

На правах рукописи

БОРУНОВА Сеидфатима Мировна

2

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА «ЭНРОГЕН» ДЛЯ
САНАЦИИ СПЕРМЫ ХРЯКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ**

16.00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

16 00 07 – ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2007



Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им К И Скрябина» (ФГОУ ВПО МГАВ-МиБ) и Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)

Научные руководители доктор биологических наук, профессор
Советкин Станислав Васильевич
доктор ветеринарных наук, профессор
Петров Алексей Михайлович

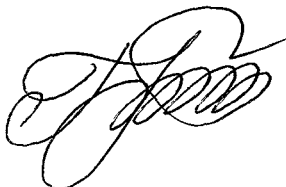
Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор
Бурлаков Валентин Александрович;
доктор биологических наук, профессор
Порфирьев Иван Арсентьевич.

Ведущая организация Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный аграрный университет им Н И Вавилова»

Защита состоится «29» 06 2007 г в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 220 042 01 в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им К И Скрябина» по адресу 109472, Москва, ул Академика Скрябина, д 23, тел (495) 377-93-83

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО МГАВМиБ
Автореферат разослан «28» 05 2007 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
профессор



Т Н Грязнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Для обеспечения потребности населения в мясе и мясных продуктах важная роль отводится свиноводству, как отрасли наиболее скороспелого животноводства (Шахов А Г , 2001, Мисайлов В Д , 2003, Макарова Ю В , 2007)

Наибольший эффект в свиноводстве достигается путем его интенсификации с максимальным использованием маточного поголовья, а репродуктивные возможности свиней во многом зависят от качества хряков-производителей, используемых в технологии искусственного осеменения (Филатов А В , 2005 и др)

Широкое применение антимикробных средств вызвало появление высокоустойчивых штаммов микроорганизмов, значительно снижающих качественные показатели спермы, что приводит к снижению оплодотворяемости, абортам и бесплодию самок, рождению мертворожденного потомства и др (Щербаченко Д Ю , 2006)

Сперма, используемая при искусственном осеменении животных, должна отвечать определенным санитарным требованиям, предусмотренными нормативными документами, а препараты, используемые для разбавления и хранения спермы должны быть безвредными для спермиев

Основными требованиями к санирующим веществам (антибиотики, сульфаниламидные и химиотерапевтические препараты) являются их высокая бактерицидная активность, способность затормаживать обменные процессы спермиев и, тем самым, повышение их способности к хранению

В связи с этим наше внимание было обращено на ряд новых антимикробных средств Так, в настоящее время в ветеринарной практике находят все более широкое применение антимикробные препараты, относящиеся к группе фторхинолонов, и антибиотики широкого спектра действия из группы аминогликозидов

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлась разработка нового комплексного антимикробного препарата, малотоксичного для спермиев производителей и обладающего широким спектром действия на микрофлору, выделяемую из спермы сельскохозяйственных животных

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи

1 Изучить уровень инфицирования спермы хряков-производителей различными

видами микроорганизмов

2 Провести сравнительную оценку антибактериальных препаратов, применяемых для санации спермы хряков-производителей сельскохозяйственных животных по ряду показателей (бактерицидная активность, выживаемость и оплодотворяющая способность спермиев)

3 Определить бактерицидное действие энрофлоксацина и гентамицина сульфата на микроорганизмы, выделяемые из спермы

4 Определить синергидное бактерицидное действие энрофлоксацина и гентамицина сульфата на штаммах и изолятах микроорганизмов

5 Установить максимально безвредную дозу для спермиев хряков и минимально бактерицидную дозу препарата ЭНРОГЕН

6 Определить эффективность применения препарата ЭНРОГЕН для санации спермы хряков – производителей

7 Изучить влияние препарата ЭНРОГЕН на оплодотворяющую способность спермиев хряков-производителей

8 Разработать нормативно-техническую документацию на препарат ЭНРОГЕН и определить его экономическую эффективность при искусственном осеменении свиней

Научная новизна. Впервые для санации спермы хряков-производителей был создан комплексный препарат ЭНРОГЕН на основе гентамицина сульфата и энрофлоксацина из группы фторхинолонов и изучены его фармакологические свойства

Установлены безопасность препарата ЭНРОГЕН для спермиев и более высокая бактерицидная активность в отношении условно – патогенной микрофлоры (псевдомонад, эшерихий, стрептококков, стафилококков, протей и др) по сравнению с применяемым в настоящее время санирующим препаратом ПОЛИГЕН

Разработана технология производства препарата ЭНРОГЕН

Практическая значимость заключается в том, что предложенный комплексный санирующий препарат ЭНРОГЕН позволяет получать сперму высокого санитарного и биологического качества, способствует снижению гинекологических заболеваний у свиноматок, а также повышению оплодотворяемости маточного поголовья при искусственном осеменении. Полученные данные подтверждены актами, утвержден-

ными руководителями опытно-производственных хозяйств и свинокомплексов Московской, Белгородской и Воронежской областей

На основании результатов исследований разработана нормативно-техническая документация на препарат ЭНРОГЕН (Технические условия, инструкция по применению)

На базе ЗАО «Мосагроген» г Москва организовано производство препарата ЭНРОГЕН. Полученные серии по качеству соответствовали нормативным документам и прошли производственные испытания

Материалы исследований вошли в «Методические указания по диагностике, терапии и профилактике болезней органов размножения и молочной железы свиней», одобренные секцией патологии, фармакологии и терапии Российской сельскохозяйственной академии 24 марта 2005 г (протокол № 1)

Материалы исследований используются в учебном процессе в Саратовском государственном аграрном университете им. Н.И. Вавилова, Воронежском государственном аграрном университете им. К.Д. Глинки, Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина студентами ветеринарных факультетов при изучении дисциплины «Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения животных», а также на курсах повышения квалификации зооветеринарных специалистов свиноводческих хозяйств

