5

На правах рукописи

003054955

Неретин Михаил Вячеславович

Ветеринарно-санитарная экспертиза карповых рыб при аэромонозе

16.00.06. – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Москва – 2007

Работа выполнена в лаборатории ветеринарной санитарии на государственной границе, транспорте и мясоперерабатывающих предприятиях Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН).

Научный руководитель:
Заслуженный деятель науки РФ, доктор ветеринарных наук, профессор — М.П. Бутко (ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, профессор — В.А. Долгов (ВНИИВСГЭ)

кандидат ветеринарных наук, профессор — М.Ф. Боровков (МГАВМиБ)

Ведущая организация:
ГОУ ВПО Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Защита состоится «28» марта 2007 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии гигиены и экологии (123022, Москва, Звенигородское шоссе, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии гигиены и экологии.

Автореферат разослан «25» февраля 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета — Е.С. Майстренко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Рыбное хозяйство России представляет собой сложный многоотраслевой комплекс, объединяющий рыбную отрасль, в которую входят, помимо добывающей и обрабатывающей промышленности, аквакультура и ряд специализированных отраслей.

Наша страна располагает громадными возможностями для развития аквакультуры (20 млн. га озер, 4,5 га водохранилищ, 1 млн. га водоемов комплексного назначения, более 150 тыс. га прудов, свыше 300 тыс. кв. м садков и бассейнов). Есть все основания полагать, что существующие в мире тенденции к увеличению доли продукции аквакультуры по отношению к океаническому и морскому промыслу должны быть и в России. На это направлено постановление Правительства России от 31 октября 1999 г № 1201 «О развитии товарного рыбоводства, осуществляемого во внутренних водоемах Российской Федерации» и разработанная Росрыбхозом Федеральная программа «Аквакультура России в период до 2005 года», а также Концепция развития рыбного хозяйства российской Федерации на период до 2020 года, одобренная Распоряжением Правительства РФ от 02.09. 2003 г., за №1265-р. (Никоноров С.И., Кожемяко О.Н., 2006).

Однако, нарушение технологических процессов рыбоводства и продолжающийся в настоящее время рост уровня загрязнения окружающей среды способствует резкому увеличению числа бактериальных болезней прудовых рыб – объектов аквакультуры. Если не так давно ихтеопатологи сталкивались с тремя- четырьмя бактериальными болезнями, то теперь их количество перевалило за два десятка, и список это далеко не окончательный. Сейчас актуальной на современном этапе интенсивного рыбоводства является профилактика заболеваний, вызываемых грамотрицательными и другими микроорганизмами в т.ч. и аэромонадами. Нередко пораженная рыба является источником серьезных заболеваний человека и животных. Среди этих заболеваний представляет опасность

24

аэромоноз, который поражает большинство видов карповых рыб, все виды лососевых, отмечено поражение этим заболеванием угрей, лягушек, змей, ящериц, пиявок, крабов (Шербина А.К., 1960; Лобунцов К.А., 1970, 1979; Канаев А.И., 1972; Бутко М.П., Радин И.Д., 1974; Афанасьев В.И., 1986; Юхименко Л.Н., 1987; Осетров В.С., 1988; Соторов П.П., 1999; Грищенко Л.И. и соавт., 1999; Зимин Н.Л., 2000; Кунаков А.А. 2004; Наумова А.М. 2005; Енгашев В.Г 1968, 2005 и др.).

Аэромоноз является частью общемировой экологической проблемы, опосредованно связанной с деятельностью человека, всевозрастающим использованием в пищу пресноводных рыб и других гидробионтов контаминированных этим возбудителем (Афанасьев В.И., 1990; Смирнов А.М., Скира В.Н., 2000; Коромыслов Г.Ф., Борисова М.Н., 2000; Белоусов В.И., 2005).

Впервые клиническое значение аэромоноза, как заболевания для человека, было доказано Hill B. J. et al. в 1954 г. (цитировано по Погореловой Н. И. и соавт., 1995г.). Они наблюдали течение болезни с признаками септического метастатического миозита со смертельным исходом. В дальнейшем заболевание среди людей отмечено многими авторами (Miles A. A. et al., 1937; Schubert R., 1967; Caselitz F., 1966; Чайка Н.А.и соавт., 1986; Журавлева Л.А. и соавт., 1992; Карташова Е.В. и соавт., 1994 и др.).

Поэтому, в целях усиления постоянного ветеринарного контроля за рыбой и качеством пищевой продукции, получаемой из рыб, как возможных источников бактериальной инфекции, необходимо, прежде всего, решить вопросы ветеринарно-санитарной экспертизы и оценки рыб и рыбопродуктов, в частности при аэромонозе.

Этим обосновывается выбор и актуальность темы научно-исследовательской работы.

Цель и задачи исследований. Целью настоящего исследования является разработка вопросов ветеринарно-санитарной экспертизы рыбы при аэромонозе с решением следующих задач:

1. Изучить распространенность аэромоноза среди карповых рыб;
2. Провести исследования по изучению органолептических и физико-химических показателей мяса рыб, пораженных аэромонозом;
3. Изучить микробную обсемененность карпов при аэромонозе;
4. Изучить устойчивость возбудителя аэромоноза к воздействию ряда физических и химических факторов;
5. Предложить научно-обоснованную ветеринарно-санитарную оценку рыбы при аэромонозе и режимы ее обезвреживания.

Научная новизна. Определены органолептические, физико-химические и микробиологические показатели рыб, пораженных аэромонозом на разных стадиях течения болезни.

Установлено, что при аэромонозе выделение аэромонад (A.hydrophila) и сопутствующей микрофлоры (S. enteritidis, E. coli, St. aureus, Pr. vulgaris) из органов и тканей имеет место уже в начальной стадии заболевания рыб (наличие на коже небольших единичных красных пятен).

