

На правах рукописи

Тагирмирзоев Багир Маилович

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
СРЕДСТВ И СПОСОБОВ ПРОФИЛАКТИКИ
И ЛЕЧЕНИЯ МАСТИТА У КОРОВ**

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

**АВТОРЕФЕРАТ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Курск – 2015

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Курская государственная
сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Евглевский Анатолий Алексеевич

Официальные оппоненты: **Скворцов Владимир Николаевич**,
доктор ветеринарных наук, профессор,
директор Белгородского филиала
ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт экспери-
ментальной ветеринарии имени Р.Я.
Коваленко»

Шевцов Илларион Андреевич,
кандидат ветеринарных наук, ОБУ
«Курская городская станция по борьбе с
болезнями животных», руководитель

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Белгородский государст-
венный аграрный университет имени
В.Я. Горина»

Защита состоится «18» мая 2015 г. в «10-00» часов на заседании
диссертационного совета Д 220.040.03 при ФГБОУ ВПО «Курская
государственная сельскохозяйственная академия имени профессора
И.И. Иванова» по адресу: 305021, г. Курск, ул. К. Маркса, 70.
Тел. (4712) 53-13-30, факс (4712) 58-50-49.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО
«Курская государственная сельскохозяйственная академия имени
профессора И.И. Иванова» и на сайте www.kgsha.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Рыжкова Галина Фёдоровна

Актуальность темы исследований. Многообразие видов и свойств стафилококков, стрептококков, E.coli, коринебактерий, Ps. aeruginosa, микоплазмы, плесневые грибы и поражения ими органов, тканей и в частности молочной железы коров являются одной из сложных проблем, стоящих перед наукой и практикой.

Получение качественного молока зависит от породы крупного рогатого скота, условий содержания, кормления, доения, соблюдения комплексной программы борьбы с маститом (гр. mastos – грудь, сосок) с использованием эффективных экологически безопасных средств профилактики и лечения больных коров.

Импорт дешевого сухого молока и заменителей (пальмовое, кокосовое масло), низкий технологический и технический уровень многих предприятий молочного скотоводства, превалирующий поток импортных диагностических, профилактических и терапевтических препаратов способствуют сокращению срока использования коров, снижению качества и увеличению себестоимости молока.

Соблюдение общепринятых нормативных показателей содержания в молоке до 500 тыс/мл соматических клеток и бактериальной обсемененности не более 150 тыс/мл способствует получению доброкачественного молока и молочных продуктов.

Для диагностики субклинических форм мастита с определением концентрации соматических клеток в основном используют два препарата, содержащие поверхностно-активные вещества – димастин с индикатором фенолрот и мастидин с бромкрезолпурпуром с использованием молочнок-контрольных пластинок и подсчет соматических клеток под микроскопом.

Для профилактики инфицирования вымени у коров в сухостойный период используют интрацистернальное введение антибиотиков для закрытия отверстия соска и защиты проникновения микроорганизмов в вымя до 100 дней.

Изучено, что к основным антибиотикам проявляется резистентность у S.aureus до 60-70 %. Использование одних антибиотиков с другими, внесение в их состав клавулановой кислоты, органических кислот, Трилона-Б, аргинина, колистина, пиперазинового радикала, фтора не обеспечивает качественного прорыва в преодолении антибактериальной резистентности микроорганизмов.

Степень ее разработанности. В исследованиях ряда авторов доказано, что необходимы иные научно-обоснованные подходы повышения биоцидной и лечебной эффективности антибиотиков (Поздеев О.К., 2010; Податская Е.Н., 1998).

В связи с запретом наличия антибиотиков в молоке возникает необходимость разработки биоцидных и лечебных средств без антибиотиков и соответствующих биопрепаратов.

С учетом воздействия внешних факторов на биологические и эволюционно сложившиеся свойства микроорганизмов целесообразно

использовать инактивированные стафилококковые или стафилококковые анатоксин-вакцины с выращиванием микроорганизмов на синтетических питательных средах вместо МПГБ и эффективных детоксикаторов и полимеризаторов комплекса токсино-аллергенов вместо канцерогенного формальдегида и ртутисодержащего консерванта – мертиолята и повышения эффективности антибиотиков (Безгин В.М., 2011; Самуйленко А.Я., 2005, 2007; Воробьев А.А., 1999).

Исходя из актуальности, были определены цель и задачи исследований.

Цели и задачи работы. Целью научных исследований явилось совершенствование жидкой минеральной питательной среды для выращивания стафилококков, изыскание новых детоксикаторов и полимеризаторов при изготовлении стафилококковой анатоксин-вакцины и повышения биоцидных и лечебных свойств тетрациклина и офлоксацина для профилактики и лечения коров, больных маститом.

Для достижения поставленной цели были определены и решены следующие задачи:

- усовершенствовать жидкую и плотную с 2,5 % агаром минеральную питательную среду для выращивания и способов выделения S.aureus;
- разработать рациональную технологию получения стафилококковой анатоксин-вакцины;
- определить способы применения стафилококковой анатоксин-вакцины для профилактики и лечения коров, больных маститом;
- изучить биоцидные и лечебные свойства глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом отдельно и с тетрациклином и офлоксацином в отношении S.aureus и коров, больных маститом.

Научная новизна исследований. Впервые повышено биоцидное и лечебное действие тетрациклина и офлоксацина в отношении лабораторных и свежесывленных S.aureus от коров, больных маститом.

Определена терапевтическая эффективность экспериментальных тетрациклина и офлоксацина при лечении коров, больных разными формами маститов. Повышение биоцидного действия антибиотиков достигнуто полимеризацией 0,2 % формальдегидом или 0,1 % глутарового альдегида с 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлоридом, а на вазелиновой основе эффективность лечения коров, больных маститом.

