

на правах рукописи

МИЖЕВИКИНА АННА СЕРГЕЕВНА



**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКА
ЗИМУН-14.40 ПРИ СУБКЛИНИЧЕСКОМ МАСТИТЕ У КОРОВ**

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Троицк, 2006

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины»

Научный руководитель - доктор ветеринарных наук, профессор
Ноздрин Григорий Антонович

Официальные оппоненты - доктор ветеринарных наук, профессор
Герунова Людмила Карповна

доктор ветеринарных наук, профессор
Гертман Александр Михайлович

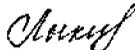
Ведущая организация – ФГОУ ВПО «Чувашская государственная
сельскохозяйственная академия»

Защита состоится «18» декабря 2006 года в 9 часов на заседании
диссертационного совета Д 220.066.01 при ФГОУ ВПО «Уральская
государственная академия ветеринарной медицины» (457100, Челябинская
обл., г. Троицк, ул. Гагарина, 13, тел. 2-48-88, 2-27-16).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Уральская
государственная академия ветеринарной медицины».

Автореферат разослан «10» ноября 2006 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



И.А. Лыкасова

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы. Молочное скотоводство занимает одно из основных мест в продовольственном комплексе страны. Значение этой отрасли определяется не только высокой долей ее в производстве валовой продукции, но и большим влиянием на экономику сельского хозяйства на уровне обеспечения населения продуктами питания (А. Данкверт, Л. Зернаева, 2003).

Молоко и кисломолочные продукты являются ценными составляющими питания человека, особенно для детей и пожилых людей. На свойство готовых продуктов большое влияние оказывает санитарное качество сырого молока (П.В. Житенко, 1987; В.П. Иноземцев, И.И. Балкавой, 1999). Качество молока зависит от многих факторов, однако основным источником загрязнения молока на первичном этапе его получения являются больные маститом коровы. Ученые и практикующие врачи уделяют большое внимание проблеме распространения и профилактики мастита, но данная проблема до настоящего времени продолжает оставаться актуальной.

Предложено множество методов лечения коров, больных маститом которые можно классифицировать на физические (низкоинтенсивное лазерное излучение), этиотропные (использование химиотерапевтических препаратов), патогенетические (внутриорбитальное введение новокаина по Д.Д. Логвинову). Для лечения при мастите у коров широко применяют антибиотики, фитонциды, сульфаниламидные, нитрофурановые и ферментные препараты индивидуально или в различных сочетаниях (И.И. Балкавой, В.М. Карташова, 1985; А.В. Бойко, М.Н. Волкова, 2003).

Основной проблемой последних лет в терапии и профилактике маститов является снижение терапевтической эффективности антибиотиков и широкое распространение резистентных к ним форм патогенных микроорганизмов. Фундаментальные исследования современной биологической и медицинской науки позволили разработать и внедрить в практику новый класс препаратов – пробиотики. Они обладают широкой гаммой позитивных фармакологических эффектов и значительно экологичнее многих других лекарственных средств (Г.А. Ноздрин, А.Г. Ноздрин, А.И. Леляк, 1998). Важным арсеналом в создании новых пробиотиков являются бактерии группы *Bacillus*. Значительных успехов в разработке пробиотических препаратов на основе *Bac. subtilis* достигли сотрудники научно- производственной фирмы «Исследовательский центр» Новосибирской области совместно с учеными кафедрами фармакологии и общей патологии Новосибирского государственного аграрного университета (НГАУ) (Г.А. Ноздрин, 2003). Разработанные ими пробиотические препараты широко применяются с превентивной целью и при различных заболеваниях, однако, до настоящего времени не разработана методология применения пробиотиков при акушерско-гинекологических заболеваниях у животных.

Цель и задачи исследований. Цель наших исследований состояла в изучении токсичности, фармакологических свойств и терапевтической эффективности нового препарата Зимум-14 40 при субклиническом мастите у коров.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить параметры острой и хронической токсичности пробиотика Зимун-1440, его эмбриотоксические и тератогенные свойства на лабораторных животных.
2. Выявить антимикробную активность Зимуна-1440 в отношении возбудителей субклинического мастита у коров. Определить аллергенные и раздражающие свойства пробиотика при местном воздействии на кожу и слизистые оболочки.
3. Установить наиболее оптимальный способ введения и дозу пробиотика при субклиническом мастите у коров.
4. Определить влияние пробиотика Зимун-1440 на некоторые морфо-биохимические показатели крови, а также состояние естественной резистентности организма на фоне терапии мастита у коров.
5. Установить изменение качественных показателей и пищевой ценности молока после применения пробиотика Зимун-1440.
6. Дать экономическую оценку эффективности применения пробиотика Зимун-1440 при субклиническом мастите у коров.

Научная новизна. Изучен ряд токсических и фармакологических характеристик нового препарата Зимун-1440. Впервые определены оптимальная доза, способ введения и доказана терапевтическая эффективность пробиотика при субклиническом мастите у коров. Установлено его положительное влияние на морфологические, биохимические показатели и факторы естественной резистентности крови коров, физико-химические и санитарно-гигиенические показатели молока и его аминокислотный состав.

