviae*, виды *A. schubertii* и *A. media* встречаются реже.

Аэромонады, изолированные от карпов «Рыбколхоз им. Абрамова» Ростовской области, самой южной зоны карповодства из обследованных, имели сходную видовую принадлежность с циркулирующими в Центральном регионе.

Следует отметить разнообразие видов аэромонад, выделяемых в Московском регионе, что, по нашему мнению, может быть связано с завозом рыбопосадочного материала и товарной рыбы из других регионов страны для спортивной рыбалки и т.п.

#### Морфология, культуральные и биохимические свойства.

Аэромонады, выращенные при температуре 22°C в течение 20-24 часов, в неокрашенном состоянии и при окраске по Граму представляли собой

короткие, с закругленными концами, расположенные как одиночно, так и парами граммотрицательные палочки. При дифференциальной окраске аэромонад спор и капсул не выявлено. Бактерии в мазках с пластинчатых сред более мелкие (0,5-1,5 мкм), чем в приготовленных из культур с жидких сред (4,0 мкм x 0,7-1,2 мкм). Палочки с одним полярным жгутиком, длина которого в 2-3 раза превышала размеры самой клетки. Бактерии вида *A. media* не обладали подвижностью.

Морфологических различий между штаммами, выделенными от рыб и из воды, не отмечено.

Все штаммы аэромонад, выделенные от больных рыб, обладали выраженными биохимическими свойствами. При постановке теста на оксидазу и каталазу 30% культур первых пассажей давали слаболожительную реакцию, после пятикратного пассирования на питательных средах эти показатели становились более четкими. В результате адаптации бактерий к питательным средам все выделенные штаммы проявляли характерные для рода аэромонад и вида свойства.

### **2.2.8. Биологические свойства аэромонад, выделенных из воды.**

Работу выполняли в рыбоводческих водоемах Московской области. Отобранные пробы воды высевали на плотные накопительные и селективные среды, с которых подозрительные колонии отивали на пластинчатые среды, изучали их чистоту и определяли видовую принадлежность.

Из воды нагульного пруда «Дюгьково» рыбхоза «Нарские острова» выделено 52 культуры аэромонад, по биохимическим свойствам принадлежащих к семи видам. Наибольшее количество – 12 культур - *A. caviae* (23,1%), 9 культур - *A. veronii* (17,3%), 8 культур - *A. sobria* (15,4%), 7 культур *A. hydrophila* – (13,5%), 6 культур *A. schubertii* – (11,5%), 4 культуры *A. media* – (7,7%). Некоторые культуры не обладали характерными ферментативными свойствами, они были объединены нами в группу *A. sp.* (11,5%).

В водоемах рыбхоза «Оссенка» выделено 24 культуры аэромонад, которые принадлежали к шести видам. В данном рыбхозе преобладающим видом был *A.sobria* – 7 культур (29,2%), *A.schubertii* – 5 культур (20,8%), *A.caviae* и *A.veronii* по 4 культуры (33,4%), *A.hydrophila* – 3 культуры (12,5%), и одна культура - *A.media* (4,1%).

При анализе полученных данных установлено, что в обследованных нами водоемах циркулирует шесть-семь видов аэромонад, в то время как от рыб выделили не более пяти. Доминирующими видами являлись *A.caviae* и *A.sobria*, затем следовали *A.hydrophila* и *A.schubertii*, изолированы также культуры обладающие не типичными свойствами.

### 2.2.9. Патогенные свойства аэромонад.

Вирулентность выделенных культур аэромонад для рыб различных видов: карпа, карася, радужной форели определяли методом экспериментального заражения. Подопытных рыб внутрибрюшинно заражали двухсуточными культурами аэромонад, выращенных на плотной питательной среде, в дозе 25, 50, 100, 200, 400, 800 млн.микробных клеток в объеме 0,2 см<sup>3</sup>.