В последующем на основе биоцидных свойств глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом были изготовлены и успешно апробированы мази, гели без антибиотиков с учетом того, что глутаровый альдегид при биоразложении составляет более 90 % и обладает повышенными биоцидными свойствами.

Приоритет новизны научных исследований подтвержден получением патента №246078 от 27.11.2012 г., докладами на 3-х международных научно-практических конференциях (2012, 2013, 2014 гг.) и публикациями 6 статей в журнале «Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии», который рекомендован ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определен мониторинг *S.aureus* на чувствительность к антибиотикам, выделенных из молока и сосков пораженных вымени у коров, больных маститом и лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* в регионе с повышенным геомагнитным полем.

Установленная повышенная устойчивость *S.aureus* к температуре, хлорамину и чувствительность к глутаровому альдегиду, алкилдиметилбензиламмония хлориду целесообразно учитывать при терапии больных животных и проведения ветеринарно-санитарных мероприятий.

На основе детоксицирующих и полимеризирующих свойств глутарового альдегида, формальдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом изготовлены и апробированы в молочных комплексах и на ферме Учхоза «Знаменское» «Курская ГСХА» ряд экспериментальных серий стафилококковой анатоксин-вакцины для профилактики и лечения коров, больных маститом. Установленная биоцидная эффективность стафилококковой анатоксин-вакцины явилась обоснованием использования ее лечебных свойств.

Использование биоцидных и полимеризирующих свойств глутарового альдегида отдельно и с четвертичным аммониевым соединением позволило повысить биоцидные и лечебные свойства антибиотиков на мазевой основе при лечении коров, больных маститом, а в последующем эффективной лекарственной формы без антибиотиков. Полученные результаты научных исследований создают перспективу в решении комплексной программы борьбы с маститом коров, увеличения сроков использования коров и получение доброкачественной молочной продукции и здоровых телят.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения диссертации использовались клинический, эпизоотологический, бактериологический, биохимический и другие методы исследований.

Клинические признаки маститов у коров изучали путем наблюдения за больными животными непосредственно на фермах. Для диагностики коров больных маститом использовали клинические, лабораторные исследования с мастидином.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютера с процессором Intel Core 2 Quad, пакета программного обеспечения Microsoft Office 2007 и Statistika 70 с применением корреляционного однофакторного дисперсионного анализа по качественным показателям.

Полученные цифровые результаты обрабатывали статистически граничные значения, которые определяли по показателю Стьюдента для 5 % и 1% уровня значимости в зависимости от числа степеней свободы.

Эффективность используемых концентраций дозы стафилококковой анатоксин-вакцины и экспериментальных антибиотиков определяли по следующим показателям: суммарная продолжительность лечения животных – 80–100 % – высокоактивная доза, 40-80 % активная доза и

менее 40 % слабоактивная доза, разница срока лечения и биоцидного действия производственных и экспериментальных тетрациклина и офлоксацина.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты разработки и апробации жидкой и плотной минеральной питательной среды для выделения и выращивания *S.aureus*;
2. Способ и средства выделения чистой культуры стафилококков;
3. Материалы изыскания рациональной технологии получения и применения стафилококковой анатоксин-вакцины;
4. Биоцидные и лечебные свойства глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом отдельно и с тетрациклином или офлоксацином в отношении *S.aureus* и коров, больных маститом.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения диссертации были изложены на трех международных научно-практических конференциях (с публикацией материалов) и получили положительную оценку.

По материалам диссертации опубликовано 11 научных статей, из них 6 в журналах ВАК РФ, получен 1 патент на изобретение.

Материалы диссертации изложены на 116 страницах в компьютерном исполнении, включают общую характеристику работы, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы, практические предложения, список литературы содержит 218 источников, в том числе 95 зарубежных авторов и приложения. Диссертация содержит 11 таблиц и 7 рисунков.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии, радиобиологии и фармакологии ФГБОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И. И. Иванова». Экспериментальные исследования проводили на базе учхоза «Знаменское», молочном комплексе «Надежда», Курской областной ветеринарной лаборатории.

Объектом исследований послужили лабораторные и свежевыделенные золотистые стафилококки – *S.aureus* выделенные от коров больных маститом, экспериментально зараженных морских свинок и мышей.

Пять штаммов *S.aureus* были выделены из пораженных сосков вымени коров учхоза «Знаменское» и из гнойных ран. Лабораторные штаммы *S.aureus* использовали из Курской областной ветеринарной лаборатории, Жуковской ветеринарной лаборатории Калужской области. Штаммы стафилококков выращивали и хранили на мясоглицириновом агаре (МГА), мясоглицириновом бульоне (МГБ), минеральном агаре и в жидкой синтетической питательной среде. При этом в МПБ и жидкой синтетической питательной среде штаммы *S.aureus* продуцировали золотистый пигмент, коагулировали кроличью плазму через два часа давали положительную реакцию с кроличьей плазмой на стекле, обладали гемолитической активностью.

Лабораторные и свежевыделенные *S.aureus* изучали на устойчивость к амоксициллину, тетрациклину, эритромицину, энрофлоксацину, линкоспектину, кфенолу, формальдегиду.

Клинические признаки маститов у коров и диспепсии телят изучали путем наблюдения за больными животными непосредственно на фермах учхоза «Знаменское» и молочном комплексе «Надежда». Для диагностики коров, больных маститом использовали клинические, лабораторные исследования с мастидином.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютера с процессором Intel Core 2 Quad, пакета программного обеспечения Microsoft Office 2007 и Statistika 7.0 с применением корреляционного однофакторного дисперсионного анализа по качественным показателям.

В целом исследования проводили по следующим разделам, представленным на рисунке 1.

