

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина

УДК 619:616.5:591.478.6:616.9:636.2

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе и  
инновациям

№ госрегистрации

Инв. №



ФГБОУ ВО Белгородский ГАУ

А.Ф. Дорофеев

Отчет

о научно-исследовательской работе по теме:  
«РАЗРАБОТКА ИННОВАЦИОННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ  
НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МАСТИТОВ У КОРОВ»

Руководитель НИР, д-р вет. наук

А.М. Коваленко

Белгород 2019

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР  
д-р вет. наук



---

Коваленко А. М.

Исполнитель НИР:

д-р вет. наук.



---

Коваленко А. М.

## РЕФЕРАТ

Отчёт 39 страниц, 11 рисунков, 4 таблицы, использовано 60 источников литературы

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА И СЛОВСОЧЕТАНИЯ

Крупный рогатый скот, заболевания молочной железы, наноразмерные металлы, экстракты корня солодки, антисептические препараты для лечения вымени, инфекционные заболевания вымени.

**Цель работы** - разработка инновационного средства на основе наночастиц серебра для лечения маститов у коров.

### **Задачи:**

1) Изучить распространенность маститов у коров в условиях ООО «Зелёная долина»;

2) Изучить выявляемость микроорганизмов в молочной цистерне при развитии маститного процесса;

3) Разработать и апробировать средства для лечения маститов у коров.

### **Научно-практическая значимость:**

Разработано эффективное отечественное средство для лечения различных форм маститов у коров.

### **Экономическая эффективность:**

Применение данного средства позволяет повысить продуктивность молочных хозяйств и улучшить качество молока.

### **Использовали следующие методы:**

Общепринятые методики выявления микроорганизмов в сосках вымени, тест-система по выявлению соматических клеток «Мастит-тест».

Материал для исследований – коровы, больные различными формами мастита.

Исследования проводились согласно методикам:

Белкин, Б.Л. Диагностика и нетрадиционные методы лечения субклинического мастита коров /Б.Л. Белкин, Л. Черепихина, Т. Попкова, Е. Скребнёва // Главный зоотехник. - 2010 -№5 - С. 47-56.

Бойко, А.В. Маститы - комплексный подход к лечению и профилактике /А.В. Бойко, М.Н. Волкова // Ветеринария.-2003.-№11.-С.6-8.

**Были получены следующие результаты:**

Анализ данных заболеваемости клиническими формами маститов в ООО «Зелёная долина» Белгородской области показал, что за период с 2018 по 2019 годы этот показатель составил от 7% до 12%, соответственно с первой по третью лактации. А что касается субклинических форм маститов, то этот показатель имел тенденцию роста в соответствующие периоды от 19% до 27% (на 2-3%) по восходящему растут в каждой из следующих лактаций.

Выявлены лечебные свойства средства МАСТИТ-НАНО, которые колеблются в пределах от 80 до 90% в сравнении с аналогом (Аргумистином), превосходя его терапевтические свойства на 10-20%.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр
Введение.....	6
..	
1. Аналитический обзор литературы «МАСТИТЫ КОРОВ, ИХ РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ, ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗРАБОТКА ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ»	10
2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	15
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	17
Заключение.....	30
4. Публикации по результатам выполнения научно- исследовательской работы.....	31
5. Список основных работ руководителя и исполнителей по теме научного проекта за последние 5 лет	31
Список литературы .....	33
Копии статей.....	

## ВВЕДЕНИЕ

В наше время у российских производителей существуют некоторые трудности. Из-за санкций появилась необходимость в быстром получении конкурентноспособной сельскохозяйственной продукции.

Мастит – это заболевание организма в целом, а не только лишь молочной железы, следовательно, необходимо комплексное лечение, ликвидирующее воспалительный процесс в молочной железе и направленное на восстановление всего организма. [6]

Мастит у коров чаще всего приводит не только к ухудшению качества молока, но и оказывает отрицательное влияние на молочную продуктивность. Заболевание так же наносит огромный экономический ущерб производителям молочной продукции. [7, 8]

По предоставляемой Министерством сельского хозяйства России статистике, в среднем заболеваемость маститом среди коров – 20-30%, а в Северо-Западном регионе – до 50% (В.П. Иноземцев с соавт., 2000).

Традиционно рассматривают несколько видов мастита. Для каждого из них существуют свои характерные признаки. Очень часто встречается серозный мастит, реже катаральный, ещё реже фибринозный. Довольно редко можно встретить гнойный мастит. Совсем редко – инфекционный. Реже всего встречаются геморрагическая и клиническая формы проявления. Самой же частой формой мастита является субклиническая (скрытая) форма. [4, 5]

Именно субклинический мастит наносит сильнейший ущерб молочной отрасли сельского хозяйства. Такой мастит встречается в три раза чаще клинически выраженного мастита и может поражать до 60-80% поголовья. Заболевание внешне практически ничем не проявляется, протекает почти бессимптомно. Из-за этого, а также из-за отсутствия проверок поголовья на скрытый мастит, в сборное молоко попадает молоко от заражённых коров. [9,

11] При том качество молока ухудшается в два раза, когда уровень заболевания субклиническим маститом достигает 10%. [10]

В зависимости от вида мастита, его протекания и самочувствия заболевшего животного, для его лечения используют средства патогенетической, физической, этиотропной и симптоматической (при тяжёлом течении болезни) терапии. [14, 17]

Для лечения маститов у коров с помощью физиотерапевтических методов используют холод (холодные компрессы, обливание водой и так далее), тепло (чаще всего втирание камфорного масла или мазей с раздражающим действием) квантовую терапию (в т.ч. лазерное, ультрафиолетовое, тепловое облучение, лечение ультразвуком и т.д.) и массаж вымени. [21,39]

Исследовательской группой учёных фармацевтического института Санкт-Петербурга проведено множество исследований по созданию противомаститного препарата на основе экстрагированных составляющих из печени тресковых пород рыб. Одним из таковых лекарственных форм был представлен «Афлогилекс», который ранее разрабатывался для купирования воспалительных и аллергических реакций в виде 0,02% и 0,1% растворов. Активное фармвещество пептидно-фосфолипидный комплекс, свободные аминокислоты и микроэлементы, такие как натрий, калий, кальций, железо, медь и цинк, находящиеся в данной лекарственной форме играют существенную роль в регуляции обменных процессов и были довольно эффективны при лечении маститов в начальной стадии развития воспалительного процесса. [42]

При развитии мастита существует множество этиологических факторов. Но самые главные из них – несовершенное оборудование для доения, увеличивающее период закрытия сфинктеров сосков вымени, инфекции (особенно в послеродовой период), обсеменение микрофлорой молочной цистерны и паренхимы вымени через сосочковый канал (патогенной и условно-патогенной) и т.д. [51]

По данным некоторых авторов, в структуре маститов у коров 60-80% принадлежит субклиническим формам и всего лишь 20-40% к клиническим. Это связано с тем, что в животноводческих хозяйствах для выявления маститных животных используют экспресс тесты довольно редко, только лишь в случае превышения показателей концентрации соматических клеток при выходе молока из хозяйства или в случае появления значительного количества животных с клиническими формами течения маститного процесса. Таким образом, постепенно увеличивающееся количество животных с клиническими формами проявления маститов свидетельствуют о низкой эффективности лечебно-профилактических средств применяемых при лечении маститов у коров.[1,2]

Чаще всего новые методы лечения маститов у коров – использование антибиотиков, что неприменимо к лечению молочных коров, так как в их молоке будут присутствовать данные антибиотики (или их остаточные вещества). К тому же частое применение подобных средств приводит к тому, что патогенная и условно-патогенная микрофлора становится устойчивой уже к целому ряду антибиотических веществ. [24, 29]

Маститы коров поражают большую часть стада и приводят к стремительному снижению продуктивности, нанося тем самым сильнейший экономический ущерб всей молочной отрасли. И российские, и зарубежные исследователи предпринимали множество попыток высокоэффективного лечения мастита коров, но большая часть из них имеет значительные недостатки из-за использования антибиотических веществ. [37, 43]

Сведения о распространённости этого заболевания в различных хозяйствах противоречивы, а эффективность противомаститных препаратов на основе антибиотических веществ довольно спорна, в связи с тем, что остаточное количество данных детергентов остаются не только в молочной продукции, но и способствуют попаданию их к конечному потребителю (людям). При этом вызывая понижение чувствительности организма человека к данным антибиотикам, что и натолкнуло нас на исследования в



этом направлении, то есть разработке отечественного антисептического препарата на основе наночастиц серебра для лечения мастита у коров на различных стадиях.

**1.1Цель работы.**Целью работы является разработка инновационного средства на основе наночастиц серебра для лечения маститов у коров. В связи сцелью исследований, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить распространенность маститов у коров в условиях ООО «Зелёная долина»;

2.Изучить выявляемость микроорганизмов в молочной цистерне при развитии маститного процесса;

3. Разработать и апробировать средства для лечения маститов у коров.

## 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 МАСТИТЫ КОРОВ, ИХ РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ, ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗРАБОТКА ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ

Поражениям коров маститами различной формы на сегодняшний день носит повсеместный характер. Существуют данные о регистрации маститов у коров во многих странах; данные о заболеваемости сильно разнятся. В исследовании большинства исследователей отмечается, что маститы у коров как самое частое заболевание варьируют от 10 до 80 %.

Причинами возникновения маститов у коров являются условно-патогенные микроорганизмы, такие как золотистый стафилококк, различные виды стрептококков, более 100 видов колиформных бактерий и *Сl. thirobutiricum*. [1,3]

Предлагаемые и новые разрабатываемые методы и средства лечения маститов у коров содержат, в основном, антибиотические вещества, сульфаниламиды, детергенты, что недопустимо в современном молочном скотоводстве, так как их остаточные количества присутствуют в молоке коров не давая возможности изготавливать из данного молока высококачественную и биологически безопасную продукцию[2,4].

Известны случаи эффективного применения галогеносодержащих средств в силу того, что они обладают антимикробным действием, нарушая обменные процессы внутри микроорганизмов, способствуя рассасыванию продуктов воспаления. В сочетании с поливиниловым спиртом и янтарной кислотой раздражающее действие галогенов уменьшается и, проникая в более глубокие слои тканей, оказывают противовоспалительное и бактерицидное действие[5,6,7].

Значительных успехов добились исследователи из Башкирии. Ими было предложено растительное средство для лечения маститов у животных, состоящее из воднодисперстной вытяжки из корней, древесины и коры

лиственницы, которые являются источниками полифенолов, флавоноидов, лигнина, танинов, а так же кверцитина, дигидроквертицина, арабиногалактоновых кислот. Данные средства по данным исследователей показали высокую лечебную эффективность: при клинической формы мастито выздоравливало до 70% особей, а при развитии гнойнокатаральных маститов – до 85%. Авторами было сделано заключение о значительном противомикробном, противовирусном действии средств на основе растительных компонентов, которые способствовали значительному улучшению системы мероприятий и ветеринарно-санитарных подходах при профилактике и лечении различных форм маститных процессов у крупного рогатого скота. Авторы утверждали, что их средства способны эффективно воздействовать на поражённые клетки вымени, при этом проникали сквозь клеточные мембраны и обладали высокой степенью биологической активности, целевым образом воздействуя на истинную причину развития патологического процесса, а не воздействуя на симптомокомплекс. [1]

Не менее интересными являются разработки Санкт-Петербургских и сибирских исследователей серебросодержащих препаратов.

В связи с небезопасностью использования антибиотиков, развиваются безмедикаментозные методы терапии маститов, в том числе акупунктура, заключающаяся в том, что если ввести соответствующую информацию в специальные точки, то она (информация) достигнет места назначения.[2] Эффект осуществлялся путём внутрикожных инъекций настоя толокнянки посредством механического безигольногоинъектора МИ-7.[3]Другие авторы доказывали возможность успешного применения электропунктурной терапии с помощью медицинского препарата для электроаналгезии Элита 4м.[17]

Не менее успешным был опыт исследователей изучавших терапевтический эффект УВЧ излучения с помощью аппарата ЛПДА-2УВЧ. При этом было установлено, что выздоравливаемость при субклинической форме мастита с использованием данной (модели) методики составила 100%, а при катаральной – 75%.[4]

Другие авторы предложили лечение скрытых и острых серозных маститов препаратами, содержащими в своем составе нашатырный спирт и фракции лечебных трав. Методика нанесения данных композитов – трёхкратно после дойки, позволило добиться 95% эффективности при сочетанном применении с массажем вымени[9]

Некоторые ученые осуществляли электропунктурную терапию с помощью прибора ПЭРТ-5 в течение шести дней. Терапевтический эффект составил 79% [13]

Другие исследователи изучали эффективность лечения маститов низкоэнергетическим излучением с помощью лазерного аппарата «Орион-МВ». При субклинической форме мастита эффективность монолазерной терапии составила 94% [10]

Другая группа исследователей исследовали магнитноинфракрасно-лазерное излучение и его терапевтический эффект с помощью терапевтического аппарата Милта-МВ в режиме от 512 до 4096 Гц. Эффективность лечения субклинического мастита составила 88%, к тому же наблюдалось снижение уровня соматических клеток в молоке на 37%. [12]

На сегодняшний день для повышения эффективности лекарств активно применяются иммуностимуляторы, органические кислоты и другие биологически активные вещества, способные подстегнуть естественную сопротивляемость организма болезни [60]

По мнению некоторых специалистов, причина большей части заболеваний среди сельскохозяйственных животных – иммунодефицит. Совместное применение химиотерапевтических средств с иммуномодуляторами способствует сокращению сроков лечения и активизирует защитные силы организма.[7]

Применение антимикробных препаратов совместно с иммуномодуляторами необходимо для более эффективной профилактики и лечения маститов[15]

В настоящее время среди иммуномодуляторов широко известны тимоген, тималин, стимулен, эраконд. Эти препараты намного превосходят импортные средства по степени активирования иммунного ответа и другим характеристикам. Широкое распространение приобрели препараты-индукторы интерферона (интерлейкины, анадин, циклоферон и др.). Активируя интерферон, они стимулируют внутриклеточный иммунитет [16].