Выделенные из рыб культуры аэромонад агглютинировали в РА с О-комплексными (серогруппы ABCDE) и монорецепторными сыворотками (О-соматические и Н-жгутиковые), что свидетельствует о наличии у аэромонад и сальмонелл некоторых общих антигенных факторов.

Проведенными исследованиями разработаны режимы обезвреживания мяса рыб, пораженных аэромонозом, при воздействии высоких и низких температур, процессов посола, копчения и СВЧ.

Дано обоснование, что при поражении карпов аэромонозом, в начальной стадии заболевания, направлять их на обезвреживание по предлагаемым режимам с последующей переработкой на пищевые рыбные продукты.

Изучены методом электронно-микроскопического исследования морфологические особенности бактерий Aeromonas hydrophila на жидких и плотных средах обитания; определена способность аэромонад к размножению и персистенции в кишечнике карповых рыб.

Проведенными исследованиями определена устойчивость культур аэромонад (Aeromonas hydrophila) к воздействию высоких температур (73^0 С и выше), 15 наименований антибиотиков (среди которых ципрофлоксацин, норфлоксацин и цефатоксим обладают наибольшей бактерицидной активностью), УФЛ, УЗ, озону и химическим средствам (Аламинолу, Бианолу, Йодезу, Септустину, Дезамину).

Подготовлена и представлена в Федеральный институт промышленной собственности заявка на патент «Способ дезинфекции водной среды от возбудителя аэромоноза карповых рыб». Заявка № 2007102836/13 от 26.01.2007 г.

Практическая ценность работы. На основании проведенных исследований подготовлены предложения по проведению ветеринарно-санитарной экспертизы карповых рыб при аэромонозе и определению устойчивости аэромонад к физико-химическим факторам, которые включены в разработанные нами «Методические рекомендации по ветеринарно-санитарной экспертизе карповых рыб при аэромонозе и определению устойчивости аэромонад к физико-химическим факторам». (Утв. Отделением ветеринарной медицины РАСХН 04.07.2005 г.).

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- заседаниях ученого совета ВНИИВСГЭ (2002,2003 гг.);
- на научно-практической конференции «Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве» (г. Чебоксары 2004 г.);
- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2006г.).

Публикации. По результатам выполненных исследований опубликовано 5 научных статьей.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы и приложений. Работа содержит 16 таблиц, 20 рисунков, 2 диаграммы. Список литературы включает 153 источника отечественных и зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Диссертационная работа выполнена в период с 2000 по 2005 гг., в лаборатории ветеринарной санитарии на государственной границе, транспорте и мясоперерабатывающих предприятиях ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН, а также на базе рыбхоза «Гжелка» Раменского района, на рыбокомбинате «Бисеровский» Ногинского района, в ЗАО «Рыбхоз Клинский» Клинского района Московской области и на продовольственном рынке г. Москвы – «Водный стадион», на НПП «Антарес» и ГНПП «Дельта» (Москва), сотрудникам которых выражаем искреннюю благодарность за организационно-техническое содействие.

Выражаем благодарность к.б.н., ст.н.сотруднику ВНИИПРХ Юхименко Л.Н. за предоставленные музейные штаммы бактерий A.hydrophila (№№ 147 – 25; 164 - 19), а также профессору Павловой И.Б. за содействие в проведении электронно-микроскопических исследований при изучении популяции микробных клеток аэромонад.

Органолептическую оценку и отбор проб для лабораторных исследований проводили согласно ГОСТу 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний» (переиздан с изменениями в 1991

г.). Исследования на физико-химические показатели рыб проводили согласно «Правилам ветеринарно-санитарной экспертизы пресноводной рыбы и раков (М., 1998) и ГОСТа 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа» (М., 1985) и ГОСТа 24896-81 «Рыба живая. Технические условия» (переиздан с изменениями в 1997 г.).

Бактериологические исследования при выделении аэромонад из рыб проводили согласно «Инструкции о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб» (1998). Посевы проводили из внутренних органов, крови, с мест поражений кожной поверхности карпов на МПА, МЖА, МПБ, Эндо и Плоскирева с последующей идентификацией подозрительных культур по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

При изучении микробной обсемененности мясо больных и здоровых рыб исследовали по следующим показателям: КМАФАнМ, наличие сальмонелл, кишечной палочки, протея, стафилококков. В этом случае руководствовались ГОСТом 26670-91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов» и «Инструкцией по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных» (Сазонова А.С., Мухина Л.Б., Крылов В.А., 1991).

При разработке режимов обезвреживания мяса рыб, пораженных аэромонозом (карп чешуйчатый и зеркальный), были отобраны экземпляры карпов, находящиеся в начальной стадии заболевания (единичные очаговые красные пятна на кожной поверхности). В качестве контроля каждой серии опытов проводили микробиологические исследования мышечной ткани карпов на наличие аэромонад (A.hydrophila) до и после обеззараживания (посевы на МПБ и МПА). При обезвреживании мяса больных карпов испытаны следующие режимы: метод замораживания при температуре -12°С, при воздействии высоких температур (путем проварки, прожаривания и

копчения). Обработку в микроволновой печи (фирма «Samsung», Англия) проводили при мощности 750W в течение 3,5-4,0 минут, посол с использованием раствора NaCl (200г/л и 250 г/л).