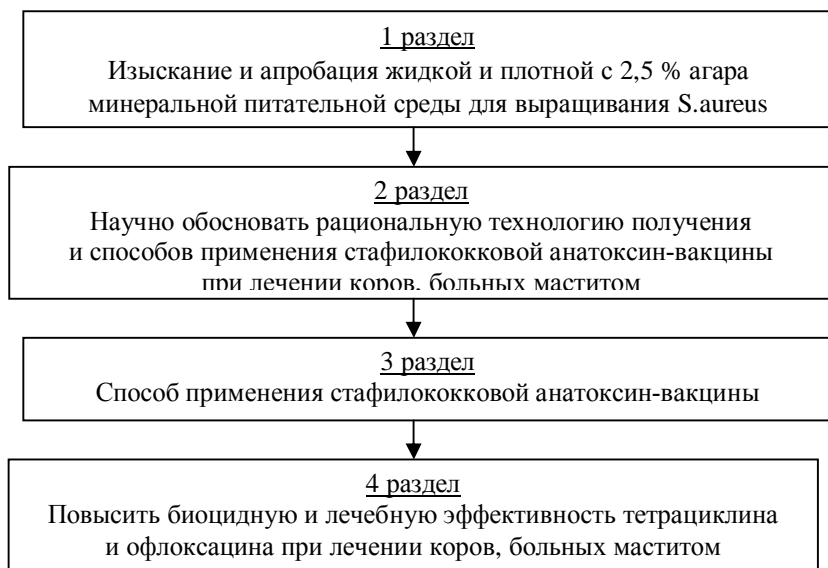


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Отдельные материалы и методы исследований изложены в семи разделах собственных исследований.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты изыскания рационального состава синтетической питательной среды для выращивания стафилококков

В настоящее время биофабричное производство стафилококковой анатоксин-вакцины базируется на выращивании золотистого стафилококка на мясогидролизатном или казеиногидролизатном глицериновом бульоне в биобутылях с подачей углекислого газа и проведение детоксикации и полимеризации комплекса токсинов 0,5-0,7 % формальдегидом. Основными недостатками технологии является слабое накопление стафилококков при выращивании на мясогидролизатном бульоне до 3-4 млрд/мл и использование формальдегида и ртути содержащего консерванта, обладающие канцерогенными свойствами.

После многократных контрольных испытаний был определен оптимальный состав синтетической питательной среды, обеспечивающая максимальное накопление стафилококков и концентрацию экзо- и эндотоксинов. Оптимальный состав синтетической жидкой питательной среды, рост стафилококков в 2-х литровых биобутылях с объемом 1 литр, накопление стафилококков и концентрация комплекса токсинов представлено в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Оптимальный состав жидкой синтетической питательной среды для выращивания стафилококков при получении анатоксин-вакцин

№ п/п	Наименование компонентов	Количество в граммах
1	Лимонная кислота	5
2	Фосфорнокислый калий 2-х замещенный	3
3	Фосфорнокислый натрий 2-х замещенный	3
4	Хлористый натрий	2
5	Сернокислый цинк	0,3
6	Сернокислый магний	1,0
7	Сернокислое железо	0,5
8	Глицерин	30 мл
9	Дистиллированная вода	До 1 литра

Реакция среды устанавливается 5 % аммиака до 7,4 – 7,6 перед автоклавированием. Полученные результаты культивирования микроорганизмов представлены в таблице 2.

Из полученных данных следует, что максимальное накопление лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* при выращивании на жидкой синтетической среде составляет 9-11 млрд/мл, а концентрация экзо- и эндотоксинов после автоклавирования достигает 0,8 мг/мл. В то же время при выращивании *S.aureus* на МПГБ концентрация биомассы и комплекса токсинов после автоклавирования составляет 3-4 млрд/мл и 0,4 мг/мл,

соответственно, что практически более чем вдвое меньше показателей при использовании синтетической питательной среды.

Таблица 2 – Рост и накопление *S.aureus*

№ п/п	Наименование микроорганизмов	Сроки выращивания (суток)	Синтетическая среда		Мясопептонгидролизатный глицириновый бульон	
			концентрация <i>S.aureus</i> , млрд/мл	содержание экзо- и эндотоксина, мг/мл	концентрация <i>S.aureus</i> , млрд/мл	содержание экзо- и эндотоксина, мг/мл
1	Лабораторный штамм <i>S.aureus</i>	5	4-5	0,4	1-2	0,2
		10	9-11	0,9	3-4	0,3
2	Свежевыделенный штамм <i>S.aureus</i>	5	4-5	0,4	1-2	0,2
		10	9-11	0,9	3-4	0,3

С учетом нестабильного состава мясогоидролизатнопептонного глициринового бульона и низкой концентрации *S.aureus* по сравнению с предложенной синтетической жидкой питательной средой были приготовлены плотные среды с 2,5 % агара для ускоренного выделения стафилококков. В сравнительном аспекте были изготовлены и апробированы два варианта плотной среды с 2,5 агара при разведении минеральной среды 1:1 и 1:2 при выращивании *S.aureus* в пробирках со скошенным агаром. После выращивания лабораторных и свежевыделенных *S.aureus* был установлен ускоренный рост на плотной питательной среде при разведении жидкой синтетической среды в соотношении 1:1. Состав плотной минеральной среды с 2,5 % агара представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав плотной синтетической среды с 2,5 % агара для выделения и поддержания стафилококков

№ п/п	Наименование солевых компонентов	Количество в граммах
1	Лимонная кислота	2,5
2	Фосфорнокислый калий 2-х замещенный	1,5
3	Фосфорнокислый натрий 2-х замещенный	1,5
4	Хлористый натрий	2
5	Сернокислый цинк	0,2
6	Сернокислый магний	0,5
7	Сернокислое железо	0,25
8	Агар	2,5
9	Глицерин	15 мл
10	Дистиллированная вода	До 1 литра

Нейтрализацию питательной среды с 2,5 % агара проводили 5 % аммиаком до 7,4-7,5 перед автоклавированием. После посева *S.aureus* пастеровской петлей из суспензии бульонной культуры происходило полное покрытие поверхности агара в пробирках в течение 3-4 суток. Полученные результаты роста *S.aureus* на плотной питательной среде были использованы для выделения чистой культуры стафилококков и определению чувствительности к антибиотикам.