Высокую эффективность показало сочетание антимикробных средств с биологически активными добавками (в т.ч. витаминами, ферментами, гормонами, микроэлементами, дрожжами, пробиотиками и др.). Они способствуют стабилизации метаболизма у животных, активизируют иммунную защиту организма и, следовательно, повышают результативность противомаститной терапии [14].

Группой исследователей были предложены препараты на основе селена для иммунологического воздействия на макроорганизм. В результате проведённых исследований данных препаратов произошла нормализация общего статуса большинства иммунобиологических процессов у коров под влиянием данного микроэлемента, который в свою очередь регулирует преобладающее большинство обменных процессов, входя в состав биологически активных компонентов. Он так же способствует активации процессов потребления йода, контролируя радикальное окисление. Авторам удалось снизить таким образом на 30% заболеваемость животных маститами [14].

Необходимо констатировать факт, что рекомендации для повышения общей резистентности использования хелатных соединений металлов, участвующих в гомеостазе животных приводит к усилению транспортными белками соединений биологическими. Исследователями доказано, что хелатные соединения металлов обеспечивают высокий уровень усвояемости данных микроэлементов, что и показано на примерах йода и серебра, в следствие того, что данные металлы являются наилучшими антисептиками и к ним не вырабатывается резистентность у микроорганизмов. А если к этому факту

добавить и то, что оба они обладают высокими раздражающими свойствами, то их использование является наиболее целесообразным. Использование этих металлов в связанном органическом состоянии позволяет расширить сферу их применения в связи с поливиниловыми композитами. Применение различных форм Монклавита по процентному отношению действующего вещества показало значительные терапевтические свойства по отношению к большинству патологических процессов как в полостных органах (молочная железа, матка), так и на поверхности кожи [11].

Разработанное нами антибактериальное средство на основе нанотехнологий позволяет избежать привыкания микрофлоры к действующему веществу, а также исключить содержание антибактериальных средств в молоке, при длительном лечении различных форм мастита. [3,8]

## 2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились на базе кафедры инфекционной и инвазионной патологии ФГБОУ ВО БелГАУ им. В.Я. Горина и в ООО «Зеленая долина» Белгородской области.

Изучение распространенности маститов у коров проведены с использованием клинических методов и тест системы по выявлению соматических клеток «Мастит-тест». Клиническая оценка интенсивности поражений долей вымени маститным процессом и выявления микроорганизмов в сосках вымени проводилась с использованием общепринятых методик.

Для оценки эффективности разрабатываемого серебро содержащего средства с алкалоидами корня солодки на основе нанотехнологий «Мастит-нано» были проведены в сравнение с близким прототипом препаратом Аргумистин ООО «Нанобиотех» г.Барнаул в ООО «Зелёная долина» Белгородской области. С этой целью были отобраны по 10 голов крупного рогатого скота, больного субклиническими и клиническими формами маститов. Диагностика различных форм маститов была проведена с помощью калифорнийского мастит-теста ДеЛаваль (Франция).

Животным (n=10) первой группы с субклиническими формами мастита, где наблюдается количество соматических клеток до миллиона, а так же животным (n=10) с клиническими формами мастита, у которых наблюдали гнойные выделения из сосочкового канала, с лечебной целью вводили препарат Мастит-нано в течении семи дней (один раз в день) после вечерней дойки в дозе 10,0-15,0 мл. Животным (n=10) второй группы вводили препарат Аргумистин ООО «Нанобиотех» г.Барнаул в дозе 10,0-15,0 мл., животных (n=10) третьей группы (контрольная) не подвергали лечению. Лечебные мероприятия с животными первой и второй группы проводили в течении 7 дней.

Контроль состояния молочной железы у каждой группы проводился 3 раза с интервалом 2-3 дня.

Полученные данные в ходе исследований были подвергнуты статистической обработке с помощью программы Microsoft Excel.



### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Изучение распространённости маститов в условиях ООО «Зелёная долина»

В ООО "Зелёная долина" Белгородской области были проведены исследования по распространённости маститов крупного рогатого скота, регистрируемые в период исследований. Породный состав стада был представлен фризской породой коров. Ретроспективный анализ эпизоотологических данных за 2018-2019 годы показал, что заболевание маститами у коров больше всего проявлялось в скрытой (субклинической) форме, что было подтверждено рядом бактериологических исследований.

В хозяйстве ООО "Зелёная долина" в двухлетний период проведения эксперимента маститы проявлялись с разной степенью клинического и субклинического течения с вовлечением в патологический процесс надвыменных лимфоузлов и других тканей организма (рис.1).

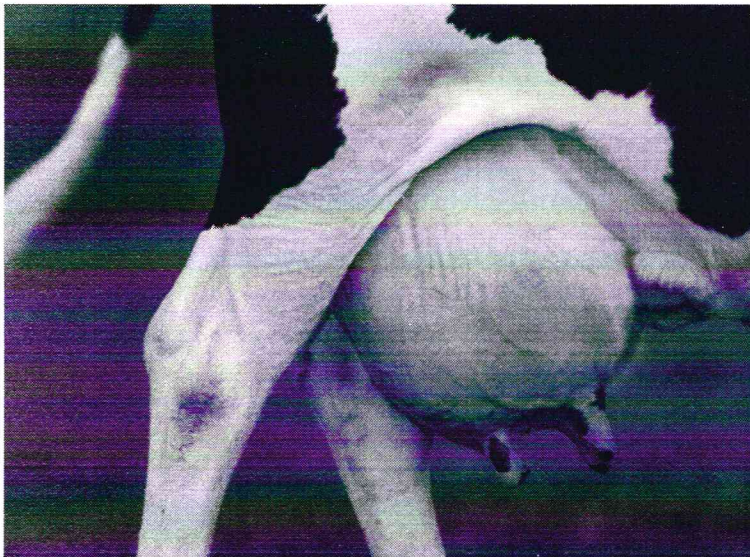


Рисунок 1. Поражение вымени у больной маститом коровы



Рисунок 2. Обильное поражение маститом задних долей вымени

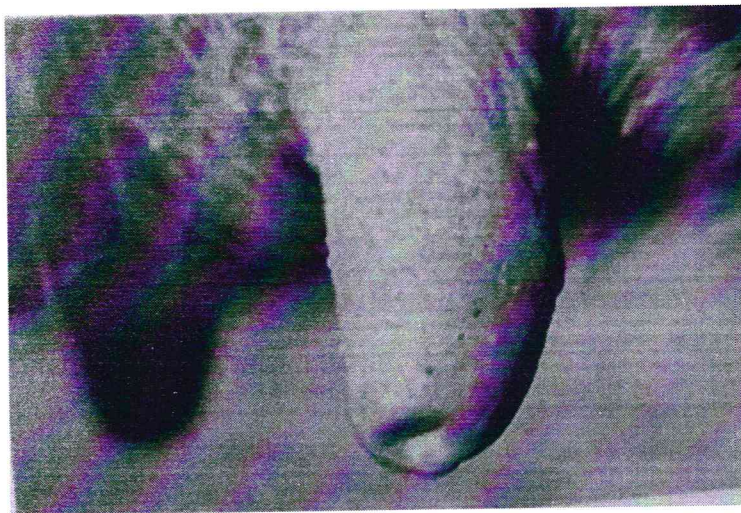


Рисунок 3. Поражение сосочкового канала (наружного клапана) вымени у коров, больных маститом

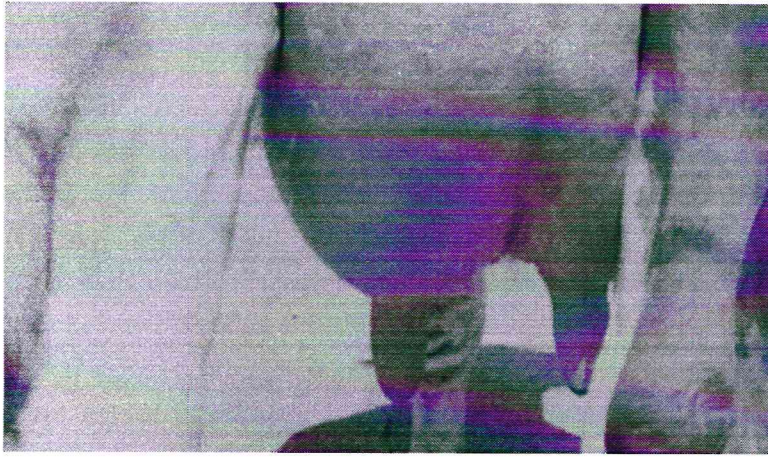


Рисунок 4. Поражение левой задней доли вымени маститом



Рисунок 5. Гнойно-некротическое поражение маститом (истечение кровяного гнойно-геморрагического экссудата)

В 2018 году заболеваемость животных субклиническими формами маститов (использовали калифорнийскую тест-систему) (Рис.6) у коров первой лактации была 228 голов, что составляет 19% от общего числа дойного стада коров, состоящего из 1201 голов. У коров второй лактации – 146 голов, что составляет 21% от дойного стада коров, состоящего из 698 голов. У коров третьей лактации – 168 голов, что составляет 24% от дойного стада коров, состоящего из 702 голов. Всего за исследуемый период по всем трем группам лактации за 2018 год среди 2601 головы выявлено 544 особи с субклинической формой мастита, что составило 21,3%.

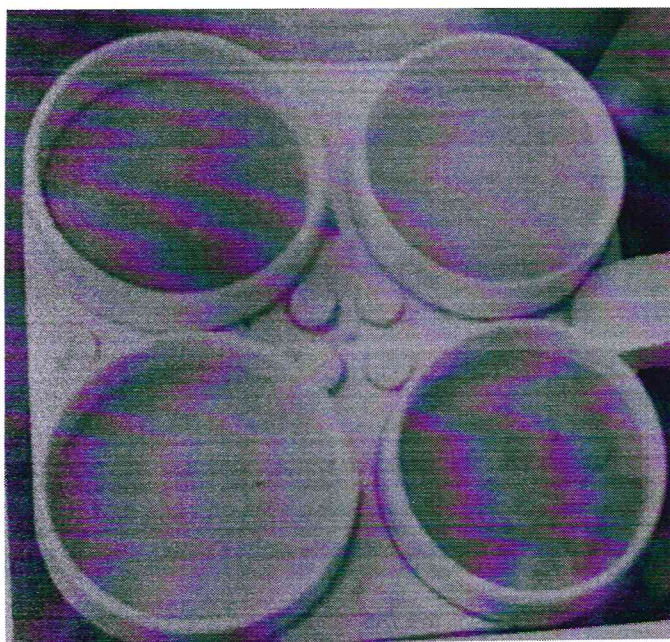


Рисунок 6. Учёт результатов содержания соматических клеток в молоке с использованием калифорнийской тест-системы

А за 2019 год заболеваемость животных субклиническими формами маститов у коров первой лактации была 424 голов, что составляет 23% от общего числа дойного стада коров, состоящего из 1843 голов. У коров второй лактации – 328 голов, что составляет 27% от дойного стада коров, состоящего из 1312 голов. У коров третьей лактации – 258 голов, что составляет 27% от дойного стада коров, состоящего из 956 голов. Всего за исследуемый период по всем трем группам лактации за 2019 год среди 4111 головы выявлено 1027 особей с субклинической формой мастита, что составило 25%. (Табл.1)

возбудителя инфекции, у больных животных способствует стационарности данной патологии. А среди животных с клиническими формами маститов рост числа больных по лактационным периодам возрастал на 1-2%.

### **3.2. Выделение микроорганизмов, участвующих в развитии маститного процесса у больных коров**

От животных с клиническими поражениями вымени, присущими маститу и имеющими более пятисот тысяч соматических клеток в молоке, отбирали по 10 проб молока от животных с видимыми поражениями вымени и без таковых (субклиническая форма мастита).