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на ежегодных научно-практических конференциях научных сотрудников и аспирантов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ ВГНКИ, 2003-2006), на международных научно-производственных конференциях по проблемам лечения и профилактики акушерско-гинекологической патологии с -х животных (Ульяновск, 2007, Ставрополь, 2007), на XV Московском международном ветеринарном конгрессе (2007)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, в т.ч. 4 статьи - в материалах Всероссийских, региональных и республиканских научных конференций и 2 статьи - в научных журналах

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на _____ страницах

машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждений полученных результатов, выводов, данных о практических использованиях научных результатов, рекомендаций по использованию научных выводов, списка использованной литературы (___ источников, в т ч ___ иностранных авторов) и приложений Работа иллюстрирована 17 таблицами и 7 рисунками

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1 Уровень инфицирования спермы хряков-производителей различными видами микроорганизмов
- 2 Сравнительные испытания различных антибактериальных препаратов, применяемых для санации спермы животных по ряду показателей (бактерицидная активность, выживаемость и оплодотворяющая способность спермиев)
- 3 Технология получения нового санирующего препарата ЭНРОГЕН и его фармако-токсикологические свойства,
- 4 Эффективность ЭНРОГЕНа при искусственном осеменении свиной

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Диссертационная работа была выполнена в период с 2003 по 2007 гг на кафедре акушерства и гинекологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ, в лаборатории отдела пробиотиков и биологически активных препаратов ФГУ ВГНКИ, в опытно-производственном хозяйстве «Манихино» Истринского района и свинокомплексе «Кузнецовский» Наро-Фоминского района Московской области, на базе свинокомплекса колхоза им Фрунзе Белгородской области, Межхозяйственного предприятия по производству свинины «9-я пятилетка» и «Краснодонское» Воронежской области

Объектом исследования служили 45 голов хряков-производителей крупной белой породы, ландрас, дюрок и препарат ЭНРОГЕН Предметом исследования явились сперма хряков-производителей, а также клинические, морфо-биохимические, иммунологические и статистические показатели свиной Всего было исследовано 323 пробы спермы хряков

Животных подбирали по принципу аналогов Искусственное осеменение свиной

проводили спермой от одних и тех же хряков на разделенных эякулятах спермы, разбавленной ГХЦС средой по ГОСТ 17637 – 72 в соотношении 1:3. Всего было осеменено 323 свиноматки.

Санитарное качество спермы определяли в соответствии с ГОСТом 20909 2-75 и «Методическими указаниями по ветеринарно-санитарному контролю качества спермы производителей» (1999)

Для выделения и идентификации микроорганизмов из исследуемого материала использовали общепринятые методы, а также методику микологического исследования и оценки спермы, применяемой при искусственном осеменении сельскохозяйственных животных (1978)

Патогенность выделенных микроорганизмов определяли по плазмокоагулирующим и гемолитическим свойствам

В сравнительном аспекте была изучена эффективность таких препаратов как ПОЛИГЕН, ГАМП, гентамицин и энрофлоксацин. Максимально безвредную дозу изучаемых препаратов определяли по ГОСТ 20909 4-75

В работе были использованы следующие штаммы микроорганизмов: *E. coli* O2, *P. aeruginosa* (ЦСИО), *P. vulgaris* α, *S. faecalis*, штамм «Константиновский».

Экономическую эффективность применения препарата ЭНРОГЕН определяли согласно «Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (2002)

Экспериментальные данные обрабатывали по Ашмарину И. П. и Воробьеву А. А. (1962), а также методами корреляционного, вариационного и факторного статистического анализа с использованием компьютерной программы «Statistica 6,0»

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение уровня инфицирования спермы хряков-производителей различными микроорганизмами

При сравнительной оценке санитарного качества спермы, полученной от одних и тех же хряков в разное время года, установлено, что в осенне-зимний период свежеполученная неразбавленная сперма хряков имела высокое микробное число и колититр (табл. 1)

Таблица 1 Качество спермы хряков в зависимости от периода исследования

Показатели	Исследуемая сперма				
	В осенне-зимний период		В весенне-летний период		
	Свежеполученная неразбавленная	Разбавленная ГХЦС	Свежеполученная неразбавленная	Разбавленная ГХЦС	
Число хряков	30	30	30	30	
Исследовано эякулятов	120	120	120	120	
Число микробных клеток в 1 см ³	78428 ± 19237	26166 ± 7399	122268 ± 31565	28742 ± 9674	
Коли-титр, число %	< 0,1	-/-	4/3,3	-/-	-/-
	0,1	4/3,3	6/5,0	-/-	5/4,2
	0,01	16/13,3	37/30,8	8/6,6	23/19,1
	0,001	30/25,0	42/35,0	40/33,3	38/31,6
	0,0001	70/58,4	31/25,8	72/60,0	54/45,0
Грибы, число/%	80/66,7	60/50,0	90/75,0	74/61,6	
Условно-патогенная микрофлора (УПМ), число/%	60/50,0	48/40,0	73/60,8	60/50,0	

Так, в целом число микроорганизмов в исследуемых эякулятах от хряков в осенне-зимний период было на уровне 78428 ± 19237 , а в весенне-летний – в 1,5 раза выше – 122268 ± 31565 КОЕ в 1 см³ неразбавленной спермы. Достаточно высокий коли-титр (0,0001) имели 58,4-60,0% образцов во все периоды исследований, что также указывает на значительный уровень микробной контаминации спермы.

Разбавление спермы ГХЦС средой способствовало существенному снижению в ней количества микроорганизмов. Так, среднее микробное число по 120 исследованным пробам разбавленной спермы в осенне-зимний период составило 26166 ± 7399 и в весенне-летний – 28742 ± 9674 КОЕ/см³, причем количество образцов с коли-титром 0,0001 составляло 25,7% и 45,0 % соответственно.