3.2. Результаты получения и применения стафилококковой анатоксин-вакцины

Для лечения животных от стафилококкозов впервые Н. Олштейн в 1936 году получил и применил анатоксин. Подкожные введения и примочки пораженных участков кожи анатоксином ускоряли прекращение нагноения, сокращали продолжительность болезни и обеспечивали выздоровление.

Наличие в препарате анатоксинов и обезвреженных автоклавированием стафилококков не отражало истинную трактовку, название препарата – анатоксином. Правомерным является предложенное название анатоксин-вакцина.

Использование мясогоидролизатного пептонного глициринового бульона не обеспечивало максимального накопления стафилококков, а 0,5-0,7 % формальдегид не приводил к полной детоксикации токсинов и следовательно, превращение их в полноценный анатоксин.

В последнее время установлено, что полноту детоксикации стафилококковых и стрептококковых токсинов обеспечивает этоний и другие четвертичные аммониевые соединения.

С учетом того, что многие альдегиды способны алкилировать аминосульфидрильные, карбоксильные группы белков и низкомолекулярные органические соединения возникло биотехнологическое обоснование повышения активности стафилококковой анатоксин-вакцины путем выращивания микроорганизмов на синтетических питательных средах и подбору более эффективных, доступных и экологически безопасных детоксикаторов и полимеризаторов комплекса токсинов.

В основе получения стафилококковой анатоксин-вакцины использовали синтетическую жидкую питательную среду для выращивания стафилококков. В сравнительном аспекте использованы более эффективные детоксикаторы и полимеризаторы стафилококковых токсинов глутаровый альдегид с алкилдиметилбензиламмония хлоридом или формальдегидом. Обеспечение полной детоксикации и инактивации стафилококковых токсинов - аллергенов получено с помощью глутарового альдегида с этонием и глутаровым альдегидом с алкилдиметилбензиламмония хлоридом. В целом этоний и алкилдиметилбензиламмония хлорид являются четвертичными

аммонийными соединениями и проявляют сходные биоцидные, дезинфицирующие и лечебные свойства.

Сравнительная оценка полноты детоксикации и инактивации стафилококковых токсино – аллергенов не выявила различий между эффективностью глутарового альдегида с этонием или глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом. В то же время при детоксикации стафилококковых токсино-аллергенов 0,3%; 0,5%; 0,7% и 1,0 % формальдегида установлена незавершенность полноты инактивации аллергенных и токсических свойств комплекса стафилококковых токсинов. Совместимость глутарового альдегида с алкилдиметилбензиламмония хлоридом, промышленный их выпуск, экологичность и экономическая доступность определили технологическую обоснованность изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины.

Проведенные способы изготовления и применения определили технологическую схему получения стафилококковой анатоксин-вакцины представленную на рисунке 2.



Рисунок 2 - Схема изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины

Учитывая широкое распространение маститов кокковой этиологии было проведено испытание стафилококковой анатоксин-вакцины. С этой целью было отобрано 340 коров, больных катаральным и гнойно-катаральным маститом стафилококковой этиологии, которые были разделены на 2 группы по 170 животных.

В первую группу входили 170 коров, в молоке которых при бактериологическом исследовании было выделено две культуры *S. aureus*, *E. coli* и *S. epidermidis*.

Для лечения коров, больных маститом использовали стафилококковую анатоксин-вакцину, которую вводили ежедневно больным животным интрацистернально – по 5 мл в течение 2-3 дней. Через десять дней проводили исследование секретов вымени с мастидином и на бактериологическую обсемененность. После лечения коров, больных маститом САВ реакция с мастидином сохранялась у 4 животных, в секрете вымени которых обнаружено культуры *S aureus* и *E. coli*. Выздоровело 100 коров (80%).

Во вторую группу было включено 170 коров, которых лечили мастисаном в дозах согласно наставлению по его применению. Выздоровело 85 животных (50 %). Следует отметить, что мастисан в своем составе содержит антибиотики и сульфаниламиды (бензилпенициллин, стрептомицин, тетрациклин, сульфадимезин), который длительное время – до 10-15 дней выделяются с молоком.

Перед лечением из секрета вымени коров выделены культуры *S aureus*, *E. coli* и *S. epidermidis*. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Лечебная эффективность стафилококковой анатоксин-вакцины и мастисана при катаральном и субклиническом мастите у коров

Группы животных	Количество коров	Препарат	Выздоровело
1	170	Стафилококковая анатоксин-вакцина	155 коров (90%)
2	170	Мастисан-А в течение 4-5 суток	115 коров (67%)

Из данных, представленных в таблице 4 следует, что эффективность лечения коров, больных субклиническим и катаральным маститом САВ составило 90 %, а мастисаном-А – 67%, т.е. на 23 % меньше.

Результаты лечения коров, больных гнойно-катаральным маститом приведены в таблице 5.

Из данных, представленных в таблицах 4 и 5 следует, что наиболее эффективным при лечении коров, больных гнойно-катаральным маститом является стафилококковая анатоксин-вакцина. Из-за наличия в препарате 0,3 % глутарового альдегида и 0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида проявлялось биоцидное действие на микрофлору практически у всех коров, используемых в опыте.