Проводили микроскопические исследования посевов из молока на стандартные питательные среды МПА, МПА с кровяным агаром, МПБ, Киттароци и Собура после появления первых колоний. Окраску мазков проводили по Грамму, Циль-Нильсону, Романовскому-Гимза, и после фиксации микроскопировали с использованием светового микроскопа Ломо (Рис.7,8).

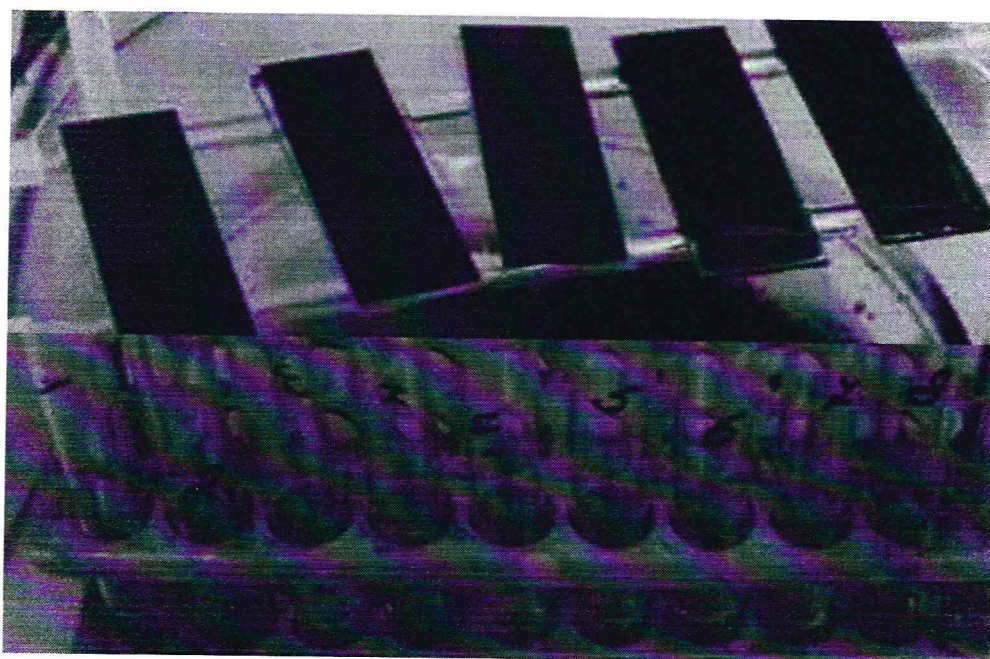


Рис. 7 Фиксация мазков по Грамму и рост культур

Рассматривали полученные мазки с помощью иммерсионного микроскопа.

Высевали пробы молока от коров на питательную среду трипсин-агар

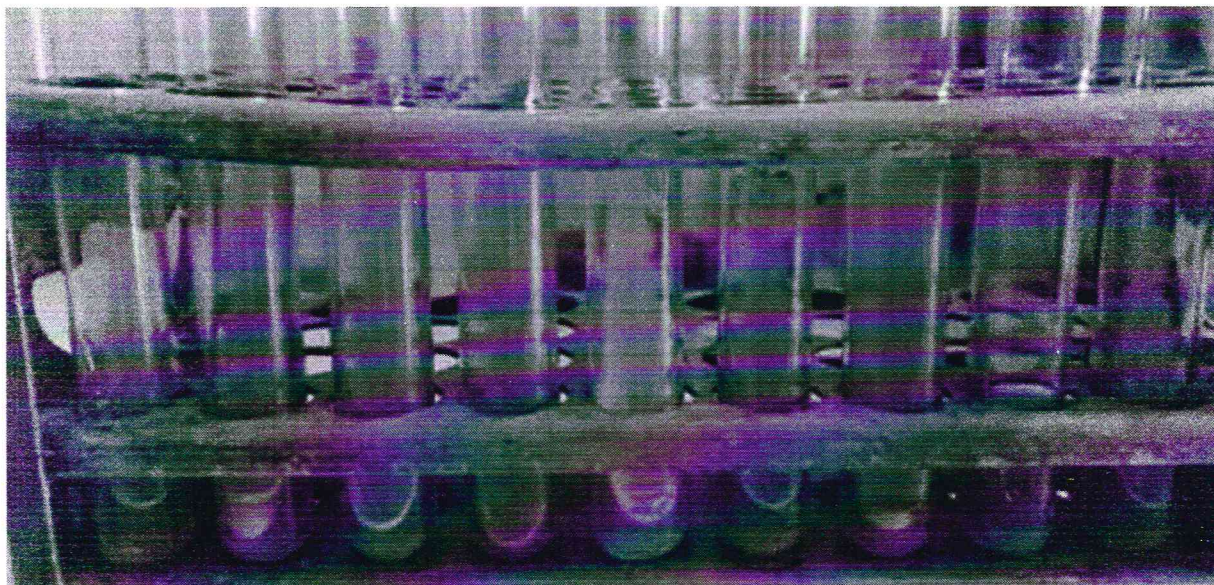


Рис.8 Рост патогенной микрофлоры на среде с трипсин-агаром

В результате проведённых исследований установлено, что на питательной среде выросли колонии гемолитических стрептококков (Рис.9), колонии *E.coli*, стафилококков и *Fusobacteriumnecrophorum*.(рис.10).

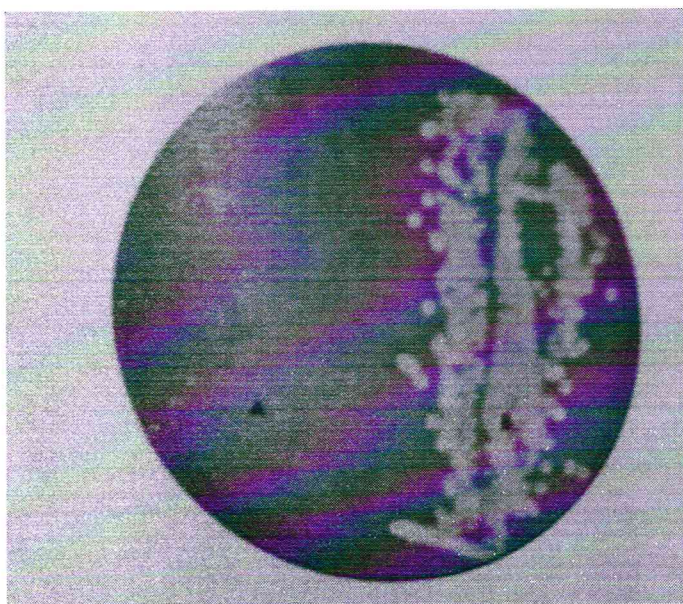


Рисунок 9. Рост колоний гемолитических стрептококков

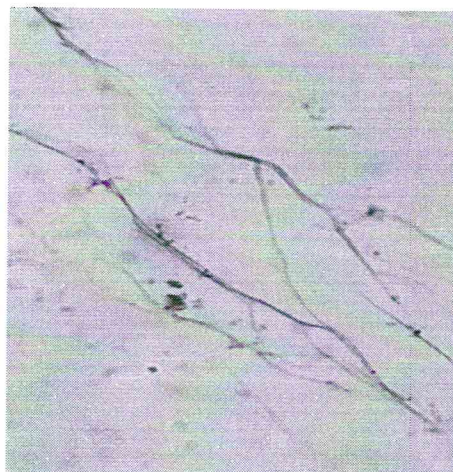


Рис. 10 Изображение возбудителей *Fusobacterium necrophorum*

Культурально-морфологические, биологические исследования выделенных культур микроорганизмов с проведением их идентификации, при этом использовали общепринятые методики согласно «Определителя зоопатогенных микроорганизмов» (Сидоров М.А. и др., 1995 г.). Проводили окраску мазков-отпечатков по Грамму.

При проведении микроскопических исследований культур микроорганизмов, выделенных из среды трипсин-агар, после окрашивания по Грамму были подтверждены данные о высокой контаминации вымени.

При изучении удельного веса по отношению к общему количеству выделенных культур вышеуказанных возбудителей после проведения культуральных исследований установлено, что в пробах молока, отобранных от животных с клиническими и субклиническими формами маститов, доля *E.coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Streptococcus*, *Staphilococcus* составляла 29%, 31%, 15% и 41% соответственно.

### 3.3. Нарботка экспериментального образца средства для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра и экстракта корня солодки

Совместно с научными сотрудниками научно-производственного предприятия ООО "М9"(г.Тольятти) был наработан экспериментальный образец средства для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра и экстракта корня солодки, состоящего из гелевой основы экстракта корня солодки,распределенных в объеме с наноразмерными частицами серебра в концентрации 0,012 мг/л, поверхность которых специально была модифицирована для обеспечения высокой эффективности при введении в полостные органы животных, в том числе и паренхиму вымени (рис. 11).





Рисунок 11. Экспериментальный образец средства для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра и экстракта корня солодки

Частицы серебра были получены в институте неорганической химии (г.Тольятти) методом гидрозолей с добавлением экстракта корня солодки с использованием лабораторного оборудования научно-исследовательского института.

Сначала были получены экстракты корня солодки, которые в дальнейшем были заключены в водные растворы со стабилизатором соли серебра. При этом использовали в технологии кварцетины с молярностью и концентрацией до  $13 \cdot 10^{-3}$  моль/литр, при этом окисленные формы кварцетинов были стабилизированы нано-частицами серебра. Конечная концентрация серебра в экстрактах корня солодки нагелевой основесоставила 12 мг/л.

#### **3.4. Апробация разработанного средства для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра и экстракта корня солодки**

Основным отличием разработанного средства для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра и экстракта корня солодки от уже существующих близких аналогов является наличие серебра в кристаллической форме на фоне экстрактов корня солодки. Эти частицы довольно небольшого размера и гигроскопичности и очень быстро проникают в глубокие слои паренхимы вымени, интенсивно передвигаясь в очаги появляющихся воспалительных участков и развития патологического процесса, воздействуя не только на патогенную микрофлору, но и способствуя регенерации тканей. Поскольку нами были изучены биологические свойства экстрактов корня солодки в отношении референтных культур *E.coli*, *Staphylococcus* и других и установлены их высокие

антибактериальные свойства (4) данный компонент в средстве МАСТИТ-НАНО для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра, оказывал наиболее существенное воздействие не только как бактерицидная составляющая, но и как репаративное средство. Это связано с тем, что глицирритовые кислоты и их производные, флавоноидные соединения и высокомолекулярные соединения (полисахариды, пектины) корня солодки обладают минералокортикоидными, противовоспалительными, антимикробными, противоопухолевыми, антиоксидантными свойствами.

В результате проведенных испытаний средства МАСТИТ-НАНО для лечения маститов у коров на основе наночастиц серебра и корня солодки нами были изучены изменения состояния маститного процесса у коров, подвергавшихся лечению разработанным средством в сравнении с животными, не получающими никакого лечения (чистый контроль) и группой, животных которую лечили препаратом Аргумистин ООО «Нанобиотех» г.Барнаул. Оба препарата вводили в течение семи дней в дозе 10,0-15,0 мл.

Табл. 3 Динамика выздоравливаемости коров с субклинической формой маститов после применения средства МАСТИТ-НАНО

	До лечения, n	на 3 день, n/%	на 7 день, n/%
1	2	3	4
Чистый контроль	10	10/0%	10/0%
Контрольная(Аргумистин)	10	5/50%	7/70%
Опытная группа	10	8/80%	9/90%

Табл. 4 Динамика выздоравливаемости коров с клинической формой маститов после применения средства МАСТИТ-НАНО

	До лечения, n	на 3 день, n/%	на 7 день, n/%
1	2	3	4
Чистый контроль	10	10/0%	10/0%
Контрольная(Аргумистин)	10	4/40%	6/60%
Опытная группа	10	5/50%	8/80%

Установлено, что при лечении животных препаратом МАСТИТ-НАНО в сравнении с Аргумистином у животных с субклинической стадией развития маститного процесса на третий день лечения выздоровело соответственно 8 и 5 голов, что составило 80% и 50%. А уже на седьмой день лечения выздоровело 9 и 7 голов, что составило 90% и 70% больных животных.

Что касается клинически больных маститом животных, то эти показатели на третий день составили 50% и 40% и 80% и 60% соответственно.

У животных контрольных групп самовыздоровление не наступило.

Таким образом, установлены лечебные свойства средства МАСТИТ-НАНО, которые колеблются в пределах от 80 до 90% в сравнении с аналогом (Аргумистином), превосходя его терапевтические свойства на 10-20%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ данных заболеваемости клиническими формами маститов в ООО «Зелёная долина» Белгородской области показал, что за период с 2018 по 2019 годы этот показатель составил от 7% до 12%, соответственно с первой по третью лактации. А что касается субклинических форм маститов, то этот показатель имел тенденцию роста в соответствующие периоды от 19% до 27% (на 2-3%) по восходящей растут в каждой из следующих лактаций.

2. Выявлены лечебные свойства средства МАСТИТ-НАНО, которые колеблются в пределах от 80 до 90% в сравнении с аналогом (Аргумистином), превосходя его терапевтические свойства на 10-20%.