Теоретическая и практическая ценность работы. Проведенное комплексное исследование нового пробиотика Зимун-1440 позволяет рекомендовать его для применения при субклиническом мастите у коров с лечебной целью. Разработанная нами схема применения пробиотика позволяет сократить сроки терапии и улучшить качество молока после выздоровления. Результаты экспериментальных исследований могут быть использованы в учебном процессе по ветеринарной фармакологии, токсикологии и акушерству. По результатам исследований оформлена заявка на изобретение «Способ лечения субклинического мастита у коров», получена приоритетная справка №2005137498/Л3(041890).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Новый пробиотик Зимун-1440 относится к группе малоопасных лекарственных веществ, не обладает кумулятивными, тератогенными, эмбриотоксическими, аллергенными и раздражающими свойствами.
- Зимун-1440 обладает выраженной антибактериальной активностью относительно возбудителей субклинического мастита у коров.
- Пробиотик Зимун-1440 обладает высокой терапевтической эффективностью при субклиническом мастите у коров; наиболее оптимальной является доза - 10 мл на животное один раз в сутки при паравагинальном введении.

- Применение пробиотика Зимун-14.40 с лечебной целью при субклиническом мастите у коров нормализует белковый и углеводный обмен, стимулирует факторы естественной резистентности, улучшает физико-химические и санитарно-гигиенические показатели и биологическую ценность молока.

- Использование пробиотика Зимун-14.40 для лечения субклинического мастита у коров экономически рентабельно.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Российской научно-практической конференции «Новые пробиотические и иммуностропные препараты в ветеринарии», НГАУ, 2003; на конференции молодых ученых «Молодые ученые в решении проблем АПК», ФГОУ ВПО «Тюменская ГСХА», 2003; на VII межрегиональной научно-практической конференции «Перспективные направления научных исследований молодых ученых и специалистов Урала и Сибири», ФГОУ ВПО «УГАВМ», г. Троицк, 2003г; на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» ФГОУ ВПО «УГАВМ», г. Троицк, 2004; на Сибирском международном ветеринарном конгрессе «Актуальные вопросы ветеринарной медицины», г. Новосибирск, 2005 г., на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Ижевск, 2005 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в которых отражены основные результаты экспериментальных исследований.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов собственных исследований, выводы, практические предложения, список использованной литературы. Работа иллюстрирована 16 таблицами. Список литературы включает 166 источника, в том числе 33 зарубежных автора.

2. Собственные исследования

2.1. Материал и методы исследований

Работа была выполнена в 2002-2005 годах на базе ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины» и учхоза «Новотроицкое» Троицкого района Челябинской области в соответствии с инициативной тематикой научно-исследовательских работ кафедры фармакологии и общей патологии Новосибирского государственного аграрного университета, регистрационный номер темы 01.200.1.13903.

Объектом исследований служил пробиотик Зимун 14.40, разработанный учеными научно-производственной фирмы «Исследовательский центр» Новосибирской области совместно с сотрудниками кафедры фармакологии и общей патологии Новосибирского государственного аграрного университета (НГАУ), содержащий споровую биомассу бактерий *Bacillus subtilis* и наполнитель. Препарат представляет собой прозрачную жидкость, при хранении допускается образование осадка желтовато-беловатого цвета на дне флакона, который при встряхивании разбивается на равномерную взвесь.

Выпускают в стерильных герметически упакованных флаконах по 10 мл. Срок хранения при температуре 6 -10°С 1 год.

В опытах были использованы 80 дойных коров в возрасте 4-5 лет с живой массой 300-350 кг, 20 кроликов с массой тела 3-3,5 кг в возрасте 1-1,5 года, 110 белых мышей массой 20-22 грамма.

Экспериментальная часть работы была проведена в II этапа. На первом этапе были изучены острая и хроническая токсичность препарата Зимун-1440, его эмбриотоксические и тератогенные свойства и антибактериальная активность.

Острую и хроническую токсичность пробиотика Зимун-1440 изучали на белых мышах согласно «Методических указаний по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» (Л.П. Маланин и др., 1988). Для определения острой токсичности было сформировано 6 опытных групп по 6 животных в каждой. Перед началом эксперимента мышей выдерживали на карантине в течение 14 суток. Испытуемый препарат вводили непосредственно в желудок. Зимун-1440 был испытан в дозах 0,8-2 мл на животное. Дальнейшее увеличение дозы было не реальным, т.к. объём желудка у белых мышей составляет 1,5-2 мл. Наблюдение за животными вели в течение 14 суток, отмечая признаки интоксикации и количество погибших животных.

Для изучения хронической токсичности препарата были сформированы 4 группы белых мышей по 10 животных в каждой. Мыши содержались на обычном рационе вивария. Каждый день на протяжении 2,5 месяцев мышам добавляли испытуемый препарат: в первой группе в дозе 0,5 мл, второй – 0,8 мл и третьей – 1 мл на животное. Четвертая группа служила контролем, они содержались на обычном рационе вивария. В ходе эксперимента учитывали следующие показатели: внешний вид и поведение животных, состояние шерстного покрова и видимых слизистых оболочек, подвижность, отношение к корму, гибель.

При изучении отдаленных последствий влияния препарата Зимун-1440 были использованы 18 белых мышей с живой массой 22-25 г. По принципу аналогов сформировали 3 группы по 6 особей в каждой (4 самки и 2 самца, которые содержались раздельно). На протяжении 2-х месяцев ежедневно в питьевую воду мышам первой группы добавляли испытуемый препарат по 0,5 мл на животное, во второй группе - по 1 мл. Третья группа служила контролем и мыши содержались на рационе вивария. За время наблюдения учитывали общее состояние, число самок, давших потомство, число мышат в помете, их подвижность, время отлипания ушей, появление шерсти, пропорциональность развития тела и хвоста, отклонения в развитии и поведении. За полученным потомством наблюдали в течение месяца.