При этом было установлено, что наиболее вирулентными свойствами обладали штаммы *A.sobria*, которые вызывали гибель 50% подопытных карпов и карасей в течение суток после заражения при введении 100 млн.м.к. LD<sub>50</sub> данных культур аэромонад для радужной форели составляет 200 млн.м.к. При экспериментальном заражении рыб аэромонадами вида *A.hydrophila* в дозе 100 млн.м.к. наблюдали 50% гибель карпов и карасей. LD<sub>50</sub> для форели - 200 млн.м.к. Штаммы *A.caviae* были менее вирулентны. Значение LD<sub>50</sub> определено в дозе 800 млн.м.к. Среди штаммов *A.schubertii* только один - вызывал гибель карпов и карасей. При максимальной заражающей дозе 800 млн.м.к. у рыб отмечали слабовыраженные клинические признаки и 10%-ную гибель. Вирулентность аэромонад вида *A.media* для рыб не выявлена.

Среди культур аэромонад, изолированных из воды, только две относящиеся к виду *A. caviae* и *A. sobria*, выделенные в рыбхозе «Нарские острова», обладали вирулентностью. Значение  $LD_{50}$  для этих культур - 800 млн.м.к. Отсутствие вирулентных свойств у большинства аэромонад, выделенных из воды, косвенно подтверждает данные об их естественной циркуляции в системе микробиоценоза водоемов.

#### **2.2.10. Испытание терапевтической эффективности «Витарола-Е» в производственных условиях.**

Для эксперимента были отобраны двухгодовики карпа с клинически выраженными признаками аэромоноза, подтвержденного лабораторными микробиологическими исследованиями. Проведенные вирусологические исследования дали отрицательный результат. До начала опыта и во время контрольных обловов, через каждые 10 дней, у рыб брали кровь для биохимических исследований.

«Витарол-Е» вводили в комбикорм из расчета  $1,5 \text{ см}^3$  на 1 кг корма, что соответствовало суточной дозе 75 мг препарата на 1 кг массы рыб. В контрольном пруду рыбы получали комбикорм без лечебного препарата.

Клиническое состояние подопытных рыб спустя 10 дней после начала курса лечебного кормления характеризовалось заживлением язвенных поражений и эпителизацией кожного покрова. Через 20 дней язвы кожного покрова полностью зарубцевались. Через 30 дней на месте зарубцевавшихся язв появились мелкие чешуйки. Внутренние органы по внешнему виду, консистенции и величине соответствовали физиологической норме. Печень стала более плотной, уменьшился объем почек, исчез мозаичный рисунок.

У части рыб из контрольного пруда отмечали кровотокающие язвы и характерные клинические признаки аэромоноза: экзофтальмия, общее и локальное сращивание чешуи, асцит.

По результатам итогового облова, основные показатели продуктивности были следующими: выход рыбы: в опытном пруду – 82%, в контрольном – 56%; навеска: в опытном пруду - 690гр., в контрольном - 550 гр;

рыбопродуктивность в пересчёте на 1 га площади пруда: - в опытном 967,6 кг/га, 636,0 кг/га в контрольном; кормовой коэффициент: в опытном пруду - 3,7кг, в контрольном - 4,8 кг.

Таким образом, проведенный в производственных условиях опыт показал, что «Витарол-Е» обладает выраженным антибактериальным и антиоксидантным действием. В терапевтических дозах, 75 мг/кг массы тела, способствует элиминации возбудителя аэромоназа и стабилизации окислительных процессов, в пределах физиологической нормы, что позволяет поддерживать необходимый уровень естественной резистентности организма. Отмечено, что препарат не вызывает изменений химических показателей воды.

#### **2.2.11. Сравнительный анализ эффективности антимикробного действия фуразолидона и «Витарола-Е» в условиях товарного карповодства**

Эффективность препаратов при аэромонозе карпов проверяли в р/х «Нарские острова» Московской области. Оценивали клиническое состояние карпов 2-3-летнего возраста, результаты микробиологических и биохимических исследований.

Для сравнения терапевтической эффективности «Витарола-Е» был выбран препарат фуразолидон, который использовали в нагульном пруду согласно наставлению по применению.

Чувствительность аэромонад к препаратам составила: для фуразолидона МБСК – 4,75 мкг/см<sup>3</sup>, МБК – 30,50 мкг/см<sup>3</sup> для *Aeromonas sobria* и 5,50 мкг/см<sup>3</sup>, 22,50 мкг/см<sup>3</sup> соответственно в отношении *A. hydrophila*.

