

T.E. TEREITYEVA, Junior Researcher,
T.I. GLOTOVA, Doctor of Science in Biology, Laboratory Head,
A.G. GLOTOV, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Department Head,
N.A. DONCHENKO, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Director

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Russian Academy of Agricultural Sciences
e-mail: qlotov_vet@mail.ru*

COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT METHODS FOR DIAGNOSING DISEASES IN CATTLE CAUSED BY BACTERIUM PASTEURELLA MULTOCIDA

Results are given from a comparative study on effectiveness of three methods for diagnosing cattle diseases caused by bacterium *Pasteurella multocida*, which are bacteriological and biochemical analyses as well as the PCR method. Conventional bacteriological methods and study of biochemical properties do not make possible to determine genotypes of cultures and strains. To evaluate the effectiveness of the PCR method at different stages of bacteriological diagnosis, we calculated the coefficient of coincidence, k . By bacteriological analyses of samples from sick animals on artificial nutrient media were isolated 60.4 percent of *P. multocida* cultures, by the PCR method were detected 49.2 percent of positive samples ($p > 0.005$, $k = 0.76$). From white mice were reisolated 52.3 percent of pathogenic cultures that was confirmed by reinvestigation with PCR tests ($k = 1$). All isolated bacteria cultures demonstrated biochemical properties, characteristic of *P. multocida*. As a result of typing, 41.2 percent of isolated cultures were attributed to *Pasteurella multocida*, 67.2 percent of them belonged to genotype A, and 26.8 percent genotype B. It has been found that PCR is effective at all stages of bacteriological diagnosis of diseases in cattle caused by *P. multocida* and allows us to determine genotypes of bacterium.

Keywords: cattle, respiratory diseases, pasteurellosis, polymerase chain reaction, *Pasteurella multocida*, genotype.

УДК 619-615.099.092

С.А. БОЛЯХИНА, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
Г.Ф. НАСАРТДИНОВА, научный сотрудник,
Н.А. ДОНЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, директор,
Е.А. КОРОБКОВА*, начальник отдела,
А.Н. ДЕНИСОВ*, председатель совета директоров,
Ю.А. КРУТЯКОВ**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник

*ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Россельхозакадемии,*

**Группа компаний «АгроХимПром»,*

***ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
e-mail: hohl08@rambler.ru*

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА АРГУМИСТИН

Приведены данные по токсическим свойствам ветеринарного лекарственного средства Аргумистин с массовым содержанием коллоидного серебра 10 и 50 мкг/мл, хлорида бензил-диметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония моногидрата 100 мкг/мл в лекарственной форме раствора для местного и внутреннего применения. Препарат Аргумистин относится к малоопасным химическим веществам при введении в желудок лабораторным животным со-

гласно классификации средней смертельной дозы. При длительном энтеральном введении препараты в дозах 5 мл/кг не оказывали сколько-нибудь заметного угнетающего воздействия на общее состояние белых нелинейных мышей. При внутрижелудочном введении в течение 10 дней в дозе 45 мл/кг (100-кратное превышение рекомендованной суточной терапевтической дозы) установлены статистически значимые изменения массы печени и селезенки, а также некоторых биохимических показателей крови.

Ключевые слова: острая токсичность, хроническая токсичность, Мирамистин, энтеральное введение, коллоидное серебро, Аргумистин.

Опираясь на многолетний опыт использования препаратов серебра в лечебном деле, группа сотрудников химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова разработала серию инновационных антисептических препаратов. Основное действующее вещество данных препаратов – частицы коллоидного серебра, стабилизированные различными биологически активными веществами – четвертичными аммонийными соединениями, полимерными гуанидинами и некоторыми другими [1–4]. Одним из результатов многолетних исследований физико-химических и биологических свойств препаратов на основе серебра стало создание ветеринарного лекарственного средства Аргумистин. В него в качестве действующего начала входит коллоидное серебро, модифицированное биологически активным поверхностно-активным веществом (ПАВ) хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония (мирамистин) – активным компонентом многих традиционных антисептических лекарственных средств (Мирамистин и др.) [5]. Хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония, действуя как типичное ПАВ, взаимодействует с клеточной мембраной, уменьшая ее стабильность и увеличивая проницаемость. Действительно, в экспериментах *in vitro* показано, что совместное действие коллоидного серебра и хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония приводит к синергическому увеличению их активности (2–20 раз) в отношении *Escherichia coli*, метициллин-устойчивого штамма *Staphylococcus aureus*, ванкомицин-устойчивого *Leuconostoc mesenteroides* и других [4, 5].