По сравнению с результатами исследований образцов свежеполученной спермы снижение микробного числа после ее разбавления ГХЦС средой было в 3,0 (осенне-зимний период) и 4,25 (весенне-летний период) раза, а количество проб с коли-титром 0,0001 – в 2,26 и 1,33 раза соответственно. Однако, несмотря на такое снижение числа микроорганизмов, микробная контаминация спермы оставалась еще достаточно высокой. Аналогичные результаты получены и по уровню контаминации спермы условно-патогенными микроорганизмами и грибами. Так, в ноябре-феврале 50,0% образцов свежеполученной и 40,0% разбавленной спермы были контамини-

рованы условно-патогенными микроорганизмами, а в марте-июне их количество было увеличено уже до 60,8% и 50,0% соответственно

Анализ образцов как свежеполученной, так и разбавленной ГХЦС средней спермы показал, что чаще всего выделяли бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – 100,0% и 100,0%, дрожжеподобные грибы – 75,0% и 61,6% образцов соответственно В 24,1% образцов свежеполученной и 15,0% - разбавленной спермы была обнаружена *Ps aeruginosa*, в 26,6% и 20,0% - сенная палочка (*B subtilis*) соответственно Доля других микроорганизмов (стрептококков, стафилококков, протей) была на уровне от 4,2 до 12,5% Ни в одном случае не были выделены *S aureus* (табл 2)

Таблица 2 Видовой состав микрофлоры, выделенной из спермы хряков

Микрофлора	Выделено из образцов спермы (n=120)			
	Свежеполученной неразбавленной		Разбавленной	
	количество изолятов	%	количество изолятов	%
БГКП	120	100,0	120	100,0
Дрожжеподобные грибы	90	75,0	74	61,6
<i>B subtilis</i>	32	26,6	24	20,0
<i>P aeruginosa</i>	29	24,1	18	15,0
Стрептококки	15	12,5	10	8,3
Стафилококки	8	6,6	5	4,2
Протей	7	5,8	5	4,2

Анализ видового состава микроорганизмов, присутствующих в сперме животных в ассоциации, позволил установить, что если БГКП чаще всего встречаются в ассоциации, то *P aeruginosa* присутствовал в монокультуре у 35,7% образцов эякулятов

Сравнительная оценка антибактериальных препаратов, применяемых для санации спермы производителей сельскохозяйственных животных

Определение бактерицидного действия препаратов

В настоящее время для санации спермы животных предложены препараты ГАМП (гентамицин+ампициллин) и ПОЛИГЕН (полимиксин+гентамицин) С целью определения их эффективности нами были проведены исследования по оценке влияния этих препаратов на микробиологические показатели разбавленной и замороженно-

оттаянной спермы хряков. Для этого данные препараты вносили в образцы спермы в концентрации 300 и 600 мкг на 1 см³ ГХЦС среды, а контролем служили образцы спермы без их внесения.

Добавление к сперме хряков препаратов ГАМП и ПОЛИГЕН значительно повышало санитарное качество спермы, снижая уровень контаминации по сравнению с исходным уровнем в 29-192 раза. Так, если в разбавленной ГХЦС средой (1:3) сперме до замораживания число микробных клеток было в пределах 26166±7399 КОЕ/см³, то после добавления 300 мкг/см³ ПОЛИГЕНА их число стало 581,0±59 КОЕ/см³, 600 мкг/см³ – всего 153,3±25 КОЕ/см³. В случае добавления ГАМПа снижение микробной обсемененности спермы до и после ее замораживания было несколько хуже: 873,5±76, 394,0±29, 699,0±76 и 210±17 КОЕ/см³ соответственно.

Анализируя полученные результаты можно заключить, что ПОЛИГЕН обладает более выраженным бактерицидным действием, чем ГАМП. Так, при добавлении к разбавленной сперме ПОЛИГЕНА в дозе 300 мкг/см³ ее микробное число было снижено в 45 раз по сравнению с исходным уровнем (без внесения препарата), а при дозе 600 мкг/см³ – в 171 раз, тогда как ГАМП в тех же дозах обеспечивал снижение числа микроорганизмов в 30 и 66,4 раза. Аналогичные данные получены и при санации замороженной спермы – 60,3–192,8 и 34,5–114,8 раза соответственно.

Следует отметить, что исследованные препараты губительно действовали на условно-патогенную микрофлору, так как ни в одной из проб спермы с добавлением препаратов ГАМП и ПОЛИГЕН указанная микрофлора не была выделена, а коли-титр во всех пробах с препаратами был выше 0,1, тогда как в пробах спермы, необработанной санирующими препаратами, грибы и условно-патогенная микрофлора выделялась в 50-70 и 30-40 % случаев соответственно.

Таким образом, добавление комплексных препаратов ГАМП и ПОЛИГЕН как в разбавленную, так и в замороженную сперму хряков, значительно улучшало ее санитарное качество, подавляло условно-патогенную микрофлору и снижало микробное число, причем бактерицидное действие препарата ПОЛИГЕН было в 1,5 раза эффективнее, чем препарата ГАМП.

Определение максимально безвредной дозы препаратов

Одним из наиболее важных моментов в применении препаратов для санации спермы наряду с определением их бактерицидного действия является определение их максимально безвредной дозы для спермиев. Для этого было проведено 3 опыта по изучению изменения биологического качества спермы хряков по абсолютной выживаемости и выживаемости спермиев в часах при добавлении saniрующих препаратов ГАМП и ПОЛИГЕН в рекомендуемых дозах. В качестве контроля использовали образцы спермы без добавления saniрующих препаратов.

Было установлено, что наиболее безвредным препаратом для спермиев оказался ПОЛИГЕН в дозе 300 и 600 мкг/см³ среды, в присутствии которого спермии хряков выживали в течение 317±25 и 351±32 ч (на 21-34% выше контроля), тогда как при ГАМПе - 281±19 и 286±10 ч (на 2-4% выше контроля) соответственно. В контрольных образцах спермии выживали в течение 223±15 – 262±25 ч.