Особую практическую ценность стафилококковая анатоксин-вакцина проявила при лечении коров, больных гнойно-катаральным маститом. Исследования проводили в молочном комплексе «Надежда» и учхозе «Знаменское».

Таблица 5 - Сводные данные лечения коров, больных гнойно-катаральным маститом

№ п/п	Кол-во коров	Вид препарата	Сроки лечения	Наличие S.aureus		Выздоровело
				до лечения	после лечения	
1	30	Стафилококковая анатоксин-вакцина	2-3 суток	S.aureus у 30 коров	Не выделены	28
2	30	Мастисан-А	4-5 суток	S.aureus у 30 коров	Выделены у 18 коров	20

В этих хозяйствах исследования коров на мастит проводят согласно ветеринарного законодательства через 1-1,5 месяцев.

Изучено, что гнойно-катаральный мастит проявляется как осложнение катарального мастита, травмированием тканей канала соска и сосковой цистерны с поражением в 2-3-х долей вымени. При этом пораженная доля вымени не уменьшается после сдаивания из-за того, что молочные ходы заполнены густым экссудатом.

В исследовании использовано 180 коров с положительной пробой с 10 % раствором мастидина по образованию слабого или плотного сгустка. В пробах молока выявлены стафилококки, стрептококки, кишечная палочка, тетракокки. Для лечения перед отелом коров, больных маститом использовали стафилококковую анатоксин-вакцину и мастисан-А. Сводные данные о мастите и секрете вымени коров, больных маститом перед отелом представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Микрофлора секрета вымени коров, больных маститом перед отелом

№ п/п	Количество коров	Состояние вымени коров	Микрофлора	
			S. aureus	E. coli
1	180	Субклинический и катаральный мастит	Выделены S. aureus у всех коров	Выделены E. coli у 40 коров
2	180	Гнойно-катаральный мастит	Выделены S. aureus у всех коров	Выделены E. coli у 15 коров

Из данных, представленных в таблице 6, следует, что секрет вымени коров перед отелом содержал S. aureus и E. coli у 360 коров, больных маститом.

После лечения коров мастисаном-А отмечено, что у 38 животных, из секрета вымени изолировано 28 культур золотистого стафилококка. Лечебная эффективность составляла – 50 %, т.е. выздоровело 90 животных, а после

интрацистернального введения в течение 2-3 суток выздоровело 150 коров (80%).

Таким образом, сравнивая лечебное действие стафилококковой анатоксин-вакцины и мастисана-А следует отметить неоспоримое преимущество при мастите стафилококковой анатоксин-вакцины превосходящей на 30 % терапевтическую эффективность мастисана, содержащего антибиотики и сульфаниламиды.

Установленная экологическая безвредность, лечебная эффективность и преимущество стафилококковой анатоксин-вакцины при лечении коров, больных маститом, целесообразно использовать испытанный препарат не только с лечебной, но и с профилактической целью.

Проблема мастита у коров связана с потерей молока, снижением его качественных показателей, состоянием здоровья новорожденных телят, т.к. молозиво является кроме основного источника питательных веществ, но еще и носителем защитных иммуноглобулинов, поступающих к новорожденному.

Изучено, что молодняк, выпаиваемый молоком от больных маститом коров, плохо развивается, заболевает диспепсией и погибает. Однако до сих пор не определена этиологическая связь между бактериальным маститом у коров и диспепсией новорожденных телят.

В связи с вышеизложенным возникла необходимость изучить этиологическую связь между маститом у коров стафилококковой этиологии и заболеваемостью диспепсией телят, полученных от этих коров.

Для исследования использовано 75 коров, которые распределены по 25 животных в каждой группе и, соответственно, количество, полученных телят. Коровы, больные субклиническим и катаральным маститом в первой группе лечили мастисаном-А, во второй группе стафилококковой анатоксин-вакциной, а третья группа 25 коров, больных маститом оставлена в качестве контроля, т.е. без лечения.

У выделенных S.aureus и E.coli выявлено антибиотикочувствительность с использованием стандартных дисков с антибиотиками. При этом установлена устойчивость к полимиксину, гентамицину, неомицину, канамицину, амоксициллину и энрофлоксацину. В связи с полученными результатами было предложено соответствующее лечение.

Результаты проведенных исследований дают основание считать, что молозиво от больных маститом коров отрицательно влияло на состояние желудочно-кишечного тракта новорожденных телят, способствовало развитию у них диарей, тогда как у коров, леченных стафилококковой анатоксин-вакциной заболеваемость молодняка не проявлялась. По-видимому, решающее значение в развитии болезни у новорожденных телят имеют низкие иммунные показатели молозива от больных маститом коров и загрязненность S. aureus и E. coli.

Заболевание характеризовалось частой дефекацией, жидким водянистым поносом, гнилостным запахом с примесью слизи. От всех заболевших телят до начала лечения были взяты пробы кала и направлены в лабораторию для бактериологического исследования. Во всех случаях были выделены патогенные S. aureus и E. coli.

Успешная детоксикация и полимеризация стафилококковых экзо- и эндотоксинов глутаровым альдегидом с алкилдиметилбензиламония

хлорида и лечебная и биоцидная эффективность стафилококковой анатоксин вакцины использовано, а для изучения биоцидной активности линкоспектина, тетрациклина, офлоксацина и получения вазелиновой мази для лечения коров, больных маститом.