Основываясь на результатах антибактериальных тестов Аргумистина *in vitro*, в Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, в 2011–2013 гг. на базе нескольких ветеринарных клиник Москвы, Санкт-Петербурга и животноводческих хозяйств Алтайского края, Ленинградской, Псковской и других областей проводили широкие ветеринарные испытания препарата. Испытания показали его высокую эффективность в лечении и профилактике нагноений, случайных и хирургических ран, поверхностных и глубоких ожогов, микозов кожи и слизистых оболочек, а также широкого спектра инфекционных заболеваний домашних и сельскохозяйственных животных. Препарат Аргумистин использовали в универсальной форме в виде водного коллоидного раствора. Это выгодно отличает его от сульфадиазина серебра, получить который в устойчивой водной форме невозможно. В разведенном состоянии Аргумистин применяли перорально и местно в качестве глазных, ушных, интраназальных капель, в концентрированном виде – для обработки десен, открытых ран, инфицированных, хирургических ран в качестве антисептика. Аргумистин в концентрации 50 мкг/мл по серебру использовали внутрицистернально

при лечении острых катаральных маститов, внутриматочно – при лечении острых эндометритов.

Для дальнейшего использования лекарственного средства Аргумистин (10 и 50 мкг/мл по серебру) в ветеринарной практике, введения средства в гражданско-правовой оборот и обеспечения безопасности животных при терапии средством Аргумистин (10 и 50 мкг/мл по серебру) оно должно быть подвергнуто всестороннему токсикологическому исследованию на лабораторных животных.

Цель исследования – уточнить имеющиеся и получить новые экспериментальные данные по токсическим свойствам ветеринарного лекарственного средства Аргумистин с массовым содержанием коллоидного серебра 10 и 50 мкг/мл в лекарственной форме раствора для местного и внутреннего применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

За основу токсикологического исследования взяты «Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [6, 7].

Определение параметров острой токсичности выполняли на нелинейных самцах белых мышей массой 22–25 г. Использовали клинически здоровых животных в количестве 60 гол. (по 10 в группе) после 15-дневного карантина, во время которого провели противопаразитарные мероприятия. Мышам вводили исследуемый препарат (контрольным животным – дистиллированную воду в количестве 0,4 мл) с помощью зонда дробно. Клиническую картину «острого» отравления лабораторных животных регистрировали при введении препаратов в предельно достижимых дозах. Использовали готовую лекарственную форму опытных препаратов. Длительность наблюдения за лабораторными животными после введения препаратов составляла 14 дней, в этот период оценивали видимые признаки интоксикации. В ходе эксперимента следили за поведением, внешним видом, приростом массы мышей. По результатам экспериментов рассчитывали величину средней смертельной дозы (LD_{50}) каждого из препаратов с доверительным интервалом для уровня вероятности 0,95. В расчетах использовали метод L.C. Miller, M.L. Tainter [8].

В эксперименте по определению хронической токсичности исследуемые препараты вводили внутривенно один раз в сутки на протяжении 10 сут. В течение исследования еженедельно регистрировали интегральные показатели здоровья животных: внешнее состояние, прирост массы тела.

В конце каждой серии экспериментов брали пробы периферической крови для гематологических и биохимических исследований. Затем осуществляли эвтаназию животных, вскрывали их, взвешивали органы. Получив абсолютные показатели массы органов, определяли их весовые коэффициенты отношением массы органов к массе тела животного [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте по определению острой токсичности опытные препараты вводили внутривенно в широком диапазоне доз от 77 до 150 мл/кг для препарата Аргумистин с содержанием 10 мкг/мл коллоидного серебра и от 80 до 150 мл/кг для препарата Аргумистин с содержанием 50 мкг/мл коллоидного серебра. Ввиду того, что исследуемый препарат представлен в виде раствора с конечной концентрацией и с учетом введения ограниченного максимального объема 0,8 мл, максимально достижимая доза при однократном введении составляла 40–50 мл/кг, при дробном трехкратном – 100–150 мл/кг. Большие дозы не применяли из-за возможного длительного голодания, которое могло привести к гибели лабораторных животных.