Исследование аллергенных и раздражающих свойств пробиотика при нанесении на кожу и слизистые оболочки проводили согласно «Методических указаний по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» (Л.П. Маланин и др., 1988). Для этого у кроликов в области спины с двух сторон удаляли волосяной покров и на один участок наносили испытуемый препарат, на другой – дистиллированную воду.

Ежедневно измеряли толщину кожной складки, отмечали расчесы, признаки дерматита, выпадение волос, трещины, гиперемию. При исследовании раздражающих свойств Зимуна-1440 на слизистые оболочки, 2 капли неразбавленного препарата наносили однократно в конъюнктивальный мешок одного глаза кролика, в другой – такое же количество дистиллированной воды. Наблюдение вели в течение 3-х суток. Отмечали гиперемию, отечность, признаки конъюнктивита, отек век.

Определение антимикробной активности пробиотика относительно возбудителей субклинического мастита проводили согласно «Методических указаний по ветеринарной микробиологии и иммунологии» (Т.С. Костенко и др., 1989).

Для выделения возбудителей субклинического мастита использовали молоко от больных коров. Молоко исследовали в 8 разведениях, каждое последующее готовилось из предыдущего в пропорции 1:10. Посев проводили из последних трех разведений на следующие питательные среды: солевой агар – для выделения стафилококков; агар Эндо – для выделения кишечной палочки и сальмонелл, агар Сабуро – для выделения микроскопических грибов. Из всех разведений, кроме первого, проводили посев на обычные питательные среды: МПА (мясо-пептонный агар) и МПБ (мясо-пептонный бульон). Все посевы культивировали в термостате при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Из выросших культур готовили мазки и микроскопировали.

Выделение чистой культуры возбудителей мастита проводили по методу Дригальского (Т.С. Костенко и др., 1989) – метод посева на плотную питательную среду (МПА).

Ферментативную активность выделенных культур изучали на средах Гисса, посев культур осуществляли по общепринятой методике. После инкубирования в термостате учитывали результат ферментации углеводов.

Патогенные свойства возбудителей изучали экспериментальным заражением белых мышей. Павших мышей вскрывали, из органов и тканей делали посевы на питательные среды: агар Эндо, солевой агар, МПА, МПБ, кровяной агар. Из выросших колоний готовили мазки и микроскопировали.

Определение чувствительности выделенных возбудителей мастита к пробиотику Зимун-1440 проводили путем добавления к 2 мл стерильной жидкой питательной среды (МПБ) взвесь возбудителя и 2 мл пробиотика. Чистая культура возбудителя в питательной среде и смесь пробиотика с МПБ служили контролем. Все посевы помещали в термостат при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на 48 часов. После этого из каждой пробирки делали пересев на плотную питательную среду методом «штриха» в чашки Петри (Т.С. Костенко и др., 1989). Через 48 часов инкубирования в термостате учитывали рост возбудителя. Из всех выросших колоний готовили мазки и микроскопировали.

Исследование по установлению оптимального способа введения, дозы и терапевтической эффективности пробиотика Зимун-1440 при лечении коров, больных субклиническим маститом, проводили в ухозе «Новотроицкое» Троицкого района Челябинской области. Предварительно при диспансеризации всего поголовья коров у 40 % животных был выявлен субклинический мастит.

Диагноз устанавливали при исследовании молока маститным тестом – пробой с димастинном, двукратно с интервалом 48 часов.

Из выявленных больных животных по принципу аналогов сформировали 5 опытных групп по 3 коровы в каждой. Животным 1-ой, 2-ой, 3-ей, 4-ой и 5-ой опытных групп пробиотик вводили внутривымянно в каждую большую четверть, один раз в сутки ежедневно после вечернего доения соответственно в дозах по 5; 8; 10; 12 и 15 мл. Ежедневно молоко от опытных коров исследовали с помощью маститного теста (проба с димастинном) для обнаружения субклинического мастита.

Одновременно был испытан другой способ введения пробиотика в паравагинальную клетчатку. Для изучения терапевтического эффекта Зимун-1440 при паравагинальном введении из коров, больных субклиническим маститом, по принципу аналогов были сформированы 5 опытных групп по 5 животных в каждой. Пробиотик был испытан в дозах 5 мл, 8 мл, 10 мл, 12 мл, 15 мл. Препарат вводили 1 раз в сутки до выздоровления коров, которое подтверждали двукратным отрицательным маститным тестом.

На основании первого и второго этапов эксперимента была установлена наиболее оптимальная дозировка и способ введения пробиотика Зимун-1440, которые затем использовались при проведении научно-производственного опыта.

Из выявленных коров, больных субклиническим маститом, по принципу аналогов были сформированы 4 опытные группы животных по 10 голов в каждой. В первой группе были здоровые животные, во вторую группу были отобраны коровы с субклиническим маститом. Коров 3-ей группы лечили принятым в хозяйстве методом – ежедневно внутривымянно 2 раза в день после утренней и вечерней дойки вводили мастисан А в дозе 5 мл до полного выздоровления. Коровам 4-ой группы вводили 10 мл пробиотика Зимун-1440 в паравагинальную клетчатку ежедневно 1 раз в день до полного выздоровления. Введение препаратов продолжали до двукратной отрицательной реакции с димастинном.

У всех животных до и после выздоровления исследовали кровь и молоко. Для сравнения использовали фоновые показатели крови и молока здоровых животных.

В крови определяли: содержание гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов, выводили лейкограмму общепринятыми в ветеринарии методами.