## Публикации по результатам выполнения научно-исследовательской работы

1. Boyko N., Tkachev A., Kovalenko A., Pisarev D., Kuznietsova V., Sushchuk N., Bondarev A. Phytochemical, microbiological, and technological studies in the field of obtaining a hydroalcoholic extract with antimicrobial activity from the liquorice root // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. - 2019. - Vol. 12. - Issue 1. - 403-407. (Scopus)
2. Kovalenko A., Belyakova N., Bodrova Y Development of drugs for treatment of Mortellaro's disease in cattle // Atlantis press Advances in Biological Sciences Research.- 2019.- Vol. 7. – P. 26 -32. (Web of Science)

### Список основных работ руководителя и исполнителей по теме научного проекта за последние 5 лет

1. А.М. Коваленко, И.Л. Левицкая, Р.А. Мерзленко, В.В. Дронов Изучение этиологической структуры бактериозов развивающихся в дистальном отделе конечностей и при маститах у крупного рогатого скота // Вестник КГСХА.–Курск, 2015.- №3. – С. 70-71.
2. А.М. Коваленко, И.Л. Левицкая, Р.А. Мерзленко, В.В. Дронов Сравнительная эффективность препаратов для лечения коров больных инфекционными заболеваниями молочной железы и дистального отдела конечностей// Вестник КГСХА.–Курск, 2015.- №3. – С. 71-73.
3. Явников Н.В., Коваленко А.М., Анисько Р.В., Кузьмин В.А., Цыганов А.В., Пономаренко Н.П. Апробация препарата на основе наночастиц коров в условиях молочного комплекса // Иппология и ветеринария – Санкт-Петербург, 2018. - №1(27). – С. 93-98.

4. Boyko N., Tkachev A., Kovalenko A., Pisarev D., Kuznietsova V., Sushchuk N., Bondarev A. Phytochemical, microbiological, and technological studies in the field of obtaining a hydroalcoholic extract with antimicrobial activity from the liquorice root // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. - 2019. - Vol. 12. - Issue 1. - 403-407. (Scopus)
5. Kovalenko A., Belyakova N., Bodrova Y Development of drugs for treatment of Mortellaro's disease in cattle // Atlantis press Advances in Biological Sciences Research.- 2019.- Vol. 7. – P. 26 -32. (Web of Science)

#### **Патенты**

6.Коваленко А.М., Акопджанян Н.П., Лыга И.И., Гриб А.П Способ профилактики и лечения инфекционных заболеваний птиц// Патент № 2571689 Приоритет 30.03.2015. Регистрация в Госреестре изобретений 10.07.2015. Бюл. №.12

7. Коваленко А.М., Явников Н.В., Белякова Н.А., Дорофеев А.Ф. Препарат для лечения и профилактики заболеваний кожи и кожных покровов инфекционной этиологии крупного и мелкого рогатого скота, свиней на основе хелатов меди // Патент № 2706694 Приоритет 31.03.2019. Регистрация в Госреестре изобретений 20.11.2019. Бюл. №.32

## Список литературы

1. Аминова А. Л., Рамеев Т. В., Юмагузин И. Ф., Солодовник Е. С., Колесник А. Б. Применение растительных препаратов при лечении клинического мастита у лактирующих коров // Ветеринария.-М.-2019, №2.- С.45-47
2. Аверкиев, А.А. Использование лазерного излучения терапии мастита / Аверкиев А.А., Баловнева Е.Г // материалы международной научной конференции, посвященной 125-летию академии: Тезисы докладов КГАВМ, 1998.-С.8.
3. Андреева, Н.Л. Иммуностимуляторы в ветеринарии / Н.Л. Андреева, В.Д. Войтенко // Матер. XVIII междунар. науч-практ. конф. «Новые фармакологические средства в ветеринарии». – СПб, 2006. – С.87 - 88.
4. Балковой, И.И. Биологические принципы лечения электромагнитным полем УВЧ коров при мастите /И.И. Балковой, В.П. Иноземцев, А.Г. Самоделкин // Ветеринария, 1993.-№6.-С40-43.
- 5.Белкин, Б.Л. Диагностика и нетрадиционные методы лечения субклинического мастита коров /Б.Л. Белкин, Л. Черепяхина, Т. Попкова, Е. Скребнёва // Главный зоотехник. - 2010 -№5 - С. 47-56.
6. Бойко, А.В. Маститы - комплексный подход к лечению и профилактике /А.В. Бойко, М.Н. Волкова // Ветеринария.-2003.-№11.-С.6-8.
7. Войтенко, Л.Г. Нетрадиционная терапия коров при мастите /Л. Г. Войтенко [и др.] // Ветеринарная патология. – 2013. - №1. – С. 8-11. 43. Выступление Путина В.В. На пленарном заседании 18-го Петербургского международного экономического форума «Укрепление доверия в эпоху преобразований» URL,: <http://www.kremlin.ru/news/21080>
8. Гавриш, В.Г. Настой листа толокнянки в терапии мастита у коров / В.Г. Гавриш // Эколог. Аспекты производства и переработки с./х. сырья при

создании продуктов питания 21 века : матер, межвед. науч.-практ. конф.- Волгоград.-2000.-С.284-286.

9. Дерябин, А.М. Новое в лечении животных / А.М. Дерябин, Б.В. Уша, А.Г. Одинец, П.П. Золин // Молочное и мясное скотоводство. – 1991. - №6. С. 23-24. 108

10. Казеев, Г.В. Лазеротерапия и лазеропунктура при акушерско - гинекологических заболеваниях коров / Г.В. Казеев, И.И. Балковой, В.Н. Миронов [и др.] // Ветеринария.-2002.-№2.-С.34-36.

11. Карпенко, Л.Ю. Минеральный состав крови коров в разные сезоны года и под влиянием минерально-кормовой добавки «Хелавит» / Л.Ю. Карпенко, А.А. Карпенко, А.И. Енукашвили, В.Б. Галецкий // Вопросы нормативно - правового регулирования в ветеринарии. – 2012. -№2. – С. 76-80.

12. Ливерко, Н.В. Клиническая оценка методов квантовой терапии при заболеваниях молочной железы /Ливерко Н.В., Калюжный И.И., Авдеенко В.С. // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Материалы междунар. науч.-практ. конф.- Ульяновск.-2003.-С.33-35.

13. Парахин, А.В. Субклинический мастит коров в хозяйствах Орловской области и эффективность электропунктурной терапии / А.В. Парахин, Ю.В. Корягина // Актуальные проблемы болезней органов размножения и молочной железы у животных: материалы международрн. научно-практич. конф. – Воронеж, 2005. – С. 285-287.

14. Париков, В. А. разработка и совершенствование методов диагностики, терапии и профилактики мастита у коров /В.А. Париков // дисс. в форме науч. доклада на доктора вет. наук.- Воронеж,- 1990.-52с.

15. Слободяник, В.И. Иммунологические аспекты решения проблемы мастита у коров /В.И. Слободяник // Ветеринария с-х животных. – 2010г. - №10.- С. 20-28.

16. Смирнов, В.С. Тимоген в животноводстве и ветеринарии/ В.С. Смирнов. – СПб., 2005. – 37 с.



17. Чучин, В.Н. Чжень-Цзю терапия больных серозным маститом коров / В.Н. Чучин // Материалы науч.-практич. конференции ИВМиБ.-Саратов.-2002.-С.58- 60.

18. Алиев, А.Ю. Микрофлора вымени при субклиническом мастите у коров и её чувствительность к антибиотикам / А.Ю. Алиев // Ветеринарный врач. – 2012. - №2. – С. -45-47

19. Андреев, Г.М. Некротический мастит у коров /Г.М. Андреев // Практик.- 2003.-№4.-С.26- 29.

20. Андреева Н.Л. Ветеринарная гомеопатия – новое направление в лекарственной ветеринарии / Н.Л. Андреева, Т.В. Новосадюк // Современные вопросы ветеринарной гомеопатии: материалы третьей международной конференции. – Санкт Петербург. – 2005. – С6

21. Андреева, Н.Л. Биологическая оценка стимуляторов продуктивности / Н.Л. Андреева // Новые фармакологические средства в ветеринарии: тез. докл. 1- й межгосуд. Межвуз. научно-практической конф. – СПб, 1989. – С.79.

22. Андреева, Н.Л. Биологически активные вещества / Н.Л. Андреева // Матер. 11-ой межгосуд. Межвуз. научно-практической конф. «Новые фармакологические средства в ветеринарии». – СПб, 1999. – С. 56 - 57.

23. Андреева, Н.Л. К вопросу о терминологии использования биологически активных веществ в ветеринарии / Н.Л. Андреева, В.Д. Соколов // Международный вестник ветеринарии. – 2010. – №4. –С.25 - 30.

24. Андреева, Н.Л. Новые биологически активные вещества // Н.Л. Андреева, В.Д. Соколов // Экспресс-информация «Новые фармакологические средства и кормовые добавки». – СПб, 2010. – №20. – С. 3- 4. 103

25. Архипов, А.А. Препараты для профилактики и лечения животных при маститах /А.А. Архипов // Ветеринария. – 2011. №9.- С. 13-15.

26. Балковой, И.И. Влияние лазерного излучения на время проявления иммунного ответа в организме коров при заболевании маститом / Балковой И.И., Иноземцев В.П., Нежданов А.Г // теоретич. и практ. аспекты возник, и

развития болезней животных и защиты здоровья в современных условиях : матер, международ, конф,- Воронеж, 2000.-Т.1- С.137-139.

27. Барабаш, В.В. Влияние акупунктурной коррекции на продуктивность коров /В.В. Барбаш, Л.Т. Тихонова, С.А. Ткаченко // Молочное и мясное скотоводство.- 2003.-№7.-С.37-39.

28. Барышев, В.А. Аспекты решения проблемы антибиотикотерапии в ветеринарной практике / В.А. Барышев, О.С. Глушкова, А.М. Лунегов // Международный вестник ветеринарии. – 2016. - №1. – С. – 23-28.

29. Барышев, В.А. Влияние Мастифита на биохимические показатели молока лактирующих коров / В.А. Барышев // Международный вестник ветеринарии. -2017 - №1. – С. – 18-21.

30. Барышев, В.А. Изучение острой токсичности препаратов «Мастифит» и «Мастинол» / В.А. Барышев // Материалы 4 Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов 2016. – С. – 15-17.

31. Барышев, В.А. Изучение положительных свойств новых лекарственных препаратов / В.А. Барышев, О.С. Глушкова // Международный вестник ветеринарии. – 2016. - №4. – С. 50-54.

32. Барышев, В.А. Применение препаратов «Мастинол» и «Мастисан А» для профилактики субклинического мастита коров в сухостойный период /В.А. Барышев // Материалы 3 международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные 104 средства в ветеринарии». – СПб., Издательство ФГБОУ «СПбГАВМ», 2014 г. –321 с. – С. 40 – 41.

33. Барышев, В.А. Современный подход преодоления антибиотикорезистентности /В.А. Барышев, О.С. Глушкова, А.М. Лунегов // Аграрная наука – сельскому хозяйству XII Международная научнопрактическая конференция Сборник статей Книга 3. - Барнаул. – 2017. – С.

34. Барышев, В.А. Сравнительная оценка лечебной эффективности препаратов «Мастисан А» и «Мастифит» при субклиническом мастите коров

/ В.А. Барышев // Международный вестник ветеринарии. – 2016. - № 2. – С. - 34- 38.

35. Барышев, В.А. Сравнительная оценка терапевтической эффективности препаратов мастифит и мастинол при субклиническом мастите лактирующих коров / В.А. Барышев // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2016. - №3. – С. 139-142.

36. Батраков, А.А. Профилактика болезней вымени у коров и повышение качества молока с применением новых отечественных препаратов / А.А. Батраков, С.В. Васильева, А.Р. Костяков // Ветеринария. – 2014. - №3. – С.40-41.

37. Баязидова, К. Факторы влияющие на заболеваемость коров маститом / К. Баязидова, Т. Баязидов, Б. Кутаева // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2010. - № 10. – С. 11-12.

38. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький // Л., 1968. – С. 168.

39. Белкин, Б.Л. Использование показателей теплового потока для диагностики дисфункции молочной железы / Белкин Б.Л., Скребнева Е.Н. // Научные проблемы производства продукции животноводства и улучшение ее качества: мат. междунар. науч.-практ. конф. - Брянск.- 2004.-С.354-356. 105

40. Белозерцева, Н.С. Совершенствование ранней диагностики субклинического мастита у коров / Н.С. Белозерцева, С.В. Федотов, Г.М. Удалов // Ветеринария. – 2013. №5. – С.37-40.

41. Блохин, А.А. Препараты «Иммомаст-А» и «Иммомаст-В» в лечении мастита лактирующих коров / А.А. Блохин, В.В. Исаев, Н.А. Гладкова // Международный вестник ветеринарии. – 2015. - №4. – С. 10-15.

42. Бочкарев, В.Н. Влияние комплексного гомеопатического препарата лиарсин на некоторые показатели крови у коров в сухостойный период в условиях УХ «Костромское» /В.Н. Бочкарев, Н.А. Федотова //Новые фармакологические средства в ветеринарии мат. междунар. науч.-практ. конф. – Санкт Петербург, 2005, - С.130.