Анализ данных по абсолютной выживаемости спермиев хряков показал, что лучшие результаты были получены при внесении в сперму ПОЛИГЕНА, хотя выживало в зависимости от дозы 111-118% спермиев по сравнению с контролем, тогда как при ГАМПе данный показатель был в пределах 103-108%. Кроме того, в случае применения ГАМПа в 9-26% образцов отмечали агглютинацию спермы хряков. Так, выживаемость спермиев повышалась в часах по сравнению с контролем на 5-18% и 18-23% соответственно. Кроме того, было отмечено снижение числа выбракованных эякулятов из-за ухудшения подвижности спермиев на 6,0- 6,1%, а при ПОЛИГЕНе в дозе 600 мкг/см³ – на 100%.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что применяемые в настоящее время для санации спермы хряков-производителей препараты ГАМП и ПОЛИГЕН обладают достаточно высокой бактерицидной активностью в отношении микроорганизмов. Однако при рассмотрении их безвредности в отношении спермиев хряков можно отметить, что абсолютная выживаемость спермиев несущественно отличалась от результатов анализа контрольной (несанированной) спермы – всего на 3-8% при использовании ГАМПа и 11-18% - ПОЛИГЕНА.

Разработка нового антибактериального препарата для санации спермы хряков-производителей

Определение безвредности для спермиев хряков-производителей энрофлона и гентамицина

Для определения максимально безвредной дозы выбранных антимикробных компонентов разбавленную сперму с препаратами исследовали по биологическим показателям. абсолютной выживаемости (S) и выживаемости спермиев в часах (ч) Для этого в разбавленную сперму хряков (ГХЦС средой) вносили энрофлон в дозе от 50 до 2000 мкг/см³ (табл 3) и гентамицин – от 100 до 2000 мкг/см³ (табл 4) В качестве контроля использовали образцы спермы без добавления saniрующих препаратов Всего было проведено 4 опыта

Таблица 3 Абсолютная выживаемость (S) и выживаемость спермиев хряков в часах в зависимости от дозы энрофлона (n = 4)

Энро-флон, мкг/см ³ среды	Результаты анализа спермы							
	Заморожено-оттаянная сперма				Свежеполученная сперма			
	Абсолютная выживаемость, S	S, % к контролю	Выживаемость, час	Выживаемость, % к контролю	Абсолютная выживаемость, S	S, % к контролю	Выживаемость, час	Выживаемость, % к контролю
50	897	108,7	213	112,7	993	120,8	210	121,4
100	981	118,9	225	119,0	1048	127,5	219	126,6
200	1035	125,4	228	120,6	1110	135,0	231	133,5
300	1041	126,2	228	120,6	1122	136,5	231	133,5
400	1041	126,2	228	120,6	1105	134,4	235	135,8
500	1065	129,1	228	120,6	1077	131,0	231	133,5
600	1065	129,1	231	122,2	1036	126,0	231	133,5
750/800	960	109,1	199	105,3	1021	124,2	211	121,9
1000	897	108,7	198	104,8	1010	122,9	204	117,9
1250/1300	894	108,4	196	103,7	952	115,8	196	113,3
1500	891	108,0	192	101,6	904	110,0	180	104,0
1750/1800	846	102,5	190	100,5	744	90,5	147	85,0
2000	837	101,5	190	100,5	580	70,6	118	68,2
Контроль	825	100,0	189	100,0	822	100,0	173	100,0

Как видно из представленных в таблице 3 данных, энрофлон оказывал незначительное токсическое действие на спермии хряков при внесении его в дозе 600 мкг/см³ и менее Так, если при внесении энрофлона в дозе от 50 до 600 мкг/см³ абсолютная выживаемость и выживаемость спермиев в часах превышали значения контрольного образца спермы на 18,9-29,1% и 19,0-22,2%, то уже при концентрации 800

мкг/см³ - только на 9,1% и 5,3% соответственно При увеличении концентрации энрофлона происходило постепенное снижение абсолютной выживаемости и выживаемости в часах и при внесении 1800-2000 мкг/см³ значение этих показателей имело незначительную разницу с контрольным образцом – всего 0,5-1,5%

Таблица 4 Абсолютная выживаемость (S) и выживаемость спермиев хряков в часах в зависимости от дозы гентамицина (n = 4)

Гентамицин, мкг/см ³ среды	Результаты анализа спермы							
	Заморожено-оттаянная сперма				Свежеполученная сперма			
	Абсолютная выживаемость, S	S, % к контролю	Выживаемость, час	Выживаемость, % к контролю	Абсолютная выживаемость, S	S, % к контролю	Выживаемость, час	Выживаемость, % к контролю
100	714	112,3	153	108,5	823	111,8	202	110,4
200	723	115,1	156	110,6	880	119,6	208	113,7
400	756	118,9	156	110,6	1013	137,6	231	126,2
600	777	122,2	165	117,0	1050	142,7	237	129,5
800	708	111,3	159	112,8	1020	138,6	229	125,1
1200	708	111,3	159	112,8	996	135,3	228	124,6
1400	645	101,4	147	104,3	957	130,0	223	121,8
1600	616	96,6	135	95,7	918	124,7	207	113,1
1800	576	90,6	128	90,8	900	122,3	202	110,4
2000	513	80,7	117	83,0	876	119,0	196	107,1
Контроль	636	100,0	141	100,0	736	100,0	183	100,0

В отличие от энрофлона, гентамицин оказался более токсичным для спермиев хряков снижение абсолютной выживаемости и выживаемости спермиев в часах наблюдалось при его концентрации в среде 1600 – 2000 мкг/см³ среды При этом абсолютная выживаемость спермиев была ниже контроля на 3,4-19,3 %, а выживаемость спермиев в часах (ч) - на 4,3-17,0 % Лучшие результаты по двум показателям выживаемости отмечались при концентрации гентамицина 600 мкг/см³, которые превышали значения контроля на 22,2% и 17,0% соответственно

По сравнению со спермой хряков гентамицин для спермиев быков оказался менее токсичным, чем энрофлон Так, при дозах антибиотика в пределах 1600–2000 мкг/см³ абсолютная выживаемость спермиев по сравнению с контролем была выше на 24,7–19,0 %, а выживаемость спермиев в часах - на 13,1 - 7,1 %, тогда как при меньших концентрациях гентамицина значения этих показателей превышали таковые в контроле на 22,3-42,7% и 21,8-29,5% соответственно.

Таким образом, результаты исследований показали, что степень токсичности од-

них и тех же антибиотиков на спермии разных видов животных неодинакова. Так, спермии хряков заморожено-оттаяная оказались менее чувствительными к энрофло-ну, чем сперма свежеполученная, а к гентамицину – наоборот.