Электронно-микроскопические исследования аэромонад проводили с целью изучения морфологических особенностей их строения, а также выяснения механизма воздействия A.hydrophila на слизистую оболочку кишечника рыб и воздействия ципрофлоксацина (антибиотика) на популяцию клеток возбудителя аэромоноза. Просмотр препаратов осуществляли с помощью электронного микроскопа «Hitachi-800» со сканирующей приставкой «Hitachi-8010» (Япония), при ускоряющем напряжении 75 кВ и инструментальном увеличении 1-30000. Просмотр образцов препаратов сопровождали выборочной фотодокументацией. Для съемки использовали фотопленку FN-64 производственного объединения «Свема».

Изучена устойчивость полевых и музейных культур возбудителя аэромоноза (A.hydrophila № 2 (производственная культура) A.hydrophila № 164-19; A.hydrophila № 147-25; A.caviae № 392-4) к воздействию физических и химических факторов: в водной среде к плюсовым температурам; к антибиотикам 15 наименований; к озону различной концентрации в водной среде (стерильная водопроводная, из артезианской скважины и из озера Мележа); к ультразвуку в водной среде (перечень проб вод приведен выше); к УФ-излучению на различных тест-поверхностях (металл, метлахская плитка, кирпич и дерево) при различных дозах и экспозициях 15,12 – 45,36 Вт./с/см^2; к воздействию химических средств, в частности Дезамина, Септустина, Аламинола, Бианола и Йодеза при применении различных концентраций (0,5…3%) при экспозиции 30-60 мин и расходе 0,5 л/м^2.

Для определения устойчивости аэромонад к плюсовым температурам (от 20 до 100^0 С) проводили подогрев воды со взвесью культур (в концентрации 2 млрд.м.т/мл) с последующим отбором проб через каждые 5 мин, посевом

их на питательные среды и учетом роста культуры. Эффект инактивации учитывали по отсутствию роста культуры при достижении определенной температуры водной среды. Для определения чувствительности возбудителей A.caviae и A.hydrophila к антибиотикам использовали метод диффузии в агар с применением дисков фирмы «НИЦФ» (С.-Петербург).

В опытах с применением озона использовали озонатор – «Микросан» ОП-4К (для озонирования воды), выпускаемый ООО НПП «Антарес» (г. Москва). Для определения концентрации озона в водных растворах применяли химический метод анализа путем йодометрического титрования согласно ГОСТу 18301-72 «Вода питьевая, методы определения содержания остаточного озона» (переиздан с изменениями в 1977 г.).

При изучении воздействия ультразвука на возбудителя A.hydrophila (штамм №164-19) в водной среде использована ультразвуковая установка УЗГ-04, ГНПП «Дельта» (г. Москва) с выходной мощностью 30 Вт и с тремя вибраторами из пьезокерамики марки ЦТБС-7∅40 мм с частотой излучения 22 кГц.

При изучении воздействия УФ-излучения на культуры аэромонад использовано устройство в блоке из 2-х бактерицидных ламп ДБ-30-1 общей мощностью 60 Вт. Для определения дозы УФ - облучения на единицу обработанной площади тест-поверхности (см^2) использовали методику «Определение УФ-облучения и расчета мощности бактерицидного потока УФ-лучей на единицу обрабатываемой площади» (2002).

Исследования по изучению устойчивости аэромонад к воздействию химических средств проводили в соответствии с требованиями «Методических указаний о порядке испытания новых дезинфицирующих средств для ветеринарной практики» (1987) и «Методических указаний по контролю качества ветеринарной

дезинфекции объектов животноводства» (2002). Для нанесения препаратов на поверхности объектов использована новая моечно-дезинфекционная установка «Аист-8У». Препарат наносили на обрабатываемые поверхности при давлении 3 атм.

Экспериментальные данные подвергали статистической обработке по Стьюденту с определением средней арифметической, среднего квадратичного отклонения (Мальта Ю.С., Тарасова В.В., 1985).

Результаты исследований.

1. Анализ распространенности аэромоноза карповых рыб.

При изучении распространенности аэромоноза, проведенного на основе материалов статистической отчетности Департамента ветеринарии МСХ Российской Федерации установлено, что данное заболевание у карповых рыб имеет широкое распространение. Так, среди рыб по рыбоводным хозяйствам на территории РФ показатели распространенности инфекционных болезней составляют – 31%, среди которых на аэромоноз карповых рыб и фурункулез лососевых приходится – 11%. Было зарегистрировано неблагополучных пунктов по аэромонозу карповых (по годам): в 2000 – 34, 2001 – 34, 2002 – 37, 2003 – 32, 2004 – 24 и в 2005 - 179 пунктов.

При изучении распространенности аэромоноза среди карповых в рыбоводных хозяйствах Московской области нашими исследованиями подтверждено неблагополучие следующих рыбхозов: «Клинский», «Бисерово», «Гжелка». Так, при комиссионном обследовании в ЗАО «Рыбхоз Клинский» нагульных прудов пораженность рыб аэромонозом в мае составила 8-10%, а в июне 30-64%. При клиническом обследовании больной рыбы (карпа зеркального и карпа чешуйчатого) в

обследовании больной рыбы (карпа зеркального и карпа чешуйчатого) в этих хозяйствах было отмечено как острое, так и подострое течение болезни. Во всех случаях при исследовании больной рыбы из органов и тканей была выделена и идентифицирована культура A.hydrophila. Её патогенность подтверждена постановкой биопробы на карпах, у которых клинические признаки аэромоноза отмечены на 5 день после заражения, а при вскрытии – патологоанатомические изменения, характерные для острой формы данного заболевания.

2. Органолептические показатели мяса рыбы, пораженной аэромонозом.