43. Брылин, А.П. Противомаститные препараты /А.П. Брылин // Ветеринария. – 2001. – №4. – С. 16-17.
44. Булашёва, А. Эффективность применения тканевого препарата вымени при лечении субклинической формы мастита коров / А. Булашёва, А. Хаймулдинова, Г. Есжанов // Молочное и мясное скотоводство. – 2013. - №1. – С. 25-27.
45. Бунер, С.Х. Целебные травы. Лечение без антибиотиков / С.Х. Бунер; пер. с нем. Н. Левиной. // - М: Мой мир, 2007. -160с.
46. Варганов, А.И. Сравнительная эффективность препарата пеносепт при лечении мастита у коров / Варганов А.И., Журавлев Д.М., Макаров А.В.// междунар. науч.- произв. конф. по акушерству, гинекологии и биотехнике репродукции животных: Тез.док.СГАВМ.-С.-Пб.-2000.-С.35- 36.
47. Васильев, В.В. Профилактика мастита у коров /В.В. Васильев // Ветеринария .-2004.- №11.-С.37-39.
48. Васильев, В.Г. Терапия коров больных маститом в сухостойный период / В.Г. Васильев //Ветеринария.- 1998 №1.- С.38-40. 106
49. Васильев, В.Г. Факторы, обуславливающие возникновение мастита у коров / В.Г. Васильев // Ветеринария .- 1996. №6.- С.37-38.
50. Вафина, Л.Ф. Результаты изучения распространения маститов коров и состояния их организма в условиях пригородной зоны /Л.Ф. Вафина, К.А. Сидорова // Развитие научной, творческой и инновационной деятельности молодежи –2015. –с. 131 –133.
51. Веселова, Т.В. Математическая модель процесса ускоренного старения семян / Т.В. Веселова, В.А. Веселовский, А.Г. Колупева // Биофизика. 1999.- Вып.3. – Т.44. –С. 510-517.
52. Ветеринарное законодательство. -М.: Колос, 1972.-Т.2.-С.91-112.
53. Виноходова, М.В. Мониторинг маститов у коров в хозяйствах ленинградской области / М.В. Виноходова, С.О. Таминова, Е.М. Смирнова // Международный вестник ветеринарии. – 2011. - №3. С.31-32.

54. Выступление Путина В.В. На пленарном заседании 18-го Петербургского международного экономического форума «Укрепление доверия в эпоху преобразований» URL,; <http://www.kremlin.ru/news/21080>

55. Выступление Путина В.В. на расширенном заседании правления ТорговоПромышленной палаты Р.Ф 27.05.2009г. URL: <http://www.audit-it.ru/news/others/189260.html>.

56. Гавриш, В.Г. Септогель для лечения коров при мастите / В.Г. Гавриш, А.В. Егунова [и др.] // Ветеринария.- 2000.-№6.-С.33.

57. Гамаюнов, В.М. Эффективность Ваккамаста при мастите у лактирующих коров / В.М. Гамаюнов, А.Х. Фмиров // Ветеринария. – 2016. - №5. – С. 32- 34. 107

58. Гершанович, М.Я. Воспроизведение заболеваний животных для экспериментальных терапевтических исследований / М.Я. Гершанович // Л., 1954. – 40.с.

59. Головин, И.А. Показатели естественной резистентности коров после применения эмульсии для сосков вымени / И.А. Головин, Э.К. Рахматуллин // Матер. Междун. научно-практич. Конф. «Биотехнология: токсикологическая, радиационная и биологическая безопасность». Казань. - 2010. – С. 536-538.

60. Белобородов, В.Б. Проблемы антибактериальной терапии хирургических инфекций, вызванных резистентной грамположительной флорой / В.Б. Белобородов // Антибиотики и антибактериальная терапия. — 2002. -№ 12.-С. 25-36.

## PHYTOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL, AND TECHNOLOGICAL STUDIES IN THE FIELD OF OBTAINING A HYDROALCOHOLIC EXTRACT WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM THE LIQUORICE ROOT

NIKOLAY BOYKO<sup>1\*</sup>, ALEXANDR TKACHEV<sup>2</sup>, ANATOLIY KOVALENKO<sup>2</sup>, DMITRIY PISAREV<sup>1</sup>,  
 VICTORIA KUZNIETSOVA<sup>3</sup>, NATALIA SUSHCHUK<sup>4</sup>, ALEXANDR BONDAREV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Technology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia. <sup>2</sup>Department of Belgorod State Agricultural University Named After V. Gorin, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Belgorod, Russia.

<sup>3</sup>Department of Chemistry of Natural Compounds, National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine. <sup>4</sup>Department of Technology of Drugs, Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine. Email: boykoniknik@gmail.com

Received: 27 October 2018, Revised and Accepted: 30 November 2018

### ABSTRACT

**Objective:** The objective of this work was to carry out studies in the field of development of a hydroalcoholic extract from the liquorice root that has a high level of antimicrobial activity.

**Methods:** For the antibacterial study of extracts, we have used the agar well diffusion method. In our research, we have utilized six test-strain microorganisms: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Authors have applied vector theory for antimicrobial activity comparison of liquorice root extracts.

**Results:** Phytochemical composition and antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from the liquorice root with the use of different concentrations of ethanol have been studied. The optimal range of ethanol concentration of 65±15% v/v has been found. The dependency between the integral index of antimicrobial activity of the extract and concentration of glycyram and licuroside has been found. The minimal concentration of glycyram and licuroside in the extract has been calculated for an exhibition of the target level of extract's antimicrobial activity, which is 1.0 and 0.11% w/v, respectively.

**Conclusion:** It has been found that the concentration of licuroside has greater influence on the integral index of extract's antimicrobial activity in comparison with that one of glycyram. A highly effective technology for obtaining an extract with target phytochemical parameters has been suggested.

**Keywords:** Liquorice root, Antimicrobial activity, Extracts, Glycyram, Licuroside, Correlation.

© 2019 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i1.30454>

### INTRODUCTION

Development and practical application of antimicrobial drugs for local wound treatment for infectious injuries of skin and mucous membrane for human/animals is a rather urgent issue [1].

It is not uncommon that for successful treatment we need drugs with several simultaneous pharmacological effects, which is impossible at present state of science and technology relating to one agent and, therefore, we need to add additional active agents with other pharmacological effects into the drug formulation.

A good alternative to mono- or combination therapy for local treatment of infectious injuries of skin and mucous membrane is to use plant extracts that may be used for development of different drug dosage forms (tablets, ointments, aerosols, solutions, sprays, etc.).

These drugs have polyfunctional properties as a result of different constituents present in their composition that has different biological effects. Many of them are accepted by the official medicine and described in National Pharmacopoeias of different countries as plant raw materials, tinctures, and extracts. However, these dosage forms still have some unsolved problems.

Despite a long-time use of tinctures and extracts in many countries, scientific grounding for choice of extractant type is still an unsolved issue in medicine and pharmacy.

The liquorice root has a long tradition of medicinal use for the treatment of different types of diseases [2,3]. Biologically active substances from the liquorice root exhibit the following effects: Antioxidant, expectorative, anti-inflammatory, anti-allergic, healing, spasmolytic, antiviral, antibacterial, and antiproliferative, etc., [4-8]. The dominant biologically active substances from *Glycyrrhiza radix* are glycyrrhizic acid (triterpene saponosides), chalcones (licurosid), and flavonoids (liquiritin, and liquiritigenin) [9-12]. Therefore, the development of drugs from the liquorice root with antimicrobial activity for local used is an actual task.

The aim of this work was to carry out complex studies in the field of obtaining of a hydroalcoholic extract with antimicrobial activity from liquorice root for local use both, in medical and veterinary practice.

### METHODS

#### Plant material

For studies, we used *Glycyrrhiza radices* (liquorice roots) by "Krasnogorskdeksredstva" company, Krasnogorsk, the Russian Federation, serial No 30417, best before 05/2018. For extraction, we used plant raw material with particle size of 0.1–0.5 mm.

#### Solvents and standards

As an extractant, we used water solutions of ethanol (22, 41, 50, 71, 82, 96±1% v/v). Ethanol was of pharmaceutical grade (Russia).

Qualitative and quantitative analyses of biologically active compounds were carried out with reference substances of licuroside and monoammonium glycyrrhizinate (glycyram) (the State Pharmacopoeia of Ukraine) and according to UV-spectra and retention times of these compounds in the high performance liquid chromatography (HPLC) profile.

#### Preparation of extracts

Extracts for analysis were obtained as follows: Transfer 4 g of the grinded plant raw material (accurately weighed) into a flask, add 20.0 ml of the solvent (accurately weighed) and macerate for 24 h at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Then, the extract was decanted and centrifuged at 3000 rpm for 30 min; it was used for antimicrobial activity studies and analyzed by a reversed-phase HPLC.

#### HPLC analysis

The chromatographic studies were carried out with a chromatograph of Agilent 1200 infinity series by Agilent Technologies, the USA. The chromatographic process was carried out under the following conditions: Mobile phase (A): 1% water solution of formic acid, second mobile phase (B): 96% v/v ethanol in linear gradient elution regime; chromatographic column: Supelco ascentis express  $C_{18}$  100 mm  $\times$  4.6 mm with particle size 2.7  $\mu\text{m}$ ; mobile phase velocity: 0.5 ml/min; temperature of the chromatographic column:  $+35^\circ\text{C}$ ; and sample volume: 1  $\mu\text{l}$  [13].

#### Suitability and validation parameters of the chromatographic method

The main parameters of the validation method of analysis and suitability of HPLC system for determination of licuroside and glycyram are presented in Table 1.

#### Method of dry residue determination

Dry residue in the extract was determined by a gravimetric method in accordance with general pharmacopoeia monograph extracts GPhA.1.4.1.0021.15 of the Russian State Pharmacopoeia [15].

#### Antimicrobial assay

For antimicrobial activity study, we used an agar well diffusion method. For the study, we used six test-strain microorganisms: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

The microbial burden was  $10^7$  CFU/ml for upper-layer of the medium. The volume of test extracts was  $0.275 \pm 0.025$  ml. The diameter of wells was 10 mm, and the total width of agar layers was  $4.0 \pm 0.5$  mm. Mueller-Hinton agar was used for bacteria. Sabouraud agar was used for *C. albicans*. Determination of the antimicrobial activity of extracts was carried out on two layers of solid medium in Petri dishes. 0.05%

water solution of chlorhexidine gluconate and 0.5% w/v glycyram solution in ethanol 70% v/v were used as positive controls, and ethanol solutions were used as negative controls.

#### Theory

For ease of use and functional description of the antimicrobial activity of extracts from any physical or chemical parameters, we used vector theory, which makes it possible to describe values of extract's antimicrobial activity using several test-strains as one integral vector in  $n$ -dimension space. This vector is characterized by the length that describes the "strength" of extract's antimicrobial activity,  $A$ ; with a slope angle that describes the "spectrum" of extract's action in test-strains of the microorganisms studied,  $r^2$ ; with a distance between the end point of vectors (extract and a standard drug) that describes the "degree of similarity" of extract's antimicrobial properties and standard antimicrobial drug,  $\Delta_{xs}$ .

Calculation of the integral index of extract's antimicrobial activity,  $A$ , was carried out by the following formula:

$$A = \sqrt{\left(\frac{a_1 \cdot D_1}{25}\right)^2 + \dots + \left(\frac{a_n \cdot D_n}{25}\right)^2} \quad (1)$$

where  $A$  is an integral index of antimicrobial activity for the extract; it is a gradational and dimensionless value in case of growth inhibition zone diameter use, efficiency index range: 1.0–1.5, the extract has weak antimicrobial activity; 1.5–2.5, the extract has medium antimicrobial activity;  $<2.5$ , the extract has strong antimicrobial activity. We calculated these values by putting respective limits of growth inhibition zone diameter (10, 15, and 25 mm) into formula (1);  $a_i$ ,  $a_n$  are relative normalized weight importance coefficients of strains, species, and types of microorganisms in the diseases against which we used the extract. It is the proportion of people affected by this microorganism. The coefficient range is from 0 to 1. In our calculations, it is taken as 1;  $D_i$ ,  $D_n$  are mean values of growth inhibition zone diameters of test microorganisms, in mm. For example,  $D_i$  is the mean value of growth inhibition zone diameter of *C. albicans* ATCC 885/653, and  $D_n$  is the mean value of growth inhibition zone diameter of *B. subtilis* ATCC 6633;  $\delta_{D_i}$ ,  $\delta_{D_n}$  are errors of growth inhibition zone diameters of test microorganisms, in mm; 25 is normalized value, which makes it possible to transform values of growth inhibition zone diameters of test microorganisms to dimensionless values of the integral index of antimicrobial activity ( $A$ ) of the extracts.