Введение обоих препаратов в дозах до 150 мл/кг не вызывало летальных случаев. Эта доза оказалась абсолютно переносимой, поэтому LD₅₀ установить не представлялось возможным. Испытанные нами дозы значительно превосходят рекомендуемые для использования.

После введения препаратов у животных отмечены беспокойство, повышенная двигательная активность. Через 5–10 мин с момента применения препаратов состояние лабораторных животных нормализовалось. При внешнем осмотре подопытных животных и некропсии (через одни сутки и 14 дней) заметных изменений не обнаружено.

Введение высоких доз препаратов (от 80 до 150 мл/кг) вызывало снижение суточных привесов подопытных животных и массы тела на 7-е и 14-е сутки по сравнению с контрольными, но различия недостоверны.

Весовые коэффициенты органов показывают явное снижение значения общей массы и достоверное снижение массы печени в группах 6–10 ($p < 0,01$), что может отражать признаки дегенерации органа после воздействия токсической дозы препарата Аргумистин (50 мкг/мл по серебру) (табл. 1).

Таблица 1
Влияние однократного введения высоких доз препарата Аргумистин (10 и 50 мкг/мл по серебру) на весовые коэффициенты органов мышей, %

Группа	Сердце	Печень	Селезенка	Почка
Контрольная	0,39 ± 0,03	6,22 ± 0,2	0,89 ± 0,16	0,77 ± 0,02
Опытная:				
1-я	0,41 ± 0,02	5,53 ± 0,27	0,67 ± 0,13	0,84 ± 0,07
2-я	0,40 ± 0,01	5,67 ± 0,21	0,65 ± 0,09	0,81 ± 0,05
3-я	0,41 ± 0,01	5,73 ± 0,17	0,67 ± 0,09	0,79 ± 0,1
4-я	0,41 ± 0,02	5,58 ± 0,23	0,65 ± 0,11	0,82 ± 0,07
5-я	0,42 ± 0,02	5,55 ± 0,19	0,65 ± 0,09	0,84 ± 0,1
6-я	0,42 ± 0,03	4,92 ± 0,22*	0,93 ± 0,06	0,86 ± 0,03
7-я	0,41 ± 0,05	5,02 ± 0,19*	0,83 ± 0,07	0,84 ± 0,02
8-я	0,41 ± 0,03	4,91 ± 0,19*	0,89 ± 0,07	0,81 ± 0,03
9-я	0,42 ± 0,01	4,98 ± 0,23*	0,91 ± 0,06	0,86 ± 0,02
10-я	0,42 ± 0,02	4,94 ± 0,19*	0,92 ± 0,07	0,86 ± 0,03

* $p < 0,01$ в сравнении с контролем группы 1–5 – Аргумистин 10 мг/мл, группы 6–10 – Аргумистин 50 мг/мл.

Применение высоких доз Аргумистина (10 и 50 мкг/мл по серебру) не вызывало существенных отклонений в жизнедеятельности животных и не оказывало отрицательного влияния на систему кроветворения и гомеостаз. Однако оно вызывало повышение содержания аминотрансфераз в сыворотке крови подопытных животных и сдвиг в альбумин-глобулиновом соотношении в результате перерасхода альбумина как основного вещества, связывающего токсины в организме, или увеличение глобулинов вследствие воспалительных процессов. Повышенную утилизацию белка отражают и высокие значения содержания мочевины в сыворотке крови (табл. 2).

Ввиду того, что максимально введенная доза препарата Аргумистин (10 и 50 мкг/мл по серебру) 150 мл/кг в 1500 раз превосходила максимальную суточную дозу (0,1 мл/кг в сутки), то согласно ГОСТ 12.1.007–76 [5] препарат Аргумистин (10 и 50 мкг/мл по серебру) можно отнести, по крайней мере, к 4-му классу опасности (вещества малоопасные) лекарственных препаратов.