Для определения органолептических показателей мяса рыб при аэромонозе отбирали из неблагополучных по данному заболеванию рыбоводных хозяйств Московской (ЗАО «Рыбхоз Клинский» и др.) области экземпляры карпов в начальной стадии заболевания (с наличием единичных красных пятен на коже) и исследовали по комплексу показателей. В качестве контроля использовали мясо здоровых карпов. Ветеринарно-санитарная же оценка карпов в стадии острого и подострого течения болезни является нецелесообразной, так как наблюдаемые при этих формах дистрофические изменения, гидродермия мышц и всех внутренних органов, общая водянка тела и другие явления (развитие микрофлоры) делают их непригодными для применения в качестве пищевого продукта и они должны направляться, согласно «Правилам ветеринарно-санитарной экспертизы пресноводной рыбы и раков» (1989), в корм животным после термической обработки или утилизироваться.

Результаты исследований органолептических показателей мяса рыб в начальной стадии заболевания отражены в таблице 1.

Таблица 1.

Органолептические показатели карпов при начальной стадии аэромоноза

Наименование показателей	Больные карпы в начальной стадии заболевания. (n=3)	Здоровые карпы. (n=3)
Внешний вид	Рыба со слабой двигательной активностью	Рыба, проявляющая все признаки жизнедеятельности с нормальным движением жаберных крышек
Состояние чешуйчатого покрова	Отмечается ерошение чешуи на отдельных участках	Поверхность рыбы чистая, естественной окраски, присущей данному виду рыбы. Чешуя плотно прилегает к телу.
Состояние: слизи	мутноватая	тонкий слой слизи, прозрачная
глаз	выпуклые, несколько выдаются вперед	светлые, выпуклые без повреждений
брюшка	стенка брюшка слабо напряжена	брюшко не вздуто, мягкое
Мышечная ткань: цвет	белесовато-сероватый, свойственный здоровой рыбе	белесовато-сероватый, свойственный здоровой рыбе
запах	свойственный живой рыбе	свойственный живой рыбе
консистенция	плотная	плотная
Проба варкой	бульон слегка мутноватый, со специфическим рыбным запахом и вкусом	бульон прозрачный, слегка мутноватый, со специфи-ческим рыбным запахом и вкусом

Как можно видеть из таблицы 1, органолептические показатели мяса здоровых рыб и в начальной стадии заболевания аэромонозом имеют несущественные различия, в частности, касающиеся чешуйчатого покрова, слизи, стенки брюшка.

3. Микробиологические исследования рыбы при аэромонозе.

Материалом для исследования служили экземпляры карпов из неблагополучных по аэромонозу рыбхозов Московской области с клиническими признаками заболевания в начальной стадии (наличие на коже небольших единичных красных пятен), с явными характерными клиническими признаками, присущими острой форме аэромоноза, а также при экспериментальном аэромонозе. В качестве контроля использовали клинически здоровых рыб с р/х «Малая-Истра», благополучного по данному заболеванию. Одновременно были проведены исследования по выделению из рыб, пораженных аэромонозом, сопутствующей микрофлоры, в частности сальмонелл, кишечной палочки, золотистого стафилококка и протея. Результаты этих исследований приведены в таблице 2.

Как показывают данные проведенных исследований, выявление возбудителя аэромоноза отмечается у карпов, как в начальной стадии заболевания, так и у карпов с явными клиническими признаками аэромоноза. Выделение аэромонад отмечается также при экспериментальном аэромонозе из внутренних органов рыб, когда отмечены только первые клинические признаки появления заболевания. Полученные данные свидетельствуют, что карповые рыбы уже на начальной стадии заболевания аэромонозом в ветеринарно-санитарном отношении представляют опасность, как пищевой продукт. Выделенные культуры возбудителя аэромоноза для подтверждения их типичности исследовали по ряду показателей: культурально-морфологическим и биохимическим свойствам (определению оксидазной активности, аэробному окислению (к/г), образованию к/г на среде Гисса с маннитом, на средах с глюкозой, сахарозой и мальтозой, образованию сероводорода и протеолитической активности на среде с лакмусовым молоком). Эти показатели совпадают с таковыми музейных штаммов аэромонад (контроль).

Таблица 2.

Результаты микробиологических исследований карпов, пораженных аэромонозом.

№ п/п	Исследуемые органы	Выделение аэромонад и сопутствующей микрофлоры из рыб															
		Клинически здоровая рыба (контроль). n=3					При поражении в начальной стадии (единичные красные пятна на коже). n=6					При клинических признаках острой формы аэромоноза. n=10					При экспериментальном аэромонозе. n=3
		A.	S.	St.	E.	Pr.	A.	S.	St.	E.	Pr.	A.	S.	St.	E.	Pr.	A.hydrophila
1.	Кожный покров	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
2.	Мышечная ткань	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
3.	Сердце	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
4.	Печень	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
5.	Почки	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
6.	Кровь	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7.	Жабры	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	н/и

Примечание:
A - A hydrophila,
St - St aureus,
S - Salm enteritidis;
E - E coli,
Pr - Pr vulgaris;
"+" - выделение культур,
"-" - культура не выделена,
"н/и" - не исследовано

При проведении исследований на наличие в органах и тканях сопутствующей микрофлоры установлено следующее:

- при бактериоскопии мазков из поверхностных слоев мышц обнаружены кокки и палочки в количестве 4-5 в нескольких полях зрения;
- общая микробная обсемененность (КМАФАнМ) рыбы составила $1x10^4 \pm 50$ КОЕ/г;
- при поражении аэромонозом в начальной стадии заболевания были выделены сальмонеллы из жабр (идентифицирован серовариант S. enteritidis); золотистый стафилококк (St. aureus) – из жабр, мышечной ткани; кишечная палочка (E. coli) – из жабр и мышечной ткани; протей (Pr. vulgaris) – из печени и жабр;
- при острой форме аэромоноза выделены сальмонеллы с поверхности кожного покрова, мышечной ткани и жабр (S. enteritidis); золотистый стафилококк – с поверхности кожного покрова и мышечной ткани; кишечная палочка – с поверхности кожного покрова, мышечной ткани, жабр; - протей – с поверхности кожного покрова и жабр;
- у клинически здоровой рыбы (контроль) были выделены только из ткани жабр золотистый стафилококк, кишечная палочка и протей; КМАФАнМ составила $1x10^3 \pm 10$ КОЕ/г. При бактериоскопии мазков из поверхностных и глубоких слоев мышц отмечены единичные (1-2) кокки и палочки в нескольких полях зрения. Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01, допустимый уровень КМАФАнМ в рыбе-сырец составляет не более КОЕ/г $5x10^4$.