The correlation coefficient ( $\cos \gamma = r$ ) between vectors and distance between the end point of vectors ( $\Delta_{xs}$ ) was calculated by the following formulas:

$$\cos \gamma = r = \frac{\sum [a_i^X \cdot D_i^X \cdot a_i^S \cdot D_i^S]}{\sqrt{\sum [a_i^X \cdot D_i^X]^2} \cdot \sqrt{\sum [a_i^S \cdot D_i^S]^2}} \quad (2)$$

Table 1: Main parameters of the validation method of analysis and suitability of HPLC system for determination of licuroside and glycyram

Parameter	Pharmacopoeia limitation [14]	Compound	
		Licuroside	Glycyram
Retention time ( $t_R$ ), min	–	21.7 $\pm$ 0.3	35.3 $\pm$ 0.3 and 35.9 $\pm$ 0.3
Asymmetry coefficient (T)	$\leq 2.0$	0.8	0.68 and 0.72
Separation coefficient ( $R_s$ )	$\geq 1.5$	2.31	1.65 and 1.50
Theoretical plates number (N)	$\geq 1000$	169,803	699,649 and 888,042
RSD of peak's area, %	$\leq 2.0$	1.7	1.9 and 1.9
LOD, g/ml	–	$2.0 \cdot 10^{-5}$	$8.9 \cdot 10^{-5}$
LOQ, g/ml	–	$6.1 \cdot 10^{-5}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$
Determination coefficient, $r^2$	$\geq 0.99$	0.9999	0.9997
Calibration linear equation, $C$ (g/ml) = $f(S$ (MAU·s)	–	$C = (2.29 \pm 0.04) \cdot 10^{-7} \cdot S$	$C = (1.77 \pm 0.06) \cdot 10^{-6} \cdot S$

HPLC: High performance liquid chromatography

$$\Delta_{XSt} = \sqrt{\left(\frac{a_1 \cdot (D_1 - D_1^{St})}{25}\right)^2 + \dots + \left(\frac{a_n \cdot (D_n - D_n^{St})}{25}\right)^2} \quad (3)$$

where  $a_1^x, \dots, a_n^x$  are relative normalized weight importance coefficients of test-strains for the test extract - X and "standard" - St. In our calculations, it is taken as 1;  $D_1^x \dots D_n^x$  are mean values of growth inhibition zone diameters of test microorganisms, for the test extract - X and for "standard" - St, in mm.

In our research, we used a virtual vector as "standard" with some conventional coordinates for all test-strain, for example,  $D_1^{st}=25.0$  mm (for growth inhibition zone diameters of test microorganisms). This value was chosen because it is a breakpoint between such categories of microorganism sensitivity to antimicrobials as intermediate and sensitive.

**Regression analysis**

For the construction of the regression model of dependency of the integral index of extract's antimicrobial activity from the glycyram and licuroside concentration, we used table curve 3D v4.0 program.

**RESULTS AND DISCUSSION**

In the first series of experiments, phytochemical studies of extracts by HPLC and gravimetric methods have been carried out. The results of the quantitative analysis of licuroside, glycyram, and dry residue are presented in Table 2.

As it can be seen from the data of Table 2, maximum concentration of licuroside is observed in the extract based on ethanol 71% v/v, and for glycyram, in the extract based on ethanol 41% v/v, moreover, in the extract based on ethanol 96% v/v, its concentration was 173-fold less than in the extract based on ethanol 41 % v/v. These data agree with our previous studies [13].

In the second series of experiments, studies of the antimicrobial activity of extracts by *ig vitro* agar diffusion methods, the variant of "wells," has been carried out. The results of the antimicrobial activity of extracts and reference drugs are presented in Table 3.

As it can be seen from Table 3, all extracts demonstrate the high level of antimicrobial activity, but its maximum value was detected for the extract with ethanol 71 % v/v. Antimicrobial activity of this extract is almost similar to 0.05% chlorhexidine gluconate solution.

For the possibility of comparison of the integral parameter of drugs' antimicrobial activity between each other, we used vector algebra theory. In this connection, the results related to calculations of some important parameters using formulas (1)-(3) are presented in Table 4.

As it can be seen from Table 4, the integral index of antimicrobial activity of the extract based on ethanol 71 % v/v  $A=2.08$  has the equal value to the reference drug chlorhexidine gluconate  $A=2.07$ , but its vector is closely adjacent to the virtual drug in terms of parameter  $\Delta_{AS}=0.44$  then the vector of the reference drug  $\Delta_{AS}=0.51$ . This can be explained by the fact that extract's antimicrobial activity has less variation among the

**Table 2: Concentration of licuroside, glycyram, and dry residue in the extracts obtained from ethanol-water solutions with different concentrations**

Compound ( $\lambda$ , nm)	Retention time, min*	Compound concentration, % w/v					
		Ethanol, % v/v					
		22	41	50	71	82	96
1. Licuroside concentration, % w/v (360.4 nm)	21.7±0.3	0.098±0.003	0.108±0.003	0.133±0.004	0.170±0.005	0.149±0.005	0.067±0.002
2. Glycyram concentration, % w/v (258.4 nm)	35.3±0.3 and 35.9±0.3	1.46±0.04	1.53±0.05	1.55±0.08	1.45±0.04	1.02±0.03	0.0088±0.0003
3. Dry residue, % w/v	-	6.6±0.2	6.4±0.2	6.2±0.2	6.1±0.2	4.0±0.2	1.62±0.08

\* The mean value and its confidence interval (mean±SEM) are calculated with repeat counts n=3 and significance level p=0.95. SEM: Standard error of the mean

**Table 3: Antimicrobial activity of extracts from liquorice roots**

No.	Test-strain microorganism	Growth inhibition zone diameters of test microorganisms, in mm*						NC***
		Ethanol concentration, % v/v				Ch**	GI	
		22	41	71	96			
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20.3±1.4	20.0±1.4	24.3±1.4	20.7±1.4	24.3±1.4 16.0±1.4	Growth	
2.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21.0±1.4	20.3±1.4	22.3±1.4	18.7±1.4	20.7±1.4 14.7±1.4	Growth	
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18.3±1.4	19.0±1.4	20.3±1.4	20.3±1.4	17.0±1.4 14.0±1.4	Growth	
4.	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	16.7±1.4	17.7±1.4	19.7±1.4	18.0±1.4	16.3±1.4 13.7±1.4	Growth	
5.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	22.7±1.4	23.3±1.4	22.7±1.4	22.3±1.4	22.7±1.4 16.7±1.4	Growth	
6.	<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653	14.7±1.4	16.7±1.4	19.3±1.4	19.3±1.4	24.3±1.4 13.3±1.4	Growth	

\*Repeat counts n=3, significance level p=0.95; \*\*Ch is 0.05% w/v chlorhexidine gluconate in water solution and GI is 0.5% w/v glycyram solution in ethanol 71% v/v; \*\*\*C is negative control are ethanol solutions from 22 to 96% v/v



test strains of microorganisms than the reference drug. From the data in Table 4, we can also see that the square correlation coefficient ( $r^2$ ) for all tested extracts and reference drugs have a high value of  $r^2=0.99$ , this value demonstrates that extracts and drugs inhibit the growth of all test strains of microorganisms.

At the next stage of our study, we carried out analysis of data and chose the type of correlation model for dependency between the integral index of extract's antimicrobial activity and concentration of glycyram and licuroside. This stage was carried out with the use of table curve 3D v4.0 program.

From mathematical equations proposed by the program, we chose only one equation that in our opinion was the most adequate for an explanation of the dependency of the integral index of extract's antimicrobial activity and concentration of dominant components in the extract (glycyram and licuroside).

The equation found is presented below:

$$A=a+b \ln C_g+d \ln C_l \quad (4)$$

Where  $A$  is an integral index of extract's antimicrobial activity;  $a$  is a constant that equals  $4.22 \pm 0.2$ ;  $b$  is a constant that equals - (minus)  $0.041 \pm 0.004$ ;  $C_g$  is glycyram concentration, g/ml;  $d$  is a constant that equals  $0.36 \pm 0.03$ ;  $C_l$  is licuroside concentration, g/ml.

Determination coefficient of this equation is  $r^2=0.99$ ; moreover, all constants in the equation are significant and have the confidence interval of variation, not more than 10%.

Analysis of Equation (4) demonstrates that the coefficient at logarithm of licuroside concentration is greater than the coefficient at logarithm of glycyram concentration ( $0.36 > 0.041$ ), which indicates to the dominant influence of licuroside concentration in the extract on the integral index of antimicrobial activity.

Moreover, the minus sign at the coefficient related to logarithm of glycyram concentration indicates to the fact that higher concentration of this substance in the extract leads to decrease of the integral index of antimicrobial activity that is an unexpected fact because as it can be seen from the data of Tables 3 and 4, this compound possesses antimicrobial activity.

Then, using the regression equation obtained and addition data on phytochemical composition of extracts obtained with other ethanol concentrations (Table 2), we found the minimal values of glycyram and licuroside concentration, 1.0% w/v and 0.11% w/v, respectively, for exhibition of the integral index of extracts of antimicrobial activity with a target level of  $A=2.00 \pm 0.06$ .

Thus, for development of production technology for obtaining a hydroalcoholic extract from the liquorice root with maximum antimicrobial activity level, we should use ethanol with concentration  $65 \pm 15\%$  v/v. Therein, for standardization of the extract, we should take into account concentrations of both licuroside and glycyram.

At the final stage of our work, we carried out technological studies on obtaining of the extract with target concentration values of glycyram and licuroside by the filtration method of extraction.

Table 4: Integral antimicrobial parameters of extracts from liquorice roots

No.	Parameter*	Ethanol concentration, % v/v				Ch**	Gl**
		22	41	71	96		
1.	Integral index of antimicrobial activity of extract, $A \pm \delta A$	$1.88 \pm 0.06$	$1.92 \pm 0.06$	$2.08 \pm 0.06$	$1.95 \pm 0.06$	$2.07 \pm 0.06$	$1.45 \pm 0.06$
2.	Square correlation coefficient, $r^2$	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99
3.	Distance from optimal zone, $\Delta_{AS}$	0.65	0.58	0.44	0.52	0.51	1.01

\*Statistical calculations are carried out with repeat counts  $n=3$  and significance level  $p=0.95$ ; \*\*Ch is 0.05% w/v chlorhexidine gluconate in water solution and Gl is 0.5% w/v glycyram solution in ethanol 71% v/v

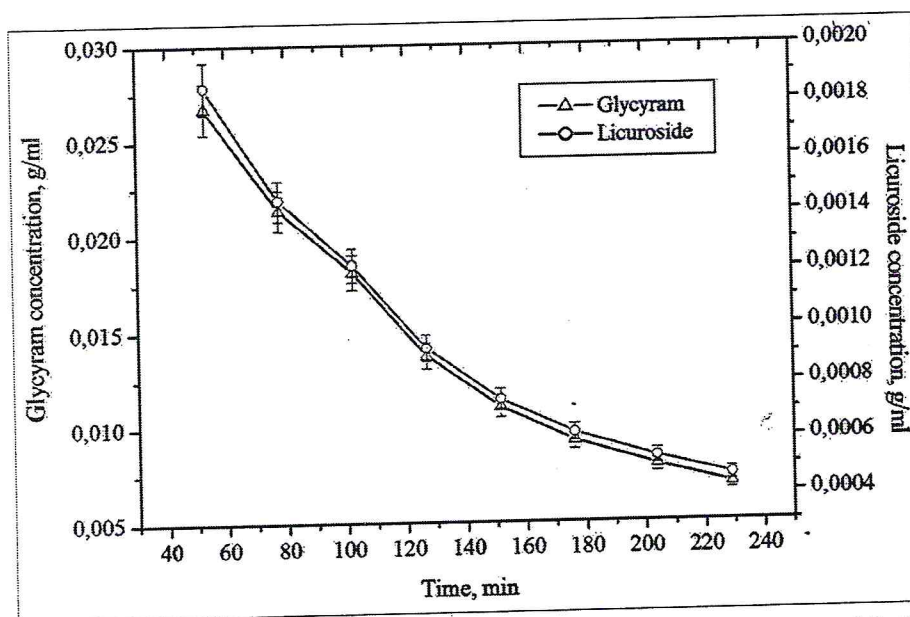


Fig. 1: Diagram of dependency between the concentration of biologically active substances and the time

Fig. 1 presents a diagram of dependency between the concentration of biologically active substances and the time of extract drainage at 1:1 ratio of volume extract/weight of plant raw material.

As it can be seen from the data in Fig. 1, critical concentrations of glycyram (0.018 g/ml) and licuroside (0.0012 g/ml) in the extract are observed at the third drainage volume. Thus, from the technological point of view, it is more reasonable to obtain the extract with the composition determined at 25°C, plant raw material/extract ratio 1:3 (w/v), and extraction time 100 min.

In accordance with the mathematical model, the integral index of extract's antimicrobial activity for these concentrations of licuroside and glycyram should be equal to  $A=1.97$ , which is within the suggested range.

These results form the background for the development of a rational technology for obtaining the extract from the liquorice root with maximum antimicrobial activity, as well as for analytical control of its quality.