Изучение бактерицидного действия энрофлона и гентамицина на штаммы микроорганизмов, выделяемых из спермы

После установления безопасных концентраций энрофлона и гентамицина следующим этапом исследований являлось определение их минимальной бактерицидной дозы в отношении штаммов культур УПМ, чаще всего контаминирующих сперму производителей и взятых как по отдельности, так и в ассоциации. В опытах были использованы 2-х суточные агаровые культуры *P aeruginosa*, *E coli*, *P vulgaris* α и *S faecalis*. Из данных микроорганизмов при помощи оптического стандарта мутности готовили одномиллиардную микробную взвесь, из которой затем путем последовательных разведений в физиологическом растворе получали взвесь, содержащую 50 тыс микробных клеток в 1 см³. Для приготовления ассоциации микроорганизмов, чаще всего встречающейся в сперме, их смешивали в соотношении 1:1. При изучении бактерицидных свойств гентамицина, его вносили в среды в концентрации от 12,5 до 600 мкг/см³.

Было установлено, что минимальные бактерицидные дозы гентамицина для *E coli* находились в пределах 300 мкг/см³ (бактериостатическая – 200 мкг/см³), *P aeruginosa* - 350 мкг/см³ (300 мкг/см³), *S faecalis* - 400 мкг/см³ (350,0 мкг/см³), на протей и ассоциацию микроорганизмов гентамицин оказывал только бактериостатическое действие в дозах 350-500 мкг/см³ среды.

Аналогичные исследования были проведены с энрофлоном, который вносили в среды в концентрации 12,5-300,0 мкг/см³. Минимальные бактерицидные дозы энрофлона для *E coli* находились в пределах 200 мкг/см³ (бактериостатическая – 100-150 мкг/см³), *P aeruginosa* - 300 мкг/см³ (150-250 мкг/см³), стрептококка - 250 мкг/см³ (100-200 мкг/см³), протей – 250 мкг/см³ (100-200 мкг/см³), а ассоциации микроорганизмов - 300 мкг/см³ (200-250 мкг/см³).

При сравнении бактерицидной активности изучаемых антимикробных соединений установили, что минимально бактерицидная доза энрофлона для *E coli*, *P aeruginosa*, *P vulgaris* α , *S faecalis* и ассоциации микроорганизмов была значитель-

но выше по сравнению с гентамицином

Таким образом, проведенные исследования показали, что среды, используемые для разбавления и хранения спермы хряков, не оказывали существенного влияния на бактерицидную активность санирующих препаратов по сравнению с физиологическим раствором

Изучение синергидного бактерицидного действия энрофлоксацина и гентамицина сульфата на штаммах и изолятах микроорганизмов

Учитывая бактерицидные концентрации энрофлона и гентамицина, нами была изучена синергидное действие данных антимикробных средств с целью снижения их суммарной концентрации в препарате и повышения бактерицидного действия в отношении микроорганизмов, контаминирующих сперму хряков. Для этого нами были испытаны бактерицидные и бактериостатические свойства различных соотношений энрофлона и гентамицина для выбора наиболее оптимального. Данные вещества в концентрациях от 12,5 до 150 мкг/см³ смешивали в соотношениях 1:1, 3:1, 1:3, 1:6. Данные определения оптимального соотношения гентамицина и энрофлоксацина в препарате ЭНРОГЕН, показали, что оптимальными их соотношениями являются 1:1 и 1:3. Важно также отметить, что подбор оптимальных соотношений антибиотиков в комбинированном препарате целесообразно проводить при низких концентрациях на уровне бактериостатических, т.к. при более высоких концентрациях можно не уловить их сочетанное бактерицидное действие на микрофлору. Так, при соотношении гентамицина и энрофлоксацина в препарате ЭНРОГЕН в общей дозе 12,5 мкг/см³ среды он уже проявляет бактериостатическое действие на кишечную палочку, а в дозе 25,0 мкг/см³ при том же соотношении гентамицина и энрофлоксацина бактерицидную, что не наблюдается при соотношении гентамицина и энрофлоксацина 3:1 и 1:6 в той же дозе.

Определение максимально безвредной дозы для спермиев хряков и минимально бактерицидной дозы препарата ЭНРОГЕН

После отработки состава комплексного антимикробного препарата для санации спермы хряков были проведены исследования по определению его максимально безвредной дозы для спермиев. Для этого в разбавленные ГХЦС средой сперму хряков

вносили различные концентрации разработанного препарата ЭНРОГЕН и изучали абсолютную выживаемость и выживаемость спермиев в часах (табл 5)

Таблица 5 Абсолютная выживаемость (S) и выживаемость спермиев хряков в часах в зависимости от дозы ЭНРОГЕНА

ЭНРО- ГЕН, мкг/см ³ среды	Результаты анализа спермы							
	Заморожено-оттаянная сперма				Свежеполученная сперма			
	Абсолют- ная выжи- ваемость, S	S, % к кон- тролю	Выжи- ва- емость, час	Выжива-е- мость, % к контролю	Абсолют- ная выжи- ваемость, S	S, % к кон- тролю	Выжива- емость, час	Выжива-е- мость, % к контро- лю
50	687,0	103,2	144,0	102,1	1110,0	118,4	240,0	119,4
100	711,0	106,8	162,0	114,9	1036,0	110,6	234,0	116,4
200	798,0	119,8	172,5	122,3	1081,5	115,4	238,5	118,6
400	813,0	122,1	174,0	123,4	1105,5	117,9	244,5	121,6
800	846,0	127,0	184,5	130,8	1098,2	117,1	241,5	120,1
1200	849,0	127,5	184,5	130,8	1069,5	114,1	241,5	120,1
1600	810,0	121,6	184,5	130,8	985,0	105,1	214,5	106,7
2000	762,0	114,4	181,5	128,7	945,0	100,8	211,5	105,2
2400	730,5	109,7	172,5	122,3	790,5	84,3	183,0	91,0
2800	661,5	99,3	157,5	111,7	729,0	77,8	169,5	84,3
3200	625,5	93,9	156,0	110,6	694,5	74,1	157,5	78,3
Кон- троль	666,0	100,0	141	100,0	937,5	100,0	201,0	100,0