Имея в виду сообщение ряда авторов (T.H. Tjotta ef al., 1956, Г.М. Иванова, 1968 и др.), что у аэромонад и сальмонелл выявлено наличие общих антигенов, нами исследованы культуры аэромонад (музейные и производственные штаммы) в пластинчатой реакции агглютинации с сальмонеллёзными О-комплексными и монорецепторными О- и Н-

агглютинирующими сыворотками. Установлено, что аэромонады (на примере A.hydrophila и A.caviae) агглютинируют в РА с О-комплексной сальмонеллёзной и монорецепторной сыворотками (с рецепторами О-3, О-14 и О-34), а так же с Н-рецептором. Полученные данные позволяют высказать предположение, что аэромонады имеют некоторые антигенные факторы (О- и Н-) общие с сальмонеллами. Как известно, представители родов Salmonella и Aeromonas являются патогенными не только для животных, но и для человека, вызывая у них заболевания относительно сходные по клиническим признакам.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что выделение аэромонад имеет место не только при острой форме аэромоноза, но и в начальной стадии заболевания. Такая рыба в ветеринарно-санитарном отношении является не только источником распространения инфекции, но и представляет опасность, как пищевой продукт. Кроме того, следует учитывать, что заболевание сопровождается наличием возбудителей вторичных инфекций, в частности сальмонелл, при наличии которых такая рыба не подлежит свободной реализации.

4. Физико-химические показатели мяса рыб при аэромонозе.

Были изучены физико-химические показатели мяса карпов в начальной стадии заболевания в сравнительном аспекте с пробами мяса здоровых рыб (pH, микроскопия мазков-отпечатков, реакция на пероксидазу, определение сероводорода, реакция на содержание амино-амиачного азота, реакция с $CuSO_4$, определение содержания влаги в мясе рыбы (% в 100 г сырой ткани)), которые представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Физико-химические показатели мяса карпов при начальной стадии аэромоноза.

Показатели исследований	Исследуемые пробы мяса карпов в начальной стадии заболевания аэромонозом (п=3)	Контрольные пробы мяса здоровых карпов (п=3)
pH	6,92	6,90
Микроскопия мазков-отпечатков мышечной ткани	В мазках-отпечатках на стекле не выявлено остатков разложившейся ткани.	В мазках-отпечатках на стекле не обнаружено остатков разложившейся ткани
Реакция на пероксидазу (бензидиновая проба)	Сине – зеленая окраска водной вытяжки	Сине – зеленая окраска водной вытяжки
Определение сероводорода с подогревом проб	Реакция отсутствует (индикаторная бумага белая)	Реакция отсутствует (индикаторная бумага белая)
Реакция на содержание амино-амиачного азота	0,72 мг в 10 мл фильтрата	До 0,69 мг в 10 мл фильтрата
Определение продуктов первичного распада белков в бульоне (Реакция с сернокислой медью)	бульон слегка мутноват	бульон почти прозрачный
Определение содержания влаги в мясе рыбы (% в 100 г сырой ткани)	< 79,5	78,7

Примечание: - pH свежего мяса рыб 6,9;
pH мяса сомнительной свежести 7,0 – 7,2;
pH несвежего мяса 7,3 и выше.

Как показывают полученные данные, физико-химические показатели мяса карпов как здоровых, так и в начальной стадии аэромоноза резко не отличаются. Вместе с тем, отмечено у больных рыб легкое помутнение бульона и увеличение влаги в мышечной ткани на 0,8 %, что находится в пределах колебаний нормы.

5. Обезвреживание карповых рыб, пораженных аэромонозом.

Исследования проведены с целью разработки режимов обезвреживания рыбы при аэромонозе с применением физических и химических факторов, в

частности режимов воздействия высоких и низких температур, процессов посола, горячего копчения и применения СВЧ – излучение, что показано в таблице 4.

Таблица 4.

Режимы обезвреживания карповых рыб при аэромонозе

№ п/п	Физические и химические факторы	Время обезвреживания (экспозиция) n=14
1	**Замораживание рыбы при температуре - 12°С.**	7 суток
2	**Проварка рыбы в воде (при достижении температуры в толще куска рыбы не менее +80° С)**	**5-6 мин (с момента закипания)**
3	**Прожарка на открытых противных кусками массой 100 г в пластованном виде**	20 мин.
4	**Горячее копчение (посол 4%-ным раствором хлорида натрия в течении 1,5 часа при температуре 20^0С, подсушивание при температуре 65^0С в течении 15 мин и копчение в камере при температуре 130°С в течении 40 мин)**	**В соответствии с действующей технологической инструкцией (Шалак М.В. и соавт., 1998;** Голубев В.Н. и соавт., 2001)
5	**СВЧ-излучение (при температуре в толще куска +80°С) при мощности 750 W**	3,5-4 мин
6	**Посол рыбы с применением хлорида натрия:** **солевой раствор 200 г/л;** **солевой раствор 250 г/л**	 **7 дней** **5 дней**

В результате проведенных исследований (таблица 4) установлено, что процессы замораживания, термической обработки (варка, жарка, горячее копчение, СВЧ-излучение), посола (растворами NaCl с концентрацией 200 г/л и 250 г/л) обеспечивают 100%-ную гибель аэромонад в рыбе, и она становится безопасной, как пищевой продукт, для человека.