#### CONCLUSION

Phytochemical and microbiological analyses of extracts from the liquorice root obtained with the use of different concentrations of ethanol have been carried out. Regression analysis of experimental data has been performed. An empirical dependency between the integral index of extract's antimicrobial activity and glycyram and licuroside concentrations has been found. Minimal licuroside and glycyram concentrations in the extract for an exhibition of its target level of antimicrobial activity have been calculated. Using a filtration method of extraction, we obtained the extract that satisfies minimal phytochemical requirements related to glycyram and licuroside content.

#### ACKNOWLEDGMENT

Authors express their highest esteem and thanks to Doct. Chem. Sc., Prof. Vasily Ivanovich Litvinenko, the Head of the Laboratory of Chemistry and Technology of Phytochemical Drugs of State Enterprise "State Scientific Center of Drugs and Medicinal Products," Kharkiv, Ukraine, for his help with reference substances.

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors had equally contributed to the research work.

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- McCulloch JM, Kloth LC. Wound Healing: Evidence-Based Management. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: F.A. Davis Company; 2010.
- Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. And its bioactive compounds. *Phytother Res* 2008;22:709-24.
- Baltina LA, Kondratenko RM, Baltina LM Jr., Plyasunova OA, Pokrovskii AG, Tolstikov GA. Prospects for creation of new antiviral drugs based on glycyrrhizic acid and its derivatives a review. *Pharm Chem J* 2009;43:539-48.
- Delbø M. Assessment Report on *Glycyrrhiza glabra* L. and or *Glycyrrhiza inflata* Bat. and or *Glycyrrhiza uralsensis* Fisch., Radix. Report No. EMA/HMPC/571122/2010. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), European Medicines Agency; 2013.
- Lakshmi T, Geetha R. *Glycyrrhiza glabra* Linn. Commonly known as Liquorice: A therapeutic review. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011;3:20-5.
- Langer D, Czarczynska-Gpyslinska B, Goslinski T. Glycyrrhetic acid and its derivatives in infectious diseases. *Curr Issues Pharm Med Sci* 2016;29:118-23.
- Shinde D, Koratkar S, Sharma N, Shitole A. Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) in HEPG2 cell line. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8:293-8.
- Gaitry CP, Binda DS, Farhin I, Sujata SD. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extract roots of *Glycyrrhiza glabra* and HPLC analysis. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:975-1491.
- Litvinenko VI, Georgievskiy VP, Fursa NS, Ammosov AS, Popova TP. Liquorice: Taxonomy, Chemistry, Technology, Standardization, Pharmacology, Clinic. Yaroslavl: Avers Plus; 2014.
- Popova NV, Litvinenko VI, Kucanjan AS. Medicinal Plants of the World: Encyclopedic Handbook. Kharkov: Disa Plus; 2016.
- Tolstikov GA, Baltina LA, Grankina VP, Kondratenko RM, Tolstikova TG. Liquorice: Biodiversity, Chemistry, Application in Medicine. Novosibirsk: Academic Publishing House "Geo"; 2007.
- World Health Organization. Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 1. Geneva: World Health Organization; 1999.
- Boyko NN, Pisarev D, Zhilyakova E, Novikov O, Kuznietsova V, Sushchuk N, et al. Modeling of solvent effects on phytochemicals' extraction from *Glycyrrhizae* radix. *J Adv Pharm Technol Res* 2018;9:66-72.
- European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia. 8<sup>th</sup> ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare; 2014.
- Russian Healthcare Ministry. Russian State Pharmacopoeia. 13<sup>th</sup> ed. Vol. 2. Moscow: Russian Healthcare Ministry; 2015.

# Development of Drugs for Treatment of Mortellaro's Disease in Cattle

Natalya Belyakova  
Department of Infectious and Invasive  
Pathology Belgorod State Agricultural  
Academy  
pos. Mayskiy, Russia  
belyakovanatalya2018@gmail.com

Anatolyi Kovalenko  
Department of Infectious and Invasive  
Pathology Belgorod State Agricultural  
Academy  
pos. Mayskiy, Russia  
mycobacteria@rambler.ru

Yuliya Bodrova  
Department of Infectious and Invasive  
Pathology Belgorod State Agricultural  
Academy  
pos. Mayskiy, Russia  
bodrova95@mail.ru

**Abstract**—The root cause of premature culling of animals from the herd as a result of diseases and injuries is a lesion of distal portions of limbs of an infectious etiology, which include Mortellaro's disease. Mortellaro's disease affects up to 60 percent of the cattle in Russia.

BelNano was developed, consisting of liposomal fractions and nanoparticles of silver and copper distributed in its volume. The surface of the nanoparticles has been specially modified to provide high efficiency on the skin and keratinized tissues.

Pathogens that were found in impression smear and *Fusobacterium necrophorum*, *Treponema*, *Borellia* grown on nutrient media, which were sensitive to the active components of the BelNANO, ensuring their inactivation by action on the cell wall were revealed in the studied animals with Mortellaro's disease. In experiments on the study of effectiveness of the BelNANO for the prevention and treatment of skin and skin coverings of the distal portion of limbs in Mortellaro's disease, 89 percent therapeutic efficacy was established, providing not only a high bactericidal and bacteriostatic effect on infectious agents, but also high regenerative properties of the drug, expressed in epithelization and the appearance of granulation tissue.

**Keywords**—skin and skin lesions, Mortellaro's disease, Cu and Ag nanoparticles, lameness, drug for the treatment of interdigital cleft, cattle

## I. INTRODUCTION

Under the conditions of production intensification of dairy farms, the percentage of injuries of the distal portions of limbs increases sharply, which contributes to the emergence of infectious diseases as a result of the appearance of the portal of entry for infection [1].

With modern technologies for keeping dairy cows, this is facilitated by highly concentrated feeding, leading to acidosis, and as a result to an increase in the permeability of the skin, laminitis, a decrease in the overall resistance of the animal organism, which entails the emergence of various diseases, among which the leading place takes Mortellaro's disease, the primary sign of which is lameness[2].

Initially, the behavioral characteristics of animals and the manifestation level of lameness of varying degrees, as well as the affection of the distal portion of limbs in Mortellaro's

disease were studied by Shpreher D. et al.(1997) and Dopfer D. et al. (1997) [3].

Shpreher D. classification (1997) is based on indicators of back bending and position of limbs and allows us to assess the severity of the disease [4].

At the same time, the author evaluated the state (walking score 1) in animals (walking score 1) - the norm - in the absence of a back bending and position of limbs in a standing position and when walking, the steps in these animals are long and sure. In case of mild lameness (walking score 2) in a standing position the cow has a straight back, but when walking there is a slight bend, the gait is slightly impaired. In case of moderate lameness (walking score 3) both in a standing position and when moving the cow appears to have a back bending. The animal makes short, faltering steps with one or more limbs; a descent limb opposite to the sick may be observed. Lameness (score 4) is described when an animal tries not to step on a sick limb, but occasionally makes a step with it, a back bending is always present. The descensus of the ungulate processes of the limb, opposite to the sick, is pronounced. Acute lameness (walking score 5) is determined in animals with a pronounced back bending and complete absence of support on the sick limb when walking and in a standing position.

Dopfer D. classification divides the disease into 4 different stages (M1 – M4) [5]. This classification describes the degree of manifestation of the disease. M1 – small changes with a red or white-red surface, exudation is possible. The epithelium may be retained or damaged. M2 – "classic ulceration", red or white-red lesions with a diameter of more than 1 cm. On the surface of the lesion, granulation or proliferative tissue (in large numbers or filamentously) is observed. M3 – healing lesions with a black squarrous surface. M4 – skin changes causing a suspicion of IDD (infectious digital dermatitis), as well as a proliferative form. Later, DöpferD. adds another stage of IDD – M4.1, which is characterized by the development of a new lesion of M1 in the chronic process of M4. The stages of the disease do not remain unchanged over time. There is a constant transition from stage to stage under the influence of various external factors. The most frequent transition is observed between the stages M2 – M4; there are also less logical transitions: M3 - M0, M0 - M2 and M0 - M3. Different stages of IDD on different limbs may also be observed.

Also, Manske et al. (2002) and Kozii V. (2005) have been worked on the classification of lesions in Mortellaro's disease [6, 7]. This infectious disease accompanied by lesion of the skin and skin covering of the distal portions of limbs is widespread in many countries of Europe and Russia and is may affect a large number of highly productive dairy cattle (Cheli R. E., Mortellaro C., 1974).

When defining Mortellaro's disease, it should be noted that this infectious disease is highly contagious, causing focal lesions on one or both hind limbs in cattle, which are extremely painful, causing lameness in animal, resulting in reduced milk yield and reproductive ability. In most cases, lesions are localized on the arch of the interdigital cleft at the level of the heel of the hooves, as well as on the inner surface of the interdigital cleft [8].

Lesions are ulcerative-necrotic surfaces, with exudate discharge, having a concave appearance, red in color, smooth, sometimes fine-grained, resembling the appearance of strawberries. In most cases, overgrown wool is observed around the damaged area, often glued with exudate. The diameter of the affected areas varies from a few millimeters to 10 cm [9].

According to most researchers, spirochetes of the genus *Treponema* spp. [10-12], *Borrelia* spp. [13], as well as *Fusobacterium necrophorum* play a leading role in the etiology of the disease [14-16].

In addition to the above mentioned microorganisms, staphylococci, streptococci and some conditionally pathogenic microorganisms were isolated by most researchers [1].

Technological, economic and environmental factors play a significant role in the spreading and course of Mortellaro's disease [17-19].

Mortellaro's disease is a factorial infectious disease, the development and course of which depends on the feeding, management and immune status of the animal, which determines the susceptibility of animals to this disease and the nature of the course of the infectious process [20-22].

Various methods and agents are used to treat Mortellaro's disease, including antibiotic therapy both parenterally and topically with localization of the effect on the skin, using aerosols and sprays, as well as antiseptic agents — disinfecting hoof baths using antibiotics, solutions of copper sulfate, formalin, etc. [23,24].

Currently, in dairy cattle breeding of most of the highly developed countries there is no definite opinion on the existence of a commonly accepted methodology and a single agent for the prevention and treatment of Mortellaro's disease, as data on the effectiveness of drugs used by pharmaceutical companies both in Europe and the USA (Solka, hoof skin) are varying [25].

Thus, there is a need to develop a domestic therapeutic and prophylactic agent that can be used to control Mortellaro's disease.

At the same time, with the development of nanotechnology and the use of nanomaterials, a large number of publications appear confirming the high therapeutic

efficacy of metals in the nanocrystalline state (Jose Ruben Morones et al. 2005) [26].

All of the above, as well as the previously developed direction for the design of agents to control Mortellaro's disease, prompted us to develop and test a new innovative highly effective therapeutic and prophylactic agent based on copper (Cu) and silver (Ag) nanoparticles embedded in liposome fractions for treatment and prevention of cows with lesions of skin and skin coverings of the distal portions of limbs developing in Mortellaro's disease.

## II. EXPERIMENTAL

The study of the clinical manifestations of lesions of the skin and skin coverings of the distal portions of limbs in Mortellaro's disease was carried out directly in settings of a dysfunctional farming for diseases of the distal portions of limbs of cattle. A clinical assessment of the intensity of lesions in Mortellaro's disease was performed according to the classification proposed by Döpfer D et al., (1997) [3].

We have studied the antigenic composition of pathogens at the sites of ulcerative lesions of the interdigital cleft and coronet, causing the development of Mortellaro's disease, taking samples of punctate and conducting bacteriological studies.

Stabilized silver and copper nanoparticles were used in combination with liposomal fractions to prepare antiseptic and wound healing agent BelNANO in the settings of M9, LLC (Tolyatti), which can have a high therapeutic effect in treating cows with lesions of the distal portions of limbs inherent in Mortellaro's disease, manifested by lesions of the skin and skin coverings of the distal portions of limbs.

An experimental sample of the BelNano was prepared, consisting of a liposome fraction and silver and copper nanoparticles distributed in its volume. Silver and copper particles were obtained by one of the sol-gel methods, namely the hydrosol method, using universal laboratory equipment. The method consists in preparing an aqueous solution of a reducing agent in an aqueous solution of a stabilizer and introducing a metal salt into the solution of a reducing agent.

Quercetin with a concentration of  $1 \cdot 10^{-3}$  to  $14 \cdot 10^{-3}$  mol/liter in its deprotonated form with a molar ratio of quercetin to ammonia in the range of 1:3-1:10 was used as a reducing agent, while the oxidized form of quercetin acts as a nanoparticle stabilizer.

The concentrations of the additional stabilizing substance varied from  $1 \cdot 10^{-3}$  to  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/liter; silver and copper nitrates were used as metal salts. The concentration of nanoparticles in the resulting solution ranged from 500 ppm to 2500 ppm.

Following stabilization of the nanoparticles, their surface was specially modified to ensure high efficiency on the skin and keratinized tissues. The final concentration of silver and copper metals in liposome fractions was 15 mg/L.