3.3. Результаты повышения биоцидной эффективности тетрациклина и офлоксацина при лечении коров, больных маститом

В настоящее время антибактериальные препараты разделены на природные и полусинтетические, синтезированные бактериями, грибами, растениями и синтетические, химические. В зависимости от источника получения различают 6 видов антибиотиков. Из 10000 различных антибиотиков в гуманной и ветеринарной медицине используют 150-200 препаратов, не считая дженериков и «кормовых» антибиотиков. В целом «кормовые» антибиотики в странах ЕС запрещены, а в США и ряде других стран 80% свиней, 50% индеек, цыплят и 10 % крупного рогатого скота выращиваются с применением антибиотиков. Обычно через 1-3 года после применения нового поколения антибиотика появляются устойчивые микроорганизмы, а «кормовые» антибиотики формируют полирезистентность.

Установлено, что более 80 % бактериальной устойчивости обеспечивают ферменты, разрушающие антибиотики.

В настоящее время преодоление бактериальной резистентности проводится с помощью сочетания разных групп, создание новых более сильных препаратов с клавулановой кислотой, полученной в 1976 году из продукта метаболизма гриба *Streptomyces clavuligeris* в Словении не получило желаемого успеха.

Комплекс коммерческих химических антибиотиков из группы хинолонов, содержащие атом фтора в положении 6 цикла гетероциклической системы хинолона объединены общим названием фторхинолоны. Следует отметить, что 1 мг/л фтора способен вызвать ожоги слизистых кожи. Рекламированная зубная паста с фтором из-за противопоказаний изъята из производства, а для повышения биоцидного действия в состав фторхинолонов ввели трилон-Б, аргинин, колистин. Однако на фоне повышенной токсичности и дозы фторхинолоны не обеспечивают должного биоцидного и лечебного действия.

Впервые повышение ряда анатоксин-вакцин и антибиотиков в том числе левомецитина, метронидазола, энрофлоксацина, офлоксацина было достигнуто Ан.А. Евглевским и Д.А. Евглевским с помощью детоксикации и полимеризацией вначале 0,2-0,3 % формальдегида или 0,1-0,3 % глутарового альдегида с 0,2-0,5 % этония, а затем с 0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида. Однако канцерогенные свойства формальдегида, бета – пропилактона и дефицитность этония вызвали необходимость изыскания новых детоксикаторов и полимеризаторов бактериальных токсинов и антибиотиков.

Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение обеспечения стабильной и полной детоксикации и полимеризации стафилококковых токсинов позволили испытать способ повышения биоцидного и лечебного действия антибиотиков.

Положительные результаты биоцидного и лечебного действия стафилококковой анатоксин-вакцины с помощью глутарового альдегида и алкилдиметилбензиламмония хлорида были использованы для повышения биоцидного действия офлоксацина и тетрациклина, снижения дозы антибиотиков и изготовления мази для лечения коров, больных маститом.

Исходя из результатов исследований был определен способ получения экспериментальных тетрациклина и офлоксацина с помощью 0,1 % глутарового альдегида и алкилдиметилбензиламмония хлорида вместо дефицитного этония. Технология изготовления препаратов представлена на рисунке 3.

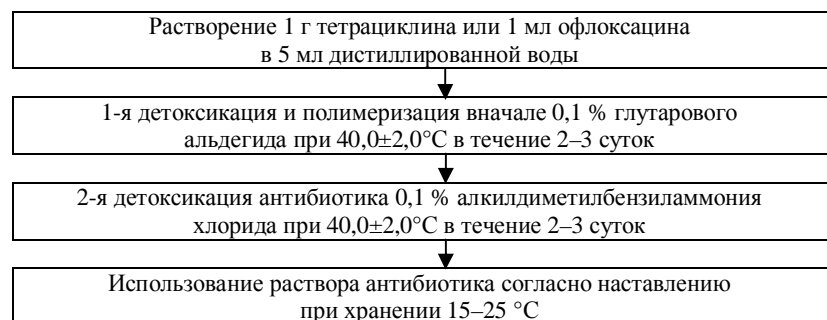


Рисунок 3 - Способ изготовления экспериментальных тетрациклина и офлоксацина

Испытание экспериментальных тетрациклина и офлоксацина на безвредность.

Изучение токсичности экспериментальных антибиотиков проводили на 16 белых мышах путем подкожного введения ежедневно по 0,1 мл в течение 3-х суток.

Результаты исследований показали, что практически белые мыши на введение экспериментальных тетрациклина или офлоксацина с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида остались живы и на месте введения не было некротических поражений. В то же время 75 % белых мышей погибло на введение контрольных тетрациклина и офлоксацина с 0,2 % формальдегида и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида.

3.4. Мониторинг чувствительности стафилококков к производственным и экспериментальным тетрациклину и офлоксацину

Определение чувствительности *S. aureus* проводили в отношении повышенной до 10000/мл микроорганизмов. Результаты изучения биоцидных свойств экспериментальных и производственных тетрациклина и офлоксацина представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Оценка биоцидного действия в мкг/мл экспериментальных и производственных тетрациклина и офлоксацина в отношении 1000/мл стафилококков

№ п/п	Наименование антибиотика	10000/мл <i>S. aureus</i> выделенных от коров, больных гнойно-катаральным маститом
1	Производственный тетрациклин	15–17 мкг/мл
2	Экспериментальный тетрациклин с 0,1 % ГА и 0,1 % АДБАХ	9–11 мкг/мл
3	Производственный офлоксацин	15–17 мкг/мл
4	Экспериментальный офлоксацин с 0,1 % ГА и 0,1 % АДБАХ	9–11 мкг/мл
5	Раствор 0,1 % ГА с 0,1 % АДБАХ	12–13 мкг/мл

где ГА – глутаровый альдегид и АДБАХ – алкилдиметилбензиламмония хлорид.