С ветеринарно-санитарной точки зрения и приемлемости технологических процессов, на наш взгляд, в первую очередь заслуживают применение режимы низких и высоких температур. Применение СВЧ-печей является перспективным технологическим процессом.

6. Электронно- микроскопические исследования

В результате проведенных исследований установлено:

- бактерии A.hydrophila через 24 часа роста на плотных питательных средах (МПА) имеют определённую ориентацию и плотно прилегают друг к другу, объединённые межклеточным матриксом. На отдельных участках колоний выявляются покровы в виде тонкой плёнки, через которую видны очертания клеток (Рис. 1, 2). В поздние сроки роста культуры (48 ч. и более) наблюдается её переход в состояние гетероморфизма с различными проявлениями L-трансформации (Рис. 3);

Рис.1. Фрагмент колонии A.hydrophila. Видны плотно упакованные удлиненные бактериальные клетки, объединенные межклеточным матриксом. 24 ч роста. Сканограмма х 5000.

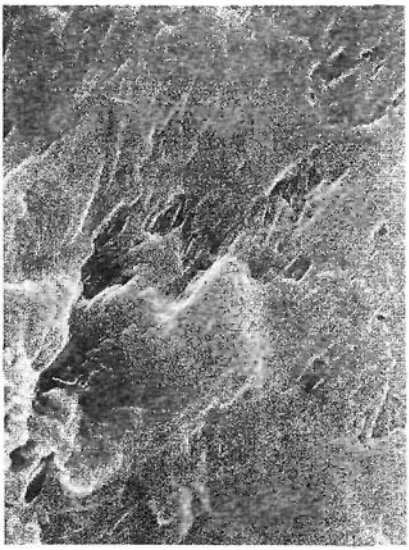
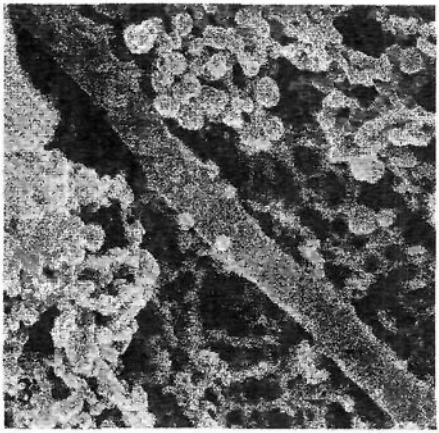


Рис. 2. Фрагмент колонии A.hydrophila. Под пленкой однородная популяция клеток в S-форме. 24 ч роста. Сканограмма х 5000.



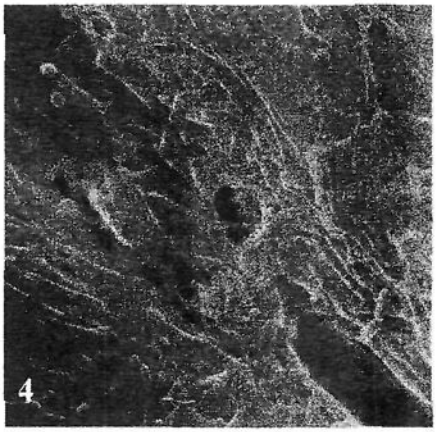
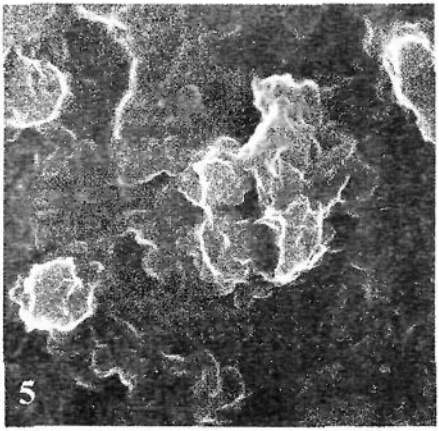


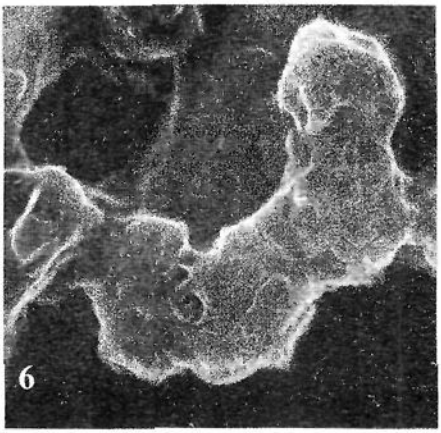
Рис. 3. Популяция клеток A.hydrophila 48 ч роста. Клетки в стадии L-трансформации.
Рис. 4. Фрагмент кишечника рыбы, контаминированной Aeromonas hydrophila. На поверхности ткани, которая разрушена, видна адгезия и колонизация бактерий начало L-трансформации с образованием клеток сферопластного типа.

- отмечено воздействие A.hydrophila на слизистую кишечника рыб в виде разрывов тканей. На поврежденных участках слизистой оболочки кишечника видны единичные и делящиеся адгезиированные клетки, образование длинных клеток в виде цепочек, что является характерным для начального процесса гетероморфизма. На отдельных участках наблюдали начало L-трансформации с образованием клеток сферопластного типа. Вокруг наиболее разрушенных участков слизистой оболочки кишечника (разрывов) наблюдается её колонизация бактериями (Рис. 4);

- бактериальные клетки A.hydrophila в водной среде находятся не изолированно, а в виде макро- и микроколоний, окруженных со всех сторон покровами. При добавлении в водную среду (контаминированную аэромонадами) ципрофлоксацина в дозе 10 мкг/мл и его воздействия в течение 60 мин наблюдается нарушение покровов и начальный этап гетеромофизма клеток в виде изменения формы клеток и их уплощения;

отмечается переход части популяции клеток в L-трансформацию с образованием L-форм. Бактерии изменяли свою форму за счет нарушения структуры клеточной стенки. В результате этого выявлялись клетки сферопластного типа, объединённые общими тяжами. На отдельных участках таких тяжей были видны мелкие L-формы (Рис. 5, 6).