Изучение безвредности ЭНРОГЕНА для спермиев хряков показало, что их абсолютная выживаемость снижалась соответственно на 0,7-6,1 % по сравнению с контролем при концентрации препарата в ГХЦС среде в количестве 2800-3200 мкг/см³, тогда как выживаемость спермиев в часах была при этих же концентрациях препарата на 10,6-11,7% выше значений контрольного образца

Наилучшие результаты по безвредности ЭНРОГЕНА для спермы хряков отмечены в интервале его концентраций от 200 до 2000 мкг/см³, тогда как для спермы свежеполученной – от 200 до 1200 мкг/см³. Это показывает, что сперма хряков оказалась менее чувствительной к ЭНРОГЕНУ, чем сперма замороженно-оттаянная

После изучения безвредности ЭНРОГЕНА для спермиев хряков важным являлось выяснение минимальной бактерицидной дозы препарата в отношении микроорганизмов, выделяемых из спермы этих производителей. Для этого различные дозы препарата вносили в среды, применяемые для разбавления и хранения спермы (физиологический раствор, среды ЛГЖ, ГХЦС). Были использованы концентрации ЭНРОГЕНА в пределах 12,5 – 300 мкг/см³, т.к. использование более высоких кон-

центраций, на наш взгляд, было нецелесообразно по причине большого расхода препарата (табл 6)

Таблица 6 Минимальные бактерицидные концентрации гентамицина, энрофлона и ЭНРОГЕНА в отношении ряда микроорганизмов

Доза, мкг/см ³	Препарат	Культуры микроорганизмов				
		E coli	P aeruginosa	P vulgaris α	S faecalis	Ассоциация микроорганизмов
12,5	Гентамицин	+	+	+	+	+
	Энрофлон	+	+	+	+	+
	ЭНРОГЕН	±	+	+	+	+
25,0	Гентамицин	+	±	+	+	+
	Энрофлон	+	+	+	+	+
	ЭНРОГЕН	-	±	+	+	+
50,0	Гентамицин	+	+	+	+	+
	Энрофлон	+	+	+	+	+
	ЭНРОГЕН	-	-	±	±	+
100,0	Гентамицин	+	+	+	+	+
	Энрофлон	±	+	±	±	+
	ЭНРОГЕН	-	-	±	±	±
150,0	Гентамицин	+	+	+	+	+
	Энрофлон	±	±	±	±	+
	ЭНРОГЕН	-	-	-	-	-
200,0	Гентамицин	±	+	+	+	+
	Энрофлон	-	±	-	±	±
	ЭНРОГЕН	-	-	-	-	-
250,0	Гентамицин	±	+	+	+	+
	Энрофлон	-	±	-	-	±
	ЭНРОГЕН	-	-	-	-	-
300,0	Гентамицин	-	±	+	+	+
	Энрофлон	-	-	-	-	-
	ЭНРОГЕН	-	-	-	-	-

"+"- рост микроорганизмов, "-"- рост отсутствует, "±"- задержка роста микроорганизмов

Проведенные исследования показали, что препарат ЭНРОГЕН обладал более высокой бактерицидной активностью в отношении ряда микроорганизмов, чаще всего присутствующих в сперме животных, по сравнению с гентамицином и энрофлоном

Из полученных данных следует, что комплексный препарат ЭНРОГЕН в дозе 25 мкг/см³ среды оказывал бактерицидное действие на E coli и бактериостатическое - на P aeruginosa, тогда как отдельно гентамицин и энрофлон не подавляли рост вышеуказанных микроорганизмов. В дозе 50 мкг/см³ среды ЭНРОГЕН проявлял бактерицидное действие на кишечную и синегнойную палочки и бактериостатическое действие на стрептококки и протей, что не наблюдалось при применении отдельно ген-

тамицина и энрофлона В дозе 200 мкг/см³ ЭНРОГЕН оказывал бактерицидное действие на все использованные в опытах микроорганизмы

Таким образом, результаты экспериментальных исследований позволяют сделать вывод о синергидном бактерицидном действии энрофлоксацина и гентамицина при их комплексном применении, что позволяет существенно снизить их суммарную концентрацию в препарате ЭНРОГЕН

Эффективность применения нового комплексного антимикробного препарата ЭНРОГЕН для санации спермы хряков-производителей

Следующим этапом исследований являлось изучение бактерицидного действия ЭНРОГЕНА непосредственно на сперме животных Для определения эффективности препарата были проведены исследования по оценке его влияния на микробиологические показатели разбавленной спермы хряков Для этого в образцы спермы препарат добавляли в концентрациях 50, 100 и 150 мкг на 1 см³ ГХЦС среды, а контролем служили образцы спермы без его внесения (табл 7)

Таблица 7 Бактерицидное действие препарата ЭНРОГЕН на микрофлору спермы хряков

Показатель	Неразбавленная сперма	Сперма, разбавленная ГХЦС средой			
		без препарата	с 50 мкг/см ³ ЭНРОГЕНА	с 100 мкг/см ³ ЭНРОГЕНА	с 150 мкг/см ³ ЭНРОГЕНА
Количество проб	150	150	57	140	36
Среднее число микробов клеток в 1 см ³ спермы	574941,95 ±51732,0	96207,5±1004,9	87,57±18,7	32,6±9,5	13,5±2,9
Число проб без микрофлоры / %	-	-	35 61,4	91 65,0	25 69,4
Коли-титр					
0,00001	30/32,3	-	-	-	-
0,0001	24/25,8	-	-	-	-
0,001	57/38,0	25/16,7	-	-	-
0,01	17/11,3	29/19,3	-	-	-
0,1	4/2,6	24/16,0	2/3,1	-	-
выше 0,1	18/12,0	72/48,0	57/100,0	140/100,0	36/100,0

Анализ полученных данных показывает, что свежеполученная неразбавленная и разбавленная 1 2 ГХЦС средой сперма хряков до внесения препарата ЭНРОГЕН имела высокую микробную контаминацию, которая составляла соответственно