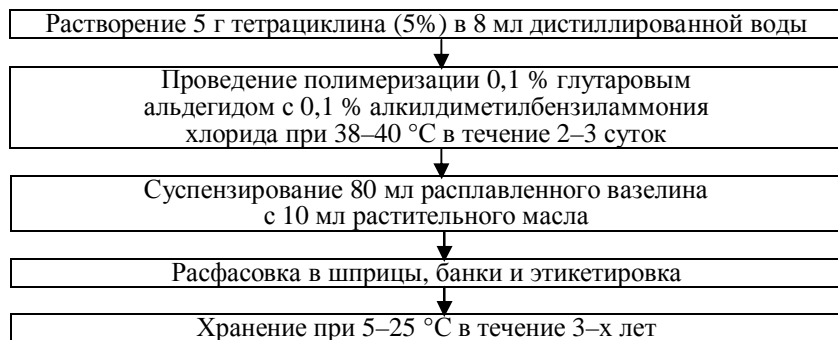


Рисунок 4 – Способ изготовления мази с тетрациклином

Из данных, представленных в таблице 7 следует, что экспериментальные тетрациклин и офлоксацин проявили бактерицидное действие на суспензию 10000 мл стафилококков в диапазоне 9-10 мкг/мл, а производственные проявили активность в пределах 5-17 мкг/мл. Установленное повышенное биоцидное действие 0,1 % ГА с 0,1 % АДБАХ на *S.aureus* явилось основанием изготовления крем-эмульсии без антибиотиков. Исходя из полученных положительных результатов по повышению биоцидных свойств экспериментальных тетрациклина и офлоксацина был определен способ получения и испытания крем-

эмульсии с тетрациклином, офлоксацином с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензил-аммония хлорида. Способы изготовления крем-эмульсии представлены на рисунке 4.

С учетом высокой биоцидной эффективности глутарового альдегида превышающая в 2-3 раза формальдегид и при биоразложении 90 % были изготовлены мази без антибиотиков. Полученные препараты были использованы для лечения коров, больных маститом.

Лечение коров, больных маститом проводили путем дву- и трехкратного интрацистернального введения коровам после доения с помощью шприца 10 мл крема-эмульсии с экспериментальными антибиотиками в каждый сосок и смазывание кожи вымени в течение 2-3 суток обеспечивало полное прекращение истечения из сосков вымени и заживления трещин на поверхности сосков и вымени. В то же время двух-трехкратное интрацистернальное введение коровам после доения с помощью шприца 5-10 мл крема-эмульсии и смазывание кожи вымени производственным офлоксацином или тетрациклином обеспечивало прекращение истечений из сосков и заживление трещин на поверхности сосков и вымени через 5-6 суток, а у отдельных коров процесс лечения протекал до 9-11 суток. Сводные данные лечения коров, больных маститом представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты лечения коров, больных маститом

№ п/п	Название препарата	Кол-во коров, больных катаральным и гнойно-катаральным маститом	Сроки лечения (сутки)	Выздоровели
1	Тетрациклиновая мазь с ГА и АДБАХ	75	2 - 3	60
2	Офлоксациновая мазь с ГА и АДБАХ	75	2 - 3	60
3	Мазь с ГА и АДБАХ без антибиотиков	75	2 - 3	55
4	Мазь с тетрациклином без ГА и АДБАХ	45	6 - 7	30

где ГА - глутаровый альдегид; АДБАХ – алкилдиметилбензиламмония хлорид.

Из представленных в таблице 8 результатов следует, что мази с экспериментальными тетрациклином и офлоксацином с 0,1% глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида и мази без антибиотиков с 0,1% глутаровым альдегидом и 0,1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида практически обладали равным терапевтическим действием при лечении коров, больных маститом. В то же время при равном терапевтическом эффекте мази при лечении коров, больных маститом, с 0,1% глутаровым альдегидом и 0,1 %

алкилдиметилбензиламмония хлорида без антибиотиков обеспечивают выпуск молока без ограничения срока.

Из результатов исследований следует, что повышение биоцидного и лечебного действия крем – эмульсии, мази с тетрациклином и офлоксацином достигнуто детоксикацией и полимеризацией 0,15±0,05 % ГА с 0,15±0,05 % АДБАХ при 38-40 °С в течение 2-3 суток с последующим внесением в 80 мл расплавленного вазелина и 10 мл растительного масла.

Полученные результаты по изготовлению и применению мази с экспериментальным тетрациклином и офлоксацином обеспечивают устранение трещин сосков, шероховатость кожи вымени и сокращение срока лечения коров, больных маститом.

В отличии от существующих линиментов (limier – втирать) мазей, крема – эмульсии предложенные препараты с усовершенствованием антибиотиками путем полимеризации 0,1 % глутаровым альдегидом и 1 % АДБАХ в 2 – 3 раза повышает лечебную эффективность.

Полученные результаты исследований позволили разработать рациональный состав жидкой и плотной синтетической питательной среды для выращивания и выделения стафилококков при получении стафилококковой анатоксин-вакцины и способ и средства выделения чистой культуры. Проведенная полимеризация стафилококковых токсино-аллергенов с помощью 0,2-0,3 % глутарового альдегида с 0,2-0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида повысило биоцидные и лечебные свойства стафилококковой анатоксин-вакцины, антибиотиков и лекарственных средств в форме мази, крем-эмульсии без антибиотиков при лечении коров, больных маститом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований сделаны следующие итоговые выводы:

1. Для выращивания стафилококков разработана синтетическая жидкая питательная среда, содержащая в 1 литре дистиллированной воды следующие солевые компоненты в граммах: лимонная кислота – 5 г; фосфорнокислый калий 2-х замещенный – 3 г; фосфорнокислый натрий 2-х замещенный – 3 г; хлористый натрий – 2 г; сернокислый цинк – 0,3 г; сернокислый магний – 1,0 г; сернокислое железо – 0,5 г; глицерин – 30 мл. Реакция среды устанавливается 5 % аммиаком до 7,4-7,5 перед автоклавированием.