Обитание популяции Aeromonas hydrophila в водной среде:
Рис 5. Отмечается образование микроколоний, с поверхности закрытых покровами, под которыми нередко просматриваются очертания бактериальных клеток.
Рис. 6. На рисунке видны сформировавшиеся микроколонии закрытые покровами. Под покровами клетки A.hydrophila не просматриваются.

Таким образом, наблюдаемые нами процессы L-трансформации аэромонад представляют собой, на наш взгляд, ответную реакцию на воздействие абиотических факторов и являются закономерным процессом для бактерий, независимо от их вида.

6. Изучение устойчивости культур возбудителя аэромоноза карповых рыб к некоторым физическим и химическим факторам.

Изучена устойчивость аэромонад к воздействию плюсовых температур, антибиотиков, озона, ультразвука, УФ-излучения и ряда химических средств

(Дезамин, Септустин, Аламинол, Бианол и Йодез) по методикам, изложенным в разделе «Материалы и методы».

На основании проведенных исследований установлено:

- культура аэромонад в физиологическом растворе (pH 7,3) при концентрации 2 млрд.м.тел/мл оставалась жизнеспособной при температуре от $+20^0$ до $+65^0$С, а при 73^0 С и выше погибала моментально;

- среди испытанных 15 наименований антибиотиков наибольшей бактерицидной активностью в отношении аэромонад (зона задержки роста) обладали представители из группы фторхинолонов – ципрофлоксацин (ЗЗР до 52 мм) и норфлоксацин (ЗЗР до 48мм); цефатоксим третьего поколения из группы цефалоспоринов (ЗЗР до 42 мм);

- обеззараживание озоном воды, контаминированной возбудителем аэромоноза, достигается после экспозиции 30 сек и остаточной концентрации озона соответственно – в водопроводной воде 7,42 мг/л; в воде из артезианской скважины – 15,01 мг/л и в озерной воде – 19,92 мг/л;

- инактивация аэромонад в воде различного происхождения при воздействии ультразвука достигается через 35-40 мин при применении установки УЗГ – 04 с мощностью 30 Вт и частотой излучения 22 кГц;

- эффективными режимами обеззараживания с применением УФ-излучения тест-поверхностей, контаминированных аэромонадами, являются при общей дозе облучения и бактерицидном потоке соответственно: для - кирпича и дерева 45,36 Вт·с/см^2 и 4,536 Вт·с/см^2 при экспозиции 45 мин; для метлахской плитки и металла (сталь марки 45) - 15,12 Вт·с/см^2 и 1,512 Вт с/см^2 и экспозиции 15 мин;

-лабораторными опытами и производственными испытаниями установлено, что препараты «Дезамин», «Септустин», «Аламинол», «Бианол» и «Йодез» являются эффективными (99,99-100%) при санитарной обработке поверхностей помещений, инфицированных аэромонадами, при их применении в 1-2%-ных концентрациях и экспозициях 60-30 мин.

8. Экономическая эффективность применения химических средств.

На базе ЗАО «Рыбхоз Клинский» Московской области проведена сравнительная оценка вышеназванных препаратов не только с точки зрения их эффективности, но и экономической целесообразности. Установлено, что препарат «Дезамин» обладает наименьшей пенообразующей способностью в сравнении с препаратами «Септустин», «Аламинол», «Бианол» и «Йодез». Кроме того, препарат имеет наименьшую стоимость (68 руб./кг) в сравнении с другими испытанными препаратами. Стоимость обработки одного бассейна (39,65 $м^2$) составляет при применении препарата «Дезамин» в 1% концентрации – 13,48 руб., а при 2% - 26,69 руб., что в 3-4 раза меньше по сравнению с другими средствами.

Целесообразность применения препарата «Дезамин» в рыбоводных хозяйствах подтверждена проведенными комиссионными испытаниями и одобрена специалистами, занимающимися выращиванием и переработкой рыбы.

Выводы

1. При анализе эпизоотологической ситуации в рыбоводных хозяйствах Российской Федерации и собственными исследования по Московской области в период 2000-2005 гг. установлено, что аэромоноз среди карповых рыб имеет значительное распространение. Его удельный вес среди заразных заболеваний рыб составляет не менее 11%. Определено, что во всех случаях (в т.ч. в Московском регионе) этиологическим фактором является культура A.hydrophila, а пораженность рыб аэромонозом составляет от 10 до 64%.

2. При микробиологическом исследовании больных аэромонозом карповых рыб выделение возбудителя (A.hydrophila) отмечается (практически из всех органов и тканей) как на начальной стадии заболевания, так и у карпов с явными клиническими признаками болезни, что сопровождается наличием возбудителей вторичных инфекций (сальмонелл, кишечной палочки, стафилококков, протея).

3. Проведенными исследованиями установлено, что на питательных средах МПА, Плоскирева, Эндо, Эндо с молоком, эритрит-агаре, МПБ, кампилобакагаре наблюдается рост культуры аэромонад в виде колоний в S-форме в течение 24 часов инкубации при t + 37^0 С и они (среды) могут быть использованы при выделении аэромонад из биологического материала (в частности, рыб).