New approaches to active substances with high bactericidal properties in low concentrations and deep penetration not only into the surface layers of epithelial tissue, but also into the subcutaneous tissue were used to develop a drug for the treatment and prevention of diseases of the distal portions of limbs.

This is due to the fact that the silver and copper nanoparticles included in the drug have a special molecular coating – liposomal fractions, which have adsorbing properties and rapid penetration into the deep layers of the epidermis and subcutaneous tissue, which can remain for a long time in the tissues and provide a long-term prolonged therapeutic effect.<sup>1</sup>

A new dosage form of an antiseptic wound healing drug for external use in diseases of the distal portions of limbs (Mortellaro's disease) has been developed, which has not previously been used in veterinary medicine, based on nanotechnology. Copper and silver nanoparticles were embedded in the liposome fractions of the finished dosage form.

To isolate pathogens from sick animals with Mortellaro's disease, punctate was taken from the skin and skin coverings of the interdigital cleft and microscopic studies of impression smears were carried out with further plating of homogenates on BSK-II, MIB (meat infusion broth), MIA (meat infusion agar) culture media.

Cultural-morphological, biological studies of isolated cultures of microorganisms were carried out. The resulting cultures were applied to a glass slide and stained according to Romanovsky-Giemsa and Gram methods.

Silver and copper nanoparticles were obtained using a chemical reactor (M-9, LLC, Samara), followed by the preparation of a liposomal oil form.

Solutions of various concentrations with silver and copper nanoparticles were used to conduct studies. The total concentration of metals was 15.0 mg/kg.

Experimental and control groups of animals with Mortellaro's disease were formed (Table I).

As a pure control, 20 animals were taken in which lesions of the interdigital cleft characteristic of Mortellaro's disease

were found, for which no treatment was used after hygienic treatment of the hooves.

Animals of control group 1 in the amount of 20 animals, also having lesions of skin and skin coverings of the interdigital cleft and coronet, characteristic of Mortellaro's disease, were run through hoofed baths containing 10% copper sulfate, with a frequency of 2 times a day throughout the study period.

For experimental group of cows No. 1 (n = 40), with M1 lesions according to the classification of DöpferD.e (1997) [3], a sample of the drug with a concentration of 15 mg/L of silver and copper metals in the gel was applied once after clearing and hygienic treatment of the hooves.

On the affected areas of the skin and skin coverings of the lactating cows of experimental group No. 2 (n = 29) - with M2 lesions, the experimental sample of the BelNano was applied twice with an interval of 3 days.

The drug was also applied twice to animals of experimental group No. 3 (n = 59) with M3 lesions.

On cows of experimental group No. 4 (n = 21) with M4 lesions, the BelNano sample was used once after orthopedic clearing and hygienic treatment of hooves.

For cows of all experimental groups, a standard gauze bandage with preliminary application of parchment paper to the gel surface was used to fix the used drug.

Following 3rd and 7th days, the affected areas of the skin and skin coverings were examined and the therapeutic effectiveness of the BelNano was evaluated according to the degree of healing.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

Dimensionality of silver and copper nanoparticles, which were in the finished solution with liposome fractions, ranged from 12 to 30 nm (Fig. 1, 2).

TABLE I. METHODS OF FORMING EXPERIMENTAL GROUPS OF ANIMALS FOR RESEARCH<sup>1</sup>

Group of animals	Number of animal units (n/ level of prevalence according to DopferD.e.)	Clearing the hooves	Single use of the NanoBel	NanoBelwas used twice
Pure control	20/ M1 - 7, M2 - 6, M3-4, M4 - 3	+	-	-
Control I	20 /M1 - 14, M2-4, M3-2, M4 - 0	+	- baths of a 10% aqueous solution of copper sulfate	
Experimental No.1	40	+	+	-
Experimental No.2	29	+	+	+
Experimental No.3	59	+	+	+
Experimental No.4	21	+	+	-

<sup>a</sup> Experimental group No. 1 - animals with lesions M1, experimental group No. 2 - M2, experimental

<sup>b</sup> group No. 3 - M3, experimental group No. 4 - M4, according to the classification of DöpferD.e (1997)

<sup>1</sup> The work was performed on the basis of the Department of Infectious and Invasive Pathology, the Laboratory of Infectious and Invasive Pathologies and Approbation of Veterinary Drug Products of Belgorod State Agricultural University named after V.Ya. Gorin and M9, LLC (Tolyatti). Scientific

and production experiments were carried out on the basis of livestock farming Butovo-Agro, LLC of Yakovlevsky district of Belgorod region.

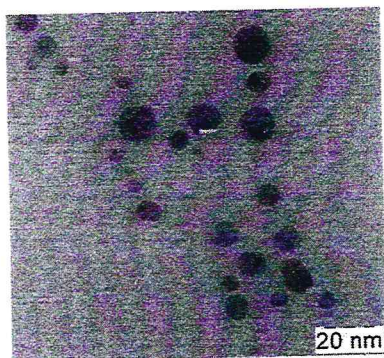


Fig. 1. The sizes of Ag nanoparticles obtained by the method of hydrosols, according to the results of TEM (transmission electron microscopy).

The main difference between the developed drug and existing analogues is the presence of metals in crystalline form, included in the liposomal substance. These extremely small crystals penetrate effectively into the deep layers of the skin and subcutaneous tissue, acting in the focus of inflammation and effectively inactivating conditionally pathogenic and pathogenic microorganisms, including infection pathogens.

The effectiveness of the experimental sample of the Bel-NANO was studied in Butovo-Agro, LLC of Yakovlevsky District, Belgorod Region, on cattle imported from the Netherlands.

As a result of microscopic studies of impression smears obtained from the affected areas of the interdigital cleft of cows with Mortellaro's disease, it was found that in most samples stained according to Gram and Romanovsky - Giemsa, rods of different thickness and length were observed in the field of view in the form of thin long threads corresponding to those of *Fusobacterium necrophorum* (Fig. 3), also the spiral-shaped forms of *Treponema* spp., stained in a pale pink color (Fig. 4), and twisted spiral-shaped threads of *Borrelia* spp. of purple color.

On the MIB medium, the culture of *Fusobacterium necrophorum* showed visible growth after 24-48 hours, causing intense turbidity of the lower layer firstly, and of the entire medium later. Very weak gas formation was noted during the first hours of the observed growth. After 5-8 days,

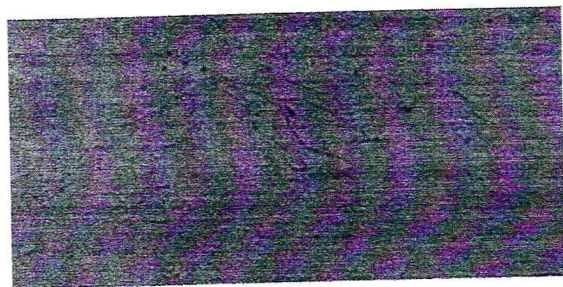


Fig. 3. Appearance of *Fusobacterium necrophorum* in an impression smear under a light microscope.

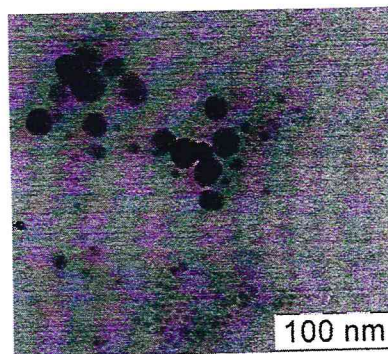


Fig. 2. The sizes of Cu nanoparticles obtained by the method of hydrosols, according to the results of TEM (transmission electron microscopy).

broth bleaching was observed with the appearance of powdery cloud-like sediments.

When homogenate obtained from the punctate of the interdigital cleft was plated on BSK-II medium, a change in the color of the medium to yellow and its turbidity was observed for 12 days, which indicated bacterial contamination of *Borellia* spp., the culture formed aggregates in the form of loose white lumps at the bottom of the tube, which over time were evenly distributed in the medium. (Fig. 5).

During the conduct of microscopic studies of cultures of microorganisms isolated from BSK-II, MIB and MIA media, after staining according to Gram and Romanovsky-Giemsa, the presence of Mortellaro's disease pathogens was established: *Fusobacteria necrophorum*, *Treponema* spp., *Borrelia* spp.

During the experiments, the investigations were conducted to study the overall incidence of Mortellaro's disease throughout the herd of lactating cows before the 3rd lactation. The incidence of animals with Mortellaro's disease in cows of 1st lactation was 3%, in cows of 2nd lactation – 10%, and in cows of 3rd lactation – 39%. (Table II)

*Treponema* spp. platings were cultured under anaerobic conditions for 7 days. After 72 hours, an irregularly shaped region of 3-4 mm developed in the test tube, in the center of which small transparent colonies or a delicate film with traces of erosion were rarely found on the MIA surface (Fig. 6)

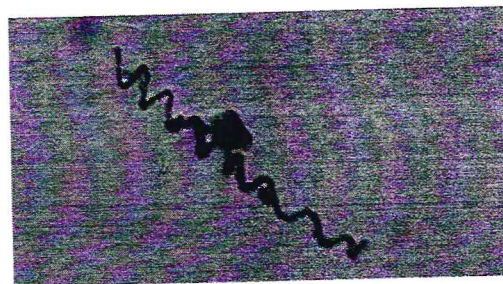


Fig. 4. Appearance of *Treponema* spp. in an impression smear under a light microscope.

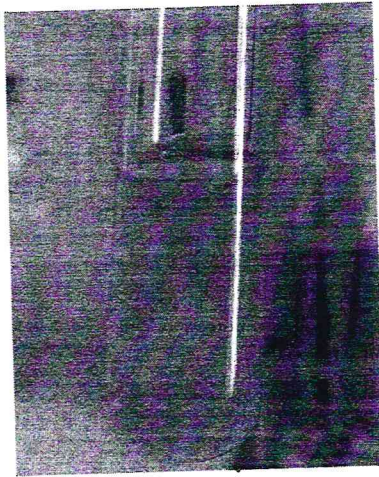


Fig. 5 Appearance of the growth of *Borrelia* spp. on the MIB medium.

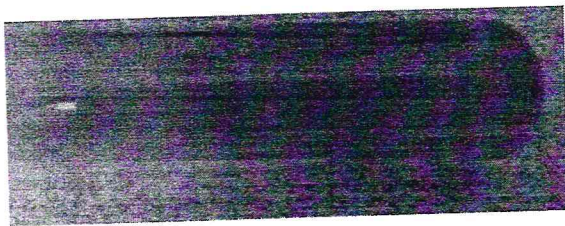


Fig. 6 Appearance of the growth of *Treponema* spp. on the MIB medium.

TABLE II. THE DYNAMICS OF THE INCIDENCE OF CATTLE WITH MORTELLARO'S DISEASE IN BUTOVO-AGRO, LLC

Livestock (n) of cows	Reported lesions of the distal portions of limbs characteristic of Mortellaro's disease	
	Total	MD
Lactation 1	2504	75/3%
Lactation 2	694	70/10%
Lactation 3	722	282/39%
Grand total	3920	427/11%

Analyzing the data from the table, we can conclude that, with the imported livestock, the sources of the causative agents of Mortellaro's disease were brought into the farm, and with intensive exploitation in 2018, 427 animal units (11%) were detected with lesions of the distal portions of limbs, manifesting by lesions of hooves, of which 75 animal units (3%) - cows of the 1st lactation, 70 animals (10%) - of the 2nd lactation and 282 animal units (39%) - of the 3rd lactation.

Bybacteriological studies of impression smears of taken punctates prior to treatment during the conduct of microscopical investigation was revealed the presence of pathogens *Fusobacteria necrophorum* (Fig. 3), *Borrelia* spp (Fig. 5), *Treponema* spp. (Fig. 4) from all animals of the control and experimental groups (Fig. 7).

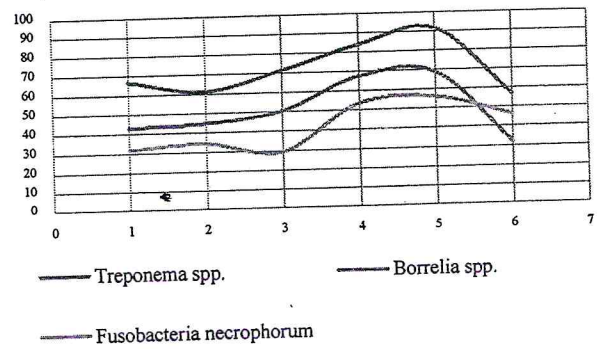


Fig. 7. Dynamics of changes in the specific gravity of the pathogens of Mortellaro's disease

When studying the specific gravity in relation to the total number of isolated cultures of the above pathogens after conducting cultural studies, it was found that in the punctates taken from animals of pure control, the proportion of *Fusobacteria necrophorum* was 31.8%, *Borrelia* spp. - 43.1% and *Treponema* spp. - 66.7%.

In punctates taken from animals of control group No. 1, these indicators amounted to *Fusobacteria necrophorum* 34.2%, *Borrelia* spp. - 44.8% and *Treponema* spp. - 61.3%.

In animals of the first experimental group, the pathogens were identified