Минимальные концентрации «Витарола-Е» задерживали рост *A. sobria* при 0,25 мкг/см<sup>3</sup>, *A. hydrophila* – 0,50 мкг/см<sup>3</sup>, бактерицидные концентрации для обеих культур составили – 3,75 мкг/см<sup>3</sup>.

Результаты лабораторного тестирования препаратов в последующем совпадали с эффективностью их использования в рыбоводческом хозяйстве. У карпов, получавших в течение пяти суток комбикорм с «Витарол-Е»,

отмечали переход острой и подострой формы аэромоноза в хроническую. На пятые сутки после лечебного кормления у 46% осмотренных рыб на поверхности тела наблюдали некровоточащие язвочки, у остальных начало процесса рубцевания тканей.

При контрольном облове спустя 10 дней установлено отсутствие клинических признаков заболевания и полная эпителизация кожных покровов. Проведенные микробиологические исследования проб крови и паренхиматозных органов дали отрицательный результат. Одновременно отмечена стабилизация значений окислительно-антисептических показателей, которая произошла на седьмой день после окончания лечебного кормления.

Изучение интенсивности течения реакций перекисного окисления липидов и антиоксидантного статуса во время применения фуразолидона и после 10-дневного срока, не выявили его влияния на динамику биохимических процессов. При микробиологическом исследовании отмечали задержку роста бактерий, не влияющую на их биологические свойства, восстановление которых происходило в течение 3-5 пассажей.

Применение для терапии аэромоноза комплексного препарата – «Витарол-Е» позволяет поддерживать в организме рыб необходимый уровень антиоксидантов, повышая тем самым неспецифическую резистентность. Терапевтическое действие препарата «Витарол-Е» в испытанной дозировке приводит к созданию в тканях рыб концентраций, обеспечивающих защиту организма от внедрения и развития аэромонад.

### **3. Выводы**

1. Установлено, что антиоксидантная защита карпов характеризуется следующими показателями ферментативной системы: каталаза – от 4,0 до 5,1 мкМ  $H_2O_2$ /л x мин x  $10^3$ , пероксидаза – от 4,2 до 4,4 ед.опт.мл/л x сек., церулоплазмин – от 30,8 до 37,2 мкМ бензохинона/л x мин., супероксиддисмутаза – от 25,3 до 29,0 ЕД/мл, витамин Е – от 10,5 до 14,5 мг/л.



2. Определено патогенетическое значение свободнорадикального окисления при аэромонозе карпов, характеризующееся снижением активности ферментативного звена антиоксидантной защиты и уменьшении содержания в крови больных рыб витамина Е, в 2,5-3 раза, накоплением токсических веществ перекисей липидов, вследствие нарушения целостности биомембран клеток, что способствует ускоренному развитию болезни.

3. Разработан комплексный препарат «Витарол-Е» для лечения и профилактики аэромоноза карпов. Установлена высокая чувствительность патогенных аэромонад *in vitro*, 0,125 – 3,75 мкг/мл. У карпов, в течение 5 дней получавших препарат, повышается активность системы антиоксидантной защиты и устойчивость к заражению аэромонозом.

4. При сравнительном изучении антимикробного действия фуразолидона и «Витарола-Е» установлено, что задерживающие и подавляющие рост аэромонад концентрации препарата «Витарол-Е» в 5-8 раз меньше, чем у препарата сравнения. При этом в организме поддерживается необходимый уровень антиоксидантов и повышается резистентность рыб к аэромонозу.

5. Терапевтическая концентрация «Витарола-Е» 75 мг/кг массы тела, при пятидневном курсе кормления обеспечивает защиту не менее 70% рыб от заболевания аэромонозом. Препарат «Витарол-Е» применяемый терапевтических дозах безвреден для рыб.

6. От рыб из семи рыбоводческих хозяйств Московской, Владимирской, Тверской, Липецкой, Калужской и Ростовской областей выделено 97 культур аэромонад, пяти видов, различающихся по морфологическим, биохимическим и патогенным свойствам. При этом вид *A. media* был обнаружен только в рыбхозах Московской области. Установлено, что наиболее вирулентными являются штаммы видов *A. sobria* и *A. hydrophila*, вызывающие 100% гибель подопытных рыб в течение двух суток после экспериментального заражения.