В сыворотке крови определяли: общий белок - рефрактометрическим методом (И.П. Кондрахин, 1985), белковые фракции - нефелометрическим экспресс-методом (Б.И. Антонов, 1991), холестерин - по Ильку, при помощи набора «БИО-ЛА-ТЕСТ» (Б.И. Антонов, 1991), общие липиды - по Целльнеру (В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаева, 1988), глюкозу - глюкозо-оксидантным методом при помощи набора «Глюкоза - ФКД», пировиноградную кислоту - колориметрическим методом (модифицированный метод Умбрайт), щелочную фосфатазу по Бессею (В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев, 1988), активность АсАТ и АлАТ - по Райтману и Френкелю с помощью набора «БИО-ЛА-ТЕСТ» (И.П. Кондрахин, 1985).

Бактерицидную активность сыворотки крови определяли фотонейлометрическим методом по О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966) в модификации Ю.М. Маркова (1968) (С.И. Плященко, В.Т. Сидоров, 1979); лизоцимную активность исследовали по Ю.М.Маркову (1974) (Е.С. Воронин с соавт., 2002)., фагоцитарную активность нейтрофилов крови по методу В.С. Гостева (С.И. Плященко, В.Т. Сидоров, 1979).

В пробах молока коров жирность, плотность, белок и СОМО исследовали на молочном анализаторе «Клевер М-1», кислотность, бактериальную обсемененность и ингибирующие вещества в молоке -по ГОСТ 3624 -92;9225 – 84;23454-79, аминокислотный состав на аминокислотном анализаторе А -339.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с использованием IBM PC. Степень достоверности различий вычисляли с использованием критерия Стьюдента (Е.К. Меркурьева, 1970).

Экономическую эффективность лечебных мероприятий рассчитывали по «Методике определения экономической эффективности ветеринарных препаратов», утвержденной Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ,2000.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Изучение токсических свойств пробиотика Зимун-14.40

При определении острой токсичности препарата Зимун-14.40 было установлено, что в течение 14 суток у мышей общее состояние не изменилось, аппетит у них был сохранен, не отмечали изменений поведенческих реакций, шерстный покров был блестящий, гладкий. Клинических признаков отравления, гибели животных в период опыта не регистрировали.

При ежедневном добавлении пробиотика в питьевую воду белым мышам в дозах 0,5 мл, 0,8 и 1 мл на животное в сутки на протяжении 2,5 месяцев не было отмечено изменений аппетита, внешнего вида мышей, характера и степени активности, не наблюдали клинических признаков, свойственных отравлению, а также гибели подопытных животных.

При добавлении в питьевую воду пробиотика Зимуна-14.40 по 0,5 и 1 мл на животное в сутки на протяжении 2 месяцев было отмечено, что препарат повышал воспроизводительную функцию мышей, увеличивал число мышат в потомстве на 44,4-55,6%, стимулировал их рост и развитие, не оказывал эмбриотоксического и тератогенного действия.

Пробиотик не вызывал аллергической реакции и не оказывал раздражающего действия.

Таким образом, Зимун-14.40 согласно ГОСТ 12.1.007-76 является малоопасным препаратом и не обладает кумулятивным, эмбриотоксическим, тератогенным, раздражающим и аллергенным действием.

2.2.2. Антимикробная активность пробиотика Зимун-14.40 в отношении возбудителей субклинического мастита у коров

У 10 коров, больных субклиническим маститом, отобранных методом случайной выборки, из больных четвертей вымени были взяты пробы альвеолярного молока. При микроскопическом, бактериологическом и биологическом исследовании молока установлено, что возбудителем субклинического мастита у коров является патогенный стафилококк (*St. epidermidis*). Сопутствующей микрофлорой была кишечная палочка (*E. coli*) и бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Вышеперечисленные микроорганизмы были обнаружены в 100% проб молока. Идентификация данной микрофлоры была подтверждена ферментативными и патогенными свойствами возбудителей.

Для определения антимикробной активности препарата Зимун-14.40 в отношении возбудителей субклинического мастита были проведены посевы на жидкие, а затем пересев на плотные питательные среды смеси 2 мл мясопептонного бульона, чистых культур возбудителей (*St. epidermidis*, *E. coli*, БГКП) и смеси этих трех культур с добавлением 2 мл пробиотика Зимун-14.40. На плотных питательных средах был обнаружен рост гладких, блестящих, не прозрачных колоний, серо-белого цвета, легко снимающихся с поверхности агара. В мазках из выросших колоний были обнаружены большие грамположительные спорообразующие палочки по основным морфологическим показателям соответствующие *Bacillus subtilis*, входящей в состав пробиотика. Роста колоний стафилококков, кишечной палочки и другой патогенной микрофлоры не наблюдали.

Результаты исследований показали, что препарат Зимун-14.40 обладает антимикробной активностью к возбудителям субклинического мастита (*St. epidermidis*, *E. coli*, БГКП), что подтверждается абсолютным подавлением роста возбудителей на жидких и плотных питательных средах в опытах *in vitro*.

2.2.3. Определение оптимального способа введения и дозы пробиотика

Для установления оптимального способа введения и дозы пробиотика при субклиническом мастите у коров были испытаны 2 способа введения: внутривымянный и в паравагинальную клетчатку. Нами установлено, что при применении Зимуна-14.40 в молочную цистерну в дозе от 5 до 15 мл выздоровление животных не наступало в течение 8-9 суток. Дальнейшее применение препарата в молочную цистерну посчитали нецелесообразным, в связи с тем, что в хозяйстве при использовании мастисана А выздоровление животных наступает в среднем через 7 суток.

Нами установлено, что после введения пробиотика в молочную цистерну в молоке обнаруживались густые, белые хлопья творожистой консистенции.