Длительное введение опытных препаратов во всех исследованных дозах не вызывало изменения интегральных показателей (прирост массы тела, потребление пищи, поведенческие реакции). Гематологические показатели во всех опытных группах лабораторных животных существенно не отличались от контрольных.

Достоверного различия данных большинства тестируемых биохимических параметров между группами, где исследовали испытуемые препараты, и контрольной не отмечено ни при использовании дозы 5 мл/кг, ни 45 мл/кг. Установлены статистически значимые различия активности обеих трансаминаз в плазме крови лабораторных животных после длительного воздействия Аргумистина в дозе 45 мл/кг (100-кратное превышение рекомендованной суточной терапевтической дозы) (табл. 3).

Аргумистин в дозе 5 мл/кг не вызывал значимых изменений весовых коэффициентов. В дозе 45 мл/кг при ежедневном введении он приводил

Таблица 2

Влияние однократного внутрижелудочного введения высоких доз препарата Аргумистин на биохимические показатели крови мышей

Показатели/группа	Аргумистин (10 мкг/мл Ag)	Аргумистин (50 мкг/мл Ag)	Контроль
АсАТ, Ед/л	346,37 ± 7,1*	361,75 ± 4,6*	319,83 ± 8,76
АлАТ, Ед/л	103,9 ± 0,55*	125,9 ± 0,53*	87,12 ± 0,94
Общий белок, г/л	54,71 ± 7,77	63,22 ± 2,68	53,75 ± 1,56
Альбумин, г/л	19,53 ± 0,88	23,83 ± 1,24	22,05 ± 0,78
Глобулины, г/л	35,48 ± 2,03*	37,9 ± 2,33*	30,45 ± 1,12
Альбумин-глобулиновое соотношение	0,56 ± 0,05*	0,66 ± 0,07*	0,72 ± 0,03
Мочевина, ммоль/л	12,05 ± 0,26*	14,62 ± 0,71*	8,3 ± 0,35
Креатинин, мкмоль/л	38,75 ± 2,33	73,42 ± 8,13	50,63 ± 5,24

* $p < 0,05$.

Таблица 3

Результаты определения биохимических параметров лабораторных животных после 10-дневного воздействия препарата Аргумистин ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Аргумистин (10 мкг/мл Ag)		Аргумистин (50 мкг/мл Ag)	
		5	45	5	45
		мл/кг			
Общий белок, г/л	53,75 $\pm$ 1,26	51,8 $\pm$ 1,7	52,0 $\pm$ 1,6	53,2 $\pm$ 1,9	51,65 $\pm$ 1,97
Альбумин, г/л	22,05 $\pm$ 0,78	27,7 $\pm$ 1,4	29,2 $\pm$ 1,1	28,7 $\pm$ 1,2	29,72 $\pm$ 1,3
Мочевина, ммоль/л	8,3 $\pm$ 0,35	8,3 $\pm$ 0,6	8,5 $\pm$ 0,5	8,6 $\pm$ 0,5	8,74 $\pm$ 0,47
Креатинин, ммоль/л	50,63 $\pm$ 5,24	67,12 $\pm$ 8,04	51,54 $\pm$ 6,45	52,42 $\pm$ 3,12	80,3 $\pm$ 18,02
АЛТ, Ед/л	38,9 $\pm$ 1,6	37,2 $\pm$ 1,4	40,4 $\pm$ 2,0	39,5 $\pm$ 1,8	9 $\pm$ 0,14*
АСТ, Ед/л	66,56 $\pm$ 11,5	64,7 $\pm$ 1,8	53,3 $\pm$ 1,7	64,1 $\pm$ 1,6	3 $\pm$ 0,52*

* $p < 0,05$.

Таблица 4

Коэффициенты массы внутренних органов лабораторных животных после многократного внутрижелудочного введения исследуемых препаратов ($M \pm m$), %

Орган	Контроль	Аргумистин (10 мкг/мл Ag)		Аргумистин (50 мкг/мл Ag)	
		5	45	5	45
		мл/кг			
Почки	0,77 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,02
Печень	6,22 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,39	5,1 $\pm$ 0,26*	5,86 $\pm$ 0,12	4,4 $\pm$ 0,09*
Сердце	0,39 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,007
Селезенка	0,89 $\pm$ 0,16	0,65 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,07*	0,55 $\pm$ 0,4	0,41 $\pm$ 0,03*

* $p < 0,05$.