7. Из воды двух рыбхозов Московской области выделено 76 культур аэромонад, принадлежащих к семи видам: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*,

A.veronii, A.schubertii, A.media, A.sp. У большинства культур выделенных из воды вирулентные свойства не установлены.

8. В производственных условиях установлено, что при 5-ти дневном курсе кормления, препарат «Витарол-Е» оказывает терапевтическое и профилактическое действие, которое выражается в заживлении язвенных поражений, эпителлизации кожных покровов и стабилизации процессов антиоксидантной защиты у рыб.

#### **4. Практические предложения**

1. Антибактериальный препарат, обладающий антиоксидантными свойствами – «Витарол-Е».

2. «Методические рекомендации по ветеринарному контролю, диагностике и профилактике опасных заболеваний рыб в аквакультуре», рассмотренные и одобренные на секции «Инфекционная патология»; протокол №4 и утвержденные Российской академией сельскохозяйственных наук 01 ноября 2006 года

3. «Методические наставления по определению уровня свободнорадикального окисления и состояния системы антиоксидантной защиты организма рыб», рассмотренные и одобренные на Ученом Совете ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко 19 января 2010 года, протокол № 1.

4. Лабораторный регламент по производству, контролю и применению препарата для лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии «Витарол-Е», утвержденный директором ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко 8 декабря 2009 года, протокол № 15.

#### **5. Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Патент РФ на изобретение №2344824 от 27 января 2009 года: «Препарат для лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии и способ лечения инфекционных заболеваний рыб бактериальной этиологии».

2. Дрошнев, А.Е. Изучение липоперекисного окисления и антиоксидантной защиты организма карпа при стрессе/ Дрошнев А.Е., Борисова М.Н. // Сборник трудов конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных». - Воронеж, 2004, с.28-31

3. Дрошнев, А.Е. Влияние витамина Е на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у рыб при стрессе / Дрошнев А.Е., Борисова М.Н., Костромитинов Н.А. // Межведомственный тематический научный сборник «Ветеринарная медицина-85». - Харьков, 2005. - том 2. - с.395-399.

4. Дрошнев, А.Е. Внутриклеточные изменения при воздействии неблагоприятных факторов / Гулюкин М.И., Суменкова Е.А., Сидоров И.В., Костромитинов Н.А., Дрошнев А.Е. // Межведомственный тематический научный сборник «Ветеринарная медицина-85». - Харьков, 2005. - том 2. - с.1225-1230.

5. Дрошнев, А.Е. Интенсификация процесса ПОЛ у рыб и его регуляция витамином Е / Дрошнев А.Е., Костромитинов Н.А., Борисова М.Н. // Сборник трудов 4 –ой национальной научно-практической конференции «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека». – Смоленск, 2005. - с.352-355.

6. Дрошнев, А.Е. Состояние свободно-радикальных процессов и системы антиоксидантной защиты у некоторых видов пресноводных рыб / Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Костромитинов Н.А., Борисова М.Н. // Ветеринария. – 2006. - №3. – с.51-53.

7. Дрошнев, А.Е. Антиоксидантная защита у карпов при экспериментальном аэромонозе / Дрошнев А.Е., Борисова М.Н. // Ветеринария. – 2007. - №5. – с.25-28.

8. Дрошнев, А.Е. Методические рекомендации по ветеринарному контролю, диагностике и профилактике особо опасных заболеваний рыб в аквакультуре / Борисова М.Н., Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е. // Новые методы исследования по проблемам ветеринарной медицины. – РАСХН., часть IV. – 2.489-506.

9. Дрошнев, А.Е. Неспецифические факторы защиты рыб при использовании комплексного препарата «Витарол-Е» и фуразолидона для лечения аэромоноза / Дрошнев А.Е. // Труды ВИЭВ. – Москва, 2009. – т.75. – с.219-223.

Отпечатано в ООО «Мещёра», М.О., г. Щёлково, ул. Свирская, 8а  
Тир. 100 экз., заказ № 199