574941,9±51732,0 и 96207,5±1004,9 КОЕ/см³ При санации разбавленной спермы хряков препаратом ЭНРОГЕН в дозе 50 мкг/см³ среды количество микроорганизмов в ней было в пределах 87,57±18,7 КОЕ/см³, 100 мкг/см³ – 32,6±9,5, а 150 мкг/см³ – 13,5±2,9 КОЕ/см³, причем число проб спермы без микрофлоры было 61,4%, 65,0 и 69,4% соответственно

Коли-титр во всех исследованных пробах при использовании препарата ЭНРОГЕН был выше 0,1 200 мкг/см³

После получения результатов о положительном влиянии препарата ЭНРОГЕН на уровень снижения микробной контаминации спермы хряков нами были проведены исследования по санации замороженной спермы быков Для этого препарат ЭНРОГЕН был использован в дозе 200 мкг/см³ среды ЛГЖ Проведенные испытания показали, что количество микроорганизмов в 1 см³ спермы было в пределах 11,0±0,09, при этом 95,5% образцов спермы были свободными от микрофлоры, а коли-титр во всех случаях был выше 0,1 По санитарному показателю было выбраковано только 1,3% образцов спермы

Полученные данные свидетельствуют о выраженном бактерицидном действии комплекса гентамицина и энрофлона в препарате ЭНРОГЕН

Таким образом, проведенные исследования подтвердили эффективность применения нового комплексного антибактериального препарата ЭНРОГЕН для санации спермы хряков и быков-производителей

Влияние препарата ЭНРОГЕН на оплодотворяющую способность спермиев хряков – производителей

Определение эффективности применения изучаемых препаратов для санации спермы хряков-производителей проводили на двух свинокомплексах Для этого на свинокомплексе «Кузнецовский» с препаратом ЭНРОГЕН в сперме было осеменено 856 и с препаратом ПОЛИГЕН - 630 свиноматок, на свинокомплексе «Краснодонское» - 59 и 134 свиноматки, соответственно В контрольных группах осеменение свиноматок проводили разбавленной не санированной спермой

Оценку эффективности препаратов проводили по числу опоросившихся свиноматок и пришедших повторно в охоту, а также по количеству полученных поросят на 1 свиноматку (табл 8)

Таблица 8 Результаты осеменения свиноматок спермой хряков-производителей, санированной ЭНРОГЕНОМ и ПОЛИГЕНОМ

Наименование препарата	Доза, мкг/см ³ среды	Осеменено свиноматок			Опоросилось		Получено поросят	
		всего	повторно пришедших в охоту		число	%	всего	На одну матку
			кол-во	%				
Свинокомплекс «Кузнецовский»								
ЭНРОГЕН	150	856	122	14,3	734	85,7	7707	10,5
ПОЛИГЕН	600	630	102	16,2	528	83,8	5333	10,1
КОНТРОЛЬ	—	140	32	22,9	108	77,1	1026	9,5
Свинокомплекс «Краснодонское»								
ЭНРОГЕН	150	59	9	15,3	47	80,0	484	10,3
ПОЛИГЕН	300	63	12	19,0	49	78,0	456	9,3
	600	71	12	17,0	57	80,0	547	9,5
КОНТРОЛЬ	—	52	11	21,0	40	77,0	364	9,1

Аналогичные исследования на свинокомплексе «Краснодонское» также выявили некоторое преимущество препарата ЭНРОГЕН в дозе 150 мкг/см³, который обеспечил плодотворное осеменение 80% свиноматок, в то время как при применении ПОЛИГЕНА в дозах 300 и 600 мкг/см³ ГХЦС среды соответственно было осеменено 78% и 80% и в контроле - 76 %, получено поросят соответственно - 10,3, 9,3 и 9,6 на одну матку, в группе без санирующих препаратов (40 свиноматок), получено поросят на одну матку - 9,1

Таким образом, проведенные исследования выявили более высокую эффективность разработанного препарата ЭНРОГЕН по сравнению с ПОЛИГЕНОМ по влиянию на оплодотворение свиноматок

В результате повышения оплодотворяемости было получено дополнительно 866 поросят, что превышает показатели контрольных свиноматок в 1,4 раза

Стоимость приплода определяли из расчета количества полученного молодняка, живой массы приплода и цены реализации 1 кг живой массы (61 руб)

- до применения препарата – $647 \cdot 61 \cdot 1,2 = 4736,4$ руб,

- через 2 месяца после применения препарата – $866 \cdot 61 \cdot 1,2 = 63391,2$ руб

Стоимость дополнительной продукции составила

$63391,2 - 4736,4 = 16030,8$ руб

Материальные затраты складывались из стоимости препарата ЭНРОГЕН, которые составили 1200 руб за 1 кг Учитывали количество израсходованного ЭНРОГЕНА -

40 мг на 105 кг продукции

Таким образом, экономический эффект применения препарата ЭНРОГЕН составил 143800,9 руб , а экономический эффект на рубль затрат – 80,72 руб

ВЫВОДЫ

1 Установлена высокая микробная контаминация свежеполученной неразбавленной спермы хряков-производителей, которая в среднем составляет 78428 ± 19237 мт в 1 см^3 , а коли-титр - от 0,001 до 0,0001 (у 60% исследованных проб) Микрофлора спермы состоит из ассоциации микроорганизмов, которая представлена синегнойной, кишечной, сенной палочками, грибами, стрептококками Наиболее часто из спермы выделяют синегнойную палочку и протей

2 Выявлена определенная закономерность, что сперма хряков, полученная в весенне-летний период, содержит значительно большее количество микробных клеток и высокий коли-титр, чем сперма, полученная в зимнее время года

3 Введение в искусственные среды новых комплексных санирующих препаратов ГАМП и ПОЛИГЕН в разбавленную и замороженную сперму хряков в дозах 300-600 мкг/см^3 среды подавляет рост условнопатогенной микрофлоры, снижает микробное число в 29-192 раза в разбавленной и замороженной сперме