4. Установлено, что по органолептическим (внешний вид, состояние чешуйчатого покрова; жабр; глаз, цвет, запах и консистенция мяса) и физико-химическим показателям (pH, реакция на пероксидазу, сероводород, с сернокислой медью, на содержание амино-амиачного азота, содержание влаги) мясо карпов в начальной стадии аэромоноза (наличие на коже единичных красных пятен) существенно не отличается от таковых показателей мяса здоровых рыб.

5. Предложены режимы по обезвреживанию карпов, пораженных аэромонозом (в начальной стадии течения болезни), с применением низких температур: замораживание при t -12^0 С и экспозиции 7 суток; проварка рыбы (при достижении температуры в толще куска рыбы не менее 80°С) – 5 – 6 мин (с момента закипания); прожарка на открытых противнях кусками массой 100 г в пластованном виде – 20 мин; горячее копчение при температуре 130°С; СВЧ-излучение при температуре в толще куска 80°С при мощности 750 W - 3,5-4 мин; посол рыбы с применением хлорида натрия: солевой раствор 200 г/л – 7 дней и солевой раствор 250 г/л – 5 дней.

6. На основании проведенных исследований предложено пораженных аэромонозом карпов в начальной стадии болезни направлять на обезвреживание по разработанным режимам с последующей переработкой на пищевые рыбные продукты.

При поражении карпов аэромонозом в стадии острого, подострого и хронического течения болезни с признаками дистрофических изменений, гнойно-некротических язв, гидремии мышц, внутренних органов, общей

водянки их следует направлять на техническую утилизацию или уничтожение.

7. Проведенными Электронно-микроскопическими исследованиями установлено:

- A.hydrophila на плотных питательных средах через 24 часа при 37 С формируют колонии в S-форме, с поверхности, защищенные покровами; Через 48 часов культивирования в полученных R-формах колоний отмечен гетероморфизм клеток с проявлением L-трансформации;

- в водной среде A.hydrophila находятся в макро- и микроколониях, со всех сторон окруженные покровами; при длительном обитании в водной среде, наблюдается переход популяции клеток в состояние гетероморфизма с образованием L-форм;

- выявлена способность аэромонад к адгезии с последующей колонизации на слизистой оболочке кишечника карпов, с нарушением её целостности в виде разрывов тканей.

8. При изучении воздействия антибиотиков на культуры аэромонад установлено, что высокой бактерицидной активностью в отношении культур аэромонад обладают ципрофлоксацин и норфлоксацин из группы фторхинолонов и цефатоксим третьего поколения из группы цефалоспоринов, которые превышают по своей эффективности антибиотики, применяемые при лечении больных аэромонозом рыб.

9. В водной среде инактивация аэромонад достигается:

- при достижении температуры жидкости не менее 73^{0}С;
- при воздействии ультразвука на установках УЗГ-04 с мощностью 30 Вт и частотой излучения 22 кГц в течение 35-40 мин;
- при воздействии озона в воде естественного водоема, из артезианской скважины и стерильной водопроводной воде –

через 30 сек, при остаточной концентрации озона соответственно 19,92; 15,04 и 7,42 мг/л.

10. На различных поверхностях инактивация аэромонад достигается:

- при воздействии постоянного УФ-излучения на поверхности металла и метлахской плитки при дозе 15,12 Вт·с/см^2 в течение 15 мин; кирпича и дерева – при 45,36 Вт·с/см^2 в течение 45 мин;
- при применении препаратов Септустин, Аламинол, Бианол, Йодез и Дезамин на поверхностях из дерева и бетона при применении 1-2%-ных концентраций из расчета 0,5 л/м^2 и экспозиции 30 мин.

11. На основании проведенных исследований предложены ветеринарно-санитарная экспертиза и оценка карповых рыб при аэромонозе с учетом клинических признаков болезни, а также физические и химические средства для обеззараживания объектов рыбоводных хозяйств, которые рекомендованы для практического применения.

Предложения для практики.

Разработаны «Методические рекомендации по ветеринарно-санитарной экспертизе карповых рыб при аэромонозе и определению устойчивости аэромонад к физико-химическим факторам» (Утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 04.07.2005г.).

Список опубликованных работ.

1. Неретин М.В. Распространение аэромоноза карповых и лососевых рыб. // Сб.научных трудов. / ВНИИВСГЭ. Москва. – 2002. - Т. 113. – С. 118-125.
2. Неретин М.В., Бутко М.П. Ветеринарно-санитарная экспертиза карповых рыб при аэромонозе. // Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве. / Материалы Международной научно-практической конференции. Чувашская

Государственная сельскохозяйственная академия. Сборник научных трудов. Чебоксары. – 2004. – С. 16-18.

3. Неретин М.В. Устойчивость возбудителя аэромоноза карповых рыб к физико-химическим факторам. // Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве. / Материалы Международной научно-практической конференции. Чувашская Государственная сельскохозяйственная академия. Сборник научных трудов. Чебоксары. – 2004. – С. 18 - 19.
4. Неретин М.В. Чувствительность возбудителя аэромоноза карповых рыб к антибиотикам. Сб.научных трудов. / ВНИИВСГЭ. Москва. – 2004. - Т. 116. – С. 198-206.
5. Неретин М.В. Инактивация возбудителя аэромоноза карповых рыб в водной среде с применением озона. // Ветеринарная патология. 2005. - № 2. – С. 86-92.
6. Заявка на патент № 2007102836/13 «Способ дезинфекции водной среды от возбудителя аэромоноза карповых рыб» (Авторы Бутко М. П., Смирнов А. М., Неретин М. В.). Заявлено 26.01.2007 г. - 6 с.

ВНИИВСГЭ. 2007, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.
Заказ 226/3 Тираж 100 экз.