Для выяснения причины появления хлопьев в молоке были проведены опыты *in vitro*. В 5 пробирок наливали по 10 мл молока от здоровых животных

и по 5 мл пробиотика Зимун-14.40, в пяти пробирках было по 10 мл молока от коров с субклиническим маститом по 5 мл препарата и в 5 пробирках - по 10 мл молока от здоровых коров без добавления пробиотика. Все пробирки помещали в термостат с температурой 37° С. Учет реакции проводили через каждые 2 часа.

Установили, что пробиотик Зимун-14.40 вызывал свертывание белковой части молока. Закисление молока от коров, больных субклиническим маститом происходило более интенсивно, и уже через 6 часов в молоке появлялись творожистые хлопья. В молоке здоровых коров при добавлении пробиотика творожистые хлопья были обнаружены только через 10 часов. Молоко коров, больных субклиническим маститом, под влиянием изучаемого пробиотика, закисало в 1,67 раза быстрее, по сравнению с молоком от здоровых животных.

Для введения пробиотика в паравагинальную клетчатку использовали иглы длиной 7-9 см, точкой вкола являлась середина расстояния между верхним углом вульвы и анусом. Иглу вводили одномоментным толчком, направляя слегка вниз, параллельно прямой кишке на глубину 5 см.

Нами установлено, что при этом способе введения препарата происходило быстрое выздоровление животных. Продолжительность лечения коров составляла 4,2-5,5 суток.

Для определения оптимальной лечебной дозы пробиотик Зимун-14.40 вводили в дозах 5, 8, 10, 12 и 15 мл ежедневно 1 раз в сутки до выздоровления, которое устанавливали по двукратной отрицательной реакции проб молока с димастинном. Более быстрый терапевтический эффект отмечали при применении препарата в дозе 10 мл.

2.2.4. Терапевтическая эффективность Зимуна-14.40 при субклиническом мастите у коров

Терапевтическая эффективность пробиотика Зимун-14.40 при лечении коров с субклиническим маститом была изучена на 20 животных, которых по принципу аналогов поделили на 2 опытные группы по 10 животных в каждой. Животных 1-ой группы лечили принятым в хозяйстве способом: ежедневно внутривымянно 2 раза в день (утром и вечером) вводили мастисан А в дозе 5 мл до полного выздоровления. Данная группа служила контролем. Коровам 2-ой группы паравагинально вводили пробиотик Зимун-14.40 в дозе 10 мл на животное ежедневно 1 раз в сутки до выздоровления, которое устанавливали по двукратной отрицательной реакции проб молока с димастинном.

Из животных контрольной группы, которым назначали мастисан А выздоровело 60% коров, продолжительность лечения составляла $7,0 \pm 0,82$ дня. У 40% животных скрытый мастит в процессе лечения перешел в клинически выраженный.

У животных опытной группы, которым вводили паравагинально пробиотик, продолжительность лечения, по сравнению с аналогами из контроля сократилась на 2,8 суток и составила в среднем $4,2 \pm 0,13$ суток при 100% эффективности. У животных опытной группы не отмечали каких-либо

осложнений. Таким образом, изучаемый препарат обладает выраженным терапевтическим действием при субклиническом мастите. При применении пробиотика эффективность лечения повышается на 40% по сравнению с контрольной группой.

2.2.5. Изменение морфологических и биохимических показателей крови больных коров

Влияние пробиотика Зимун-1440 на морфологические и биохимические показатели крови изучали на четырех группах коров по 10 животных в каждой. В 1-ой группе были клинически здоровые коровы, с показателями крови которых сравнивали результаты исследования крови у опытных животных после выздоровления. Во 2-ой, 3-ей и 4-ой группах были коровы с субклиническим маститом. Коровам 3-ей группы с лечебной целью ежедневно внутривымянно 2 раза в сутки (утром и вечером) вводили мастисан А в дозе 5 мл до выздоровления. Эти животные служили контролем. Коровам 4 - ой опытной группы вводили 10 мл пробиотика Зимун-1440 в паравагинальную клетчатку ежедневно 1 раз в сутки до выздоровления.

У животных контрольной группы после выздоровления количество эритроцитов и содержание гемоглобина в крови по сравнению с показателями больных коров до лечения возросло на 2,6% и на 1,4% соответственно. У животных опытной группы после выздоровления под влиянием изучаемого пробиотика количество эритроцитов и содержание гемоглобина по сравнению с показателями у больных животных до лечения достоверно увеличилось на 60,9 и 73%, а относительно аналогов из контроля – на 57,0 ($P<0,01$) и 58% ($P<0,05$) соответственно. По сравнению с показателями у здоровых животных количество эритроцитов и гемоглобина было выше у коров опытной группы на 5,3 и 1,8% , в то время как у коров контрольной группы данные показатели были ниже на 32,9 и 3,8 % соответственно. У животных контрольной и опытной групп изменение содержания гемоглобина и числа эритроцитов были в пределах верхней границы физиологической нормы.

Количество лейкоцитов в крови опытных и контрольных групп после выздоровления по сравнению с показателями крови больных животных до лечения уменьшалось на 32,8 и 34,5% соответственно. Количество лейкоцитов в крови после выздоровления было незначительно выше у коров опытной группы по сравнению с аналогами из контроля. У коров опытной группы содержание лейкоцитов относительно показателей здоровых животных увеличивалось на 1%, у аналогов из контрольной группы уменьшалось на 1,7%.

Количество лимфоцитов, моноцитов в крови коров опытной и контрольной групп после выздоровления, по сравнению с данными у больных животных до лечения увеличивалось. Но содержание лимфоцитов и моноцитов в крови опытных коров было на 4,6 и 11,4 % соответственно выше по сравнению с аналогичными данными из контрольной группы.

Число эозинофилов в крови коров опытной группы после выздоровления, было достоверно на 30,3 % ($P < 0,001$) ниже по сравнению с аналогичным показателем у коров контрольной группы, которым применяли мастисан А.

В крови животных опытной группы число сегментоядерных нейтрофилов достоверно уменьшалось на 23,4%, а в крови коров контрольной группы - на 20,4% соответственно по сравнению с больными коровами. В опытной и контрольной группах животных количество сегментоядерных нейтрофилов после выздоровления достоверно возрастало по сравнению с содержанием их в крови здоровых коров на 7,6% и 11,9% соответственно. Число палочкоядерных нейтрофилов в крови коров опытной группы после выздоровления увеличивалось на 30,7% ($P < 0,05$), у аналогов из контрольной группы на 2,4% по сравнению с показателями больных животных до лечения. Изменения нейтрофилов, как в опытной, так и в контрольной группах находились в пределах физиологической нормы.

Изменения гематологических показателей, подобные описанным на фоне применения пробиотика, можно наблюдать при усилении функциональной деятельности костного мозга, при повышении функции моноклеарной системы, при активизации окислительно-восстановительных процессов в организме.

В крови коров контрольной группы, после выздоровления, по сравнению с больными животными до лечения увеличилось содержание общего белка на 13,7%, γ -глобулинов на 14,3%. Было отмечено также увеличение β - и α -глобулинов при одновременном снижении уровня альбуминов (табл. 1).

1. Влияние пробиотика Зимуна-14.40 на показатели белкового спектра крови ($\bar{X} \pm S\bar{X}$; n=10)

Показатели крови	Группы коров			
	Здоровые	Больные до лечения	Контрольная (после выздоровления)	Опытная (после выздоровления)
Общий белок г/л	69,71 \pm 1,40	61,90 \pm 1,12	70,40 \pm 1,25	69,80 \pm 1,25
Альбумины,%	46,02 \pm 1,20	46,08 \pm 1,24	33,14 \pm 1,44	45,39 \pm 1,75**
α -глобулины,%	10,10 \pm 0,37	9,68 \pm 0,55	15,14 \pm 0,78	11,46 \pm 0,51**
β -глобулины,%	16,47 \pm 0,71	13,47 \pm 0,71	16,55 \pm 0,58	14,56 \pm 0,71*
γ -глобулины,%	27,41 \pm 0,66	30,77 \pm 1,71	35,17 \pm 1,40	28,59 \pm 1,36**

Примечание: * - достоверно при $P < 0,05$; ** - достоверно при $P < 0,01$

В сыворотке крови животных опытной группы после выздоровления, по сравнению с больными животными до лечения увеличилось содержание общего белка на 12,8%, β -глобулинов на 8,1%, , содержание гамма-глобулинов уменьшилась на 7,1%. Необходимо отметить, что все показатели белкового спектра сыворотки крови у коров, которым применяли пробиотик, был сходны с аналогичными показателями крови здоровых животных.

Уровень глюкозы у животных контрольной группы после выздоровления незначительно повышался по сравнению с показателями у больных животных, до лечения, однако не достигал уровня ее содержания у здоровых коров. Применение мастирана А при лечении субклинического мастита у коров вызывало снижение пировиноградной кислоты на 6,4% по сравнению с показателями больных коров. При этом уровень пировиноградной кислоты оставался на 70,6% ($P < 0,001$) выше, а содержание глюкозы на 12,1% ($P < 0,01$) ниже по сравнению с показателем здоровых коров. В крови коров опытной группы содержание глюкозы и пировиноградной кислоты были в пределах физиологических показателей. Содержание глюкозы у этих животных было достоверно выше по сравнению с больными животными на 24,6% и превосходило на 2,6% аналогичные показатели у здоровых коров. Распад глюкозы в организме коров на фоне применения Зимуна-14.40 происходил менее интенсивно, о чем свидетельствует концентрация пировиноградной кислоты – $160,32 \pm 2,06$ мкмоль/л (у здоровых животных – $170,31 \pm 1,81$ мкмоль/л).

У животных контрольной группы после выздоровления уровень холестерина достоверно повышался на 49,0% и незначительно понижалось содержание общих липидов по сравнению аналогичными показателями у больных коров до лечения.

Пробиотик Зимун-14.40, изменял содержание основных компонентов липидного обмена в крови, но с ограниченными энергетическими затратами. У животных опытной группы после выздоровления содержание холестерина в крови было равно $2,05 \pm 0,38$ ммоль/л, общих липидов- $6,40 \pm 0,69$ г/л. Эти показатели практически не отличались от показателей крови здоровых коров.

Используемые в опыте лекарственные препараты изменяли течение ферментных реакций в организме коров (табл.2).

В контрольной группе у коров после выздоровления отмечали увеличение концентрации щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Однако, эти изменения были на 26,4 % менее выражены по сравнению с показателями у больных животных до лечения, но по сравнению с данными у здоровых коров активность фермента в крови была выше на 66,7% ($P < 0,001$).

У животных опытной группы после выздоровления активность щелочной фосфатазы была ниже аналогов из контроля на 18,5%, и в пределах физиологических показателей у здоровых животных.

Активность аминотрансфераз в крови коров изменялась на фоне лечения. Так, у животных контрольной и опытной групп после выздоровления АсАТ по сравнению с аналогичной активностью фермента в крови больных животных до лечения понизилась на 11,1 и 24,4% соответственно. Аналогичными были

изменения активности АЛАТ, однако уровень активности аминотрансфераз в крови коров опытной группы был аналогичен данным у здоровых животных.

2. Влияние мастисана А и пробиотика Зимун-14.40 на активность некоторых ферментов в сыворотке крови коров в период лечения ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n= 10)

Группы коров	Показатели крови		
	Щелочная фосфатаза (нкат/л)	АсАТ (нкат/л)	АЛАТ (нкат/л)
Здоровые	546,00 ± 22,27	330,02 ± 20,01	200,01 ± 10,01
Больные субклиническим маститом	1235,80 ± 24,94	450,03 ± 30,01	450,05 ± 25,04
Контрольная (после выздоровления)	910,00 ± 25,88	400,04 ± 22,03	300,05 ± 15,04
Опытная (после выздоровления)	741,40 ± 30,17**	340,02 ± 15,06*	190,02 ± 10,09***
Норма ¹	483,0-1534,0	466,8-2667,0	111,7-1000,2

Примечание: ¹ - В. М. Холод, Г.Ф. Ермолаев, 1988; * - достоверно при P < 0,05; ** - достоверно при P < 0,01; *** - достоверно при P < 0,001

В крови коров, больных субклиническим маститом наблюдалось повышение лизоцимной активности в 1,3 раза, фагоцитарной активности – в 1,1 раз и бактерицидной активности в 1,1 раза, по сравнению с соответствующими показателями у здоровых коров. После выздоровления у коров контрольной группы наблюдается незначительное повышение исследуемых показателей: лизоцимная активность повышалась в 1,3 раз, фагоцитарная – в 1,1 раза и бактерицидная – в 1,2 раза соответственно по сравнению с показателями больных коров. У животных опытной группы пробиотик достоверно увеличивал лизоцимную, фагоцитарную и бактерицидную активность сыворотки крови в 1,7; 1,3 и 1,8 раз в сравнении с показателями больных животных, относительно контрольных животных на 33,2; 15,5 и 40,7% и в сравнении с показателями крови здоровых коров в 2,3; 1,4 и 2,0 раза соответственно.

2.2.6. Динамика физико-химических и санитарно-гигиенических показателей молока при применении Зимун -14.40 при субклиническом мастите у коров

Конечным итогом лечения коров, больных субклиническим маститом, является восстановление продуктивности животных и качественных характеристик получаемого молока.

Молоко от коров контрольной группы после выздоровления отличалось по физико-химическим и санитарным показателям от молока здоровых животных. Препарат выделялся с молоком во время лечения и 4 суток после

выздоровления, о чем свидетельствовали положительные результаты исследования на ингибирующие вещества. Бактериальная обсемененность молока составляла 300-500 тыс. бактерий в 1 см³. Молоко не соответствовало требованиям ГОСТа по плотности, СОМО, кислотности.

У животных опытной группы после выздоровления кислотность молока по сравнению с аналогичными данными больных животных до лечения повысилась до нормативных показателей (16,60°Т), что свидетельствует о нормализации титра молочнокислых бактерий, накапливающих молочную кислоту, которая замедляет процессы развития патогенной микрофлоры. Молоко по бакобсемененности соответствовало высшему классу (менее 300 тыс. бактериальных клеток в 1 см³). Плотность и кислотность молока от коров опытной группы после выздоровления соответствовало требованиям государственного стандарта, массовая доля жира и белка – базисной норме. Таким образом, молоко от коров, которым с лечебной целью применяли Зимун-1440 сразу после выздоровления животных могло быть реализовано без ограничений, в то время как молоко от животных контрольной группы в течение 4-х последующих суток подлежало утилизации.

2.2.7. Изменения аминокислотного состава молока коров при лечении субклинического мастита у коров

Биологическая ценность пищевого продукта отражает его способность удовлетворять потребность организма в аминокислотах.

В молоке коров контрольной группы после выздоровления возрастало содержание практически всех аминокислот, однако их уровень был значительно ниже по сравнению с молоком здоровых животных. Так, содержание аланина, валина, тирозина ниже, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых животных в среднем на 4-5%; метионина, аспарагиновой кислоты, лизина, лейцина на 20-22%, серина, гистидина, изолейцина на 45-48%. У животных опытной группы после выздоровления в аминокислотном спектре молока содержание всех незаменимых аминокислот было идентично аналогичной концентрации их в молоке здоровых животных, а содержание некоторых из них даже превосходило аналогичные показатели. Так, содержание триптофана было достоверно в 2,5 раза выше, лейцина, изолейцина, метионина, лизина, валина и фенилаланина, от 7,11 до 67,8% больше по сравнению с данными молока у здоровых животных. Повысилось также содержание заменимых аминокислот – серина, гистидина, тирозина и аланина в 1,2 – 1,7 раза, а глицина и цистина в 4 раза.

Для более полной характеристики биологической ценности продукта используют аминокислотный СКОР, который отражает содержание незаменимых аминокислот в молоке в относительных величинах в сравнении с «идеальным» белком.

Молоко здоровых коров в нашем опыте по содержанию незаменимых аминокислот значительно отличалось от «идеального» белка. Так, аминокислотный СКОР в среднем составлял 42,8%, что доказывало низкую

питательную ценность данного продукта. При субклиническом мастите данный показатель был еще менее выражен – в среднем 23,3%. У животных контрольной группы содержание в молоке некоторых аминокислот приближалось к их содержанию у здоровых животных, но все же это молоко не имело максимального количества всех сочетающихся аминокислот. Наиболее приближенным к эталону было молоко после лечения пробиотиком Зимун-1440. Оно по составу всех незаменимых аминокислот в среднем на 71,9% соответствовало «идеальному» белку, что свидетельствовало о более высокой его биологической ценности.

Экономическая эффективность лечебных мероприятий на 1 рубль затрат при лечении субклинической формы мастита у коров составила: - у животных контрольной группы – 35,45 руб; у коров опытной группы – 75,83 руб;

3. ВЫВОДЫ

1. Пробиотик Зимун-1440 не обладает острой и хронической токсичностью, эмбриотоксическими, тератогенными, аллергенными и местнораздражающими свойствами.

2. Препарату присущи выраженные антимикробные свойства в отношении возбудителей субклинического мастита (патогенного стафилококка (*St. epidermidis*), кишечной палочки (*E. coli*) и бактерий группы кишечной палочки (БГКП)).

3. Интерцистернальное введение препарата в дозах от 5 до 15 мл вызывает образование творожистых хлопьев в результате закисления молока. Оптимальным способом его введения при лечении субклинического мастита у коров является инъекция в паравагинальную клетчатку в дозе 10 мл на животное в сутки до выздоровления.

4. Действие препарата сопровождается достоверным изменением в морфо-биохимическом статусе крови коров:

- препарат стимулирует лейкопоз и окислительно-восстановительные процессы. Количество эритроцитов и гемоглобина в периферической крови опытных животных было выше на 57,9 и 5,8%, чем у аналогов из контроля;

- пробиотик активизирует факторы естественной резистентности организма. Лизоцимная, фагоцитарная и бактерицидная активность сыворотки крови у опытных животных в 1,3; 1,1 и 1,4 раза превышала аналогичные показатели у контрольных коров.

- препарат нормализует белковый, углеводный и жировой обмена. У опытных животных в сыворотке крови количество глюкозы, холестерина превышало показатели контрольных коров на 11,67; 34,86%. Содержание общих липидов в сыворотке крови и активность АсАТ и АлАТ у опытных животных была ниже аналогов из контроля на 28,33; 15,0 и 36,67% соответственно.

5. Зимун-1440 нормализует физико-химические, санитарно-гигиенические показатели молока и повышает его биологическую ценность:

- снижает бактериальную обсемененность, повышает содержание белка на 6,6% и жира на 1,7%, нормализует кислотность и плотность молока;

• в молоке коров повышается концентрация незаменимых (валин, метионин, фенилаланин, лизин, изолейцин, лейцин, триптофан) на 7,1-67,8%, и заменимых (серин, аланин, гистидин, цистин, тирозин) аминокислот в 1,5 - 4 раза.

6. Эффективность при применении пробиотика Зимун-1440 с лечебной целью при субклиническом мастите у коров составляет 100 %, продолжительность лечения – $4,2 \pm 0,13$ суток, экономическая эффективность при этом – 75,83 рубля на 1 рубль затрат, а при использовании мастисана А – 35,45 рублей.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ

При субклинической форме мастита у коров с лечебной целью рекомендуем применять пробиотик Зимун-1440 путем введения в паравагинальную клетчатку в дозе 10 мл на животное один раз в сутки до выздоровления.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Ноздрин, Г.А. Определение чувствительности возбудителей субклинического мастита у коров к препарату Зимун-1440 *in vitro* / Г.А. Ноздрин, А.С. Мижевикина, О.В. Епанчинцева // Новые пробиотические и иммуностропные препараты в ветеринарии: Материалы Российской научно-практической конф. / НГАУ, 2003. – С56-58.
2. Мижевикина, А.С. Изучение острой и хронической токсичности препарата Зимун-1440 // Новые пробиотические и иммуностропные препараты в ветеринарии: Материалы Российской научно-практической конф. / НГАУ, 2003. – С. 73-74.
3. Мижевикина, А.С. Изучение эмбриотропных и тератогенных свойств пробиотика Зимун-1440 // Молодые ученые в решении проблем АПК: Материалы конф. мол. учен.- Тюмень, 2003. – С. 45.
4. Мижевикина, А.С. Физико-химические и санитарно-гигиенические показатели молока при лечении субклинического мастита у коров пробиотиком Зимун-1440 / А. С. Мижевикина, Г.А. Ноздрин // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Материалы Сиб. междуна. ветер. конгр. - Новосибирск, 2005. – С. 254-255.
5. Мижевикина, А.С. Влияние пробиотика Зимун-1440 на морфологические показатели сыворотки крови коров при скрытом мастите // Материалы Всероссийской науч.-практ. конф. молод. ученых и специалистов. - Ижевск, 2005. – С.
6. Ноздрин, Г.А. Установление оптимального способа введения и дозы пробиотика Зимун-1440 при лечении субклинического мастита у коров / Г.А. Ноздрин, А.С. Мижевикина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2006. - №4. - С.68-69

На правах рукописи

Мижевкина Анна Сергеевна

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКА ЗИМУН-14.40
ПРИ СУБКЛИНИЧЕСКОМ МАСТИТЕ У КОРОВ**

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией

автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Сдано в набор 1.11.06. Подписано в печать 3.11.06
Формат 60x84/16. Объем 1 печ. л. Тираж 100 экз.
Заказ № 125. Гарнитура Times New Roman

Издательский центр УГАВМ, лицензия ЛР №021252 от 31 октября 1997 г.
457100, г. Троицк, Челябинская обл., ул. Гагарина 13