4 На фоне применения препарата ПОЛИГЕН происходит увеличение качества спермы в среднем на 10,2%, концентрации спермиев в 1 мл объема эякулята на 0,033 млрд, активность на 0,3 балла, а резистентность – на 388,25 ед , сочетанное применение санирующих препаратов спермы у хряков-производителей оказывает положительное воздействие на соотношение живых и мертвых спермиев У 75% хряков-производителей произошло увеличение среднего показателя живых спермиев на 18,6%, а активность спермиев у 85% превышала фоновый показатель на 19,1% Санирующее действие препарата ПОЛИГЕН в разбавленной и замороженной сперме хряков в 1,5 раза эффективнее, чем препарата ГАМП

5 При санации как разбавленной, так и замороженной спермы хряков препаратами ГАМП и ПОЛИГЕН в дозах 300 и 600 мкг/см^3 среды улучшались биологические

показатели качества спермы сохранность акросом – на 7-12 %, а выживаемость спермиев, по сравнению с не санированной спермой - на 22-29 % Микробная контаминация спермы хряков-производителей была выше, чем обсемененность эякулятов без применения препарата ЭНРОГЕН

6 Комплексный препарат ЭНРОГЕН более эффективен по сравнению с входящими в его состав препаратами ЭНРОФЛОКСАЦИНОМ и ГЕНТАМИЦИНОМ СУЛЬФАТОМ в дозе 25 мкг/см³ и 50 мкг/см³ он оказывает бактерицидное действие на кишечную и синегнойную палочки, в дозе 150 мкг/см³ среды – на стрептококки, протей и ассоциацию исследованных микроорганизмов

7 Добавление в сперму хряков комплексного санирующего препарата ЭНРОГЕН в дозе 150 мкг/см³ значительно улучшило санитарное качество спермы Среднее число микробных тел в 1 см³ разбавленной спермы составляло 13,5±2,9 В 69% спермы рост микроорганизмов не установлен, а коли-титр был отрицателен во всех образцах исследованной спермы

8. Сочетание ГЕНТАМИЦИНА СУЛЬФАТА и ЭНРОФЛОКСАЦИНА в соотношении 1:1 в препарате ЭНРОГЕН близко к оптимальным величинам, а их бактерицидное действие на микрофлору связано с их синергидным действием

9 Применение для искусственного осеменения свиноматок спермы хряков, сохраненной при температуре 16-20⁰С, санированной препаратами ГАМП и ПОЛИГЕН повышает оплодотворяемость свиноматок при 1-ом осеменении на 8-13 %, а также повышают выход поросят на I свиноматку в 1,8-1,9 раз, по сравнению с не санированной спермой животных контрольной группы

10 Оплодотворяемость свиноматок после первого осеменения при применении спермы хряков, санированной препаратом ЭНРОГЕН в дозе 150 мкг/см³ среды, составила 85,7%-80% и получение поросят в среднем 10,5-10,3 на одну свиноматку

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Для санирования спермы хряков-производителей разработан новый эффективный комплексный препарат ЭНРОГЕН

2 Разработан проект технических условий на препарат ЭНРОГЕН (ТУ)

3 Разработана временная инструкция по применению санирующего препарата

ЭНРОГЕН в ветеринарии

4 На базе временной инструкции на препарат ЭНРОГЕН организовано серийное производство препарата Показатели качества препарата соответствуют требованиям ТУ

5 По результатам исследований разработаны и одобрены 24 марта 2005 г (протокол № 1) секцией патологии, фармакологии и терапии Российской сельскохозяйственной академии «Методические указания по диагностике, терапии и профилактике болезней органов размножения и молочной железы свиней»

6 Материалы исследований используются в учебном процессе в ВУЗах РФ при изучении студентами и слушателями курсов повышения квалификации зооветеринарных специалистов свиноводческих хозяйств дисциплины «Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения животных»

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1 Для повышения эффективности воспроизводства свиноматок рекомендуется вводить в искусственные среды - разбавители спермы новые комплексные saniрующие препараты ЭНРОГЕН в дозе 150 мкг/см³, ГАМП и ПОЛИГЕН в дозах 300-600 мкг/см³ среды

2 Для искусственного осеменения свиноматок рекомендуется применять сперму хряков сохраненную при 16-20⁰С и saniрованную препаратами ГАМП и ПОЛИГЕН, что повышает оплодотворяемость при 1-ом осеменении на 8-13 %, а выход поросят на 1 свиноматку в 1,8-1,9 раз, по сравнению с не saniрованной спермой животных контрольной группы, а при использовании нового saniрующего препарата ЭНРОГЕН увеличивается оплодотворяющая способность свиноматок на 4-8% по отношению к контролю

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Санирующие препараты для повышения качества спермы хряков-производителей /С В Советкин, В Н Родина, М Е Евсюков, В Т Смирнов, С М Саидова //Ветеринария - 2000 - № 6 - С 48-50

2 Советкин С В Чувствительность микроорганизмов, выделенных из спермы быков-производителей к полимиксину Е и энрофлону /С В Советкин, В Н Родина, С М Саидова // Сборник научных трудов ВГНКИ Том №63 М Техполиграфцентр-2001 - С 176-177

3 Борунова С М Разработка нового комплексного препарата, применяемого для санации спермы производителей /С М Борунова //Матер междунар науч-практ конф по профилактике, диагностике и лечению инфекционных болезней, общих для человека и животных - Ульяновск ГСХА - 2006 - С 440-442

4 Борунова С М Определение максимальной безвредной дозы для спермиев хряков и минимальной бактерицидной дозы комплексного препарата для санации спермы – «Энроген» /С.М Борунова //Матер междунар науч-произв конф по проблемам лечения и профилактики акушерско-гинекологической патологии с -х животных - Ставрополь ГСХА - 2007 - С

5. Борунова С.М Полимиксин-М, применяемый для санации спермы /С М Борунова //Матер XV Московского международного ветеринарного конгресса - М ЗАО «Издательский Дом» - 2007 - С 155

Типография ордена «Знак Почета» издательства МГУ
119992, Москва, Ленинские горы
Заказ № 235 Тираж 100 экз