к статистически значимым изменениям массы внутренних органов, уменьшению весовых коэффициентов печени и селезенки мышей (табл. 4).

ВЫВОДЫ

1. Внутрижелудочное введение препарата Аргумистин мышам в дозах от 80 до 150 мл/кг не вызывало гибели животных. На основании этого препарат Аргумистин (10 мкг/мл и 50 мкг/мл по серебру) согласно ГОСТ 12.1.007–76 [5] относится к малоопасным веществам.

2. При 10-дневном энтеральном введении препарата Аргумистин (10 и 50 мкг/мл по серебру) мышам в дозах 5 мл/кг повреждающего действия на общее состояние мышей не обнаружено.

3. При внутрижелудочном введении в течение 10 дней в дозе 45 мл/кг (100-кратное превышение рекомендованной суточной терапевтической дозы) установлены статистически значимые изменения массы печени и селезенки и изменение биохимических показателей крови подопытных животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии. – 2008. – Т. 77 (3). – С. 242–269.
2. Le A.T., Huy P.T., Huy T.Q. и др. Фотохимический синтез наночастиц серебра, обладающих высокой антибактериальной активностью // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 7-8. – С. 75–81.
3. Lansdown A.B.G., Williams A. How safe is silver in wound care? // J. Wound Care. – 2004. – Vol. 13 (4) – P. 131–136.
4. Крутяков Ю.А. Синтез, люминесцентные и антибактериальные свойства наночастиц серебра: дис. ... канд. хим. наук. – М., 2008. – 144 с.
5. Vertelov G.K., Krutyakov Yu.A., Efremenkova O.V. et al. A versatile synthesis of a highly bactericidal Myramistin stabilized silver nanoparticles // Nanotechnology. – 2008. – Vol. 19, Article ID 355707.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – С. 54–70.
7. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве // Ветеринарные препараты: справочник / сост. Л.П. Маланин, А.П. Морозов, А.С. Селиванова; под ред. А.Д. Третьякова. – М., 1988.
8. Lim R.K., Rink K.G., Glass H.G., Soaje-Echague E. A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1961. – N 130, Mar 1. – С. 336–353.
9. Рылова М.Л. Методы исследования хронического действия вредных факторов среды в эксперименте. – М.: Медицина, 1964. – 228 с.
10. ГОСТ 12.1.007–76. Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда.

Поступила в редакцию 07.05.2014

S.A. BOLYAKHINA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
G.F. NASARTDINOVA, Researcher,
N.A. DONCHENKO, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Director,
E.A. KOROBKOVA*, Department Head,
A.N. DENISOV*, Chairman of the Board of Directors,
YU.A. KRUTYAKOV**, Candidate of Science in Chemistry, Senior Researcher

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Russian Academy of Agricultural Sciences,
*Group of Companies "AgroChemProm",
**M.V. Lomonosov Moscow State University
e-mail: hohl08@rambler.ru*

ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF THE VETERINARY DRUG ARGUMISTIN

The veterinary drug Argumistin is an aqueous colloidal solution of silver nanoparticles (10 µg/ml or 50 µg/ml) stabilized with benzyldimethyl[3-(myristoylamino)propyl]ammonium chloride monohydrate (0.01%). In this work we investigated acute and chronic toxicity of Argumistin in the form of aqueous solution for topical and internal use. According to the classification LD50, the veterinary drug Argumistin is referred to low-hazard substances, when intragastrically administered to laboratory animals (mice). Long-term enteral administration in doses of 5 ml/kg did not lead to a damaging effect on the performance status of white non-linear mice. In intragastric administration for 10 days in a dose of 45 ml/kg (100-fold excess of the recommended daily therapeutic dose), statistically significant changes in the mass of the liver and spleen, as well as changes in certain biochemical indices of blood, were registered.

Keywords: Argumistin, acute toxicity, chronic toxicity, BALB/c mice, intragastric administration, colloidal silver, Myramistin.