2. После 11-13 суточного выращивания в 2-х литровых бутылках с объемом среды равной 1 литру, концентрация стафилококков достигает 9-11 млрд/мл.

3. Детоксикация и полимеризация комплекса стафилококковых токсинов с автоклавированными стафилококками 0,2-0,3 % глутарового альдегида с 0,2-0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида при 40°С в течение 2-3 суток обеспечивает получение стафилококковой анатоксин-вакцины, обладающей повышенным биоцидным действием к стафилококкам и эффективностью лечения коров, больных маститом.

4. Экспериментальная стафилококковая анатоксин-вакцина проявляет терапевтическую эффективность до 80 % при лечении коров больных маститом и позволяет использовать молоко без ограничений.

5. Стафилококковая анатоксин-вакцина обеспечивает выздоровление коров после 2-3 кратного введения, а при лечении коров маститом-А продолжительность лечения составила от 4 до 8 дней.

6. Полимеризация тетрациклина и офлоксацина 0,1 % глутаровым альдегидом с 0,2 % алкилдиметилбензиламмония хлорида при 40°С в течение 2-3 суток повышает биоцидные свойства в отношении 10000/мл стафилококков.

7. Мази, приготовленные с экспериментальными антибиотиками и мази с 0,1 % глутаровым альдегидом и 0,3-1 % алкилдиметилбензиламмония хлорида без антибиотиков обеспечивают сокращение на 3-5 суток сроки лечения коров, больных маститом.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Разработанную жидкую синтетическую питательную среду целесообразно использовать для выращивания стафилококков и получения стафилококковой анатоксин-вакцины, а плотную – с 2,5 % агара на основе синтетической питательной среды в разведении 1:1 или 1:2 для оперативного изучения чувствительности к антибиотикам.

2. Предложенный способ получения стафилококковой анатоксин-вакцины позволяет лечить коров, больных маститом, без антибиотиков.

3. Предлагаем использовать полученную экспериментальную стафилококковую анатоксин-вакцину и модифицированные антибиотики с помощью 0,1-0,3 % глутарового альдегида и 0,2-0,3 % алкилдиметилбензиламмония хлорида и мази без антибиотиков для лечения коров, больных маститом.

ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в российских рецензируемых научных журналах

1. Физиологические свойства стафилококков, сальмонелл и кишечной палочки, подвергнутых магнитному воздействию [Текст] / Д.А. Евглевский, С.И. Худяков, А.Г. Беляев и др. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. – № 6. – С.74-75.

2. Евглевский, Д.А. Создание биологической аллергии к стафилококковому аллергену [Текст] / Д.А. Евглевский, Б.М. Тагирмирзоев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №5. – С.74-75.

3. Евглевский, Д.А. Разработка и апробация средств и способов аллергической диагностики, специфической профилактики и терапии стафилококкозов у животных [Текст] / Д.А. Евлевский, Б.М. Тагирмирзоев //

Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №5. – С.75-76.

4. Евглевский, Д.А. Основы повышения эффективности стафилококковых биопрепаратов [Текст] / Д.А. Евглевский, А.В. Поздеев, Б.М. Тагирмирзоев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – №4. – С.60-61.

5. Биологические свойства стафилококков и повышение специфической и антибактериальной профилактики и терапии болезней животных [Текст] / Д.А. Евглевский, Н.Н. Жеребилов, Б.М. Тагирмирзоев, Е.А. Стебловский // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – №9. – С.70-71.

6. Евглевский, Ан.А. Биотехнологическое обоснование средств и способов профилактики и терапии коров, больных маститом [Текст] / Ан.А. Евглевский, Б.М. Тагирмирзоев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – №1. – С.69-70.

Статьи в научных сборниках

1. Евглевский, Д.А. Получение и применение стафилококкового аллергена [Текст] / Д.А. Евглевский, Б.М. Тагирмирзоев // Научное обеспечение агропромышленного производства (Материалы Международной научно-практической конференции, 25-27 января 2012 г., г. Курск, часть 3). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2012. – С.201-202.

2. Евглевский, Д.А. Эффективность стафилококковой анатоксин-вакцины и модифицированных полимеризацией антибиотиков при лечении коров, больных маститом [Текст] / Д.А. Евглевский, А.В. Поздеев, Б.М. Тагирмирзоев // Научное обеспечение агропромышленного производства (Материалы Международной научно-практической конференции, 25-27 января 2012 г., г. Курск, часть 3). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2012. – С.231-232.

3. Тагирмирзоев, Б.М. Совершенствование средств и способов профилактики и лечения коров, больных маститами [Текст] / Б.М. Тагирмирзоев // Актуальные проблемы агропромышленного производства (Материалы Международной научно-практической конференции, 23-25 января 2013 г., г. Курск). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2013. – С.202.

4. Тагирмирзоев, Б.М. Комплексный подход профилактики и лечения маститов у коров [Текст] / Б.М. Тагирмирзоев // Научное обеспечение агропромышленного производства (Материалы Международной научно-практической конференции, 29-31 января 2014 г., г. Курск, часть 2). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2014. – С.283.

Патент

1. Способ получения стафилококковой анатоксин-вакцины / Евглевский Ан.Ал., Евглевский Д.А., Худяков С.И., Поздеев А.В., Тагирмирзоев Б.М. // № 2468078 от 23.06.2012 г.

Формат 60x84 1/16. Бумага для множительных аппаратов.
Печать на копировальном аппарате КГСХА.
Усл. печ. л. 1,0. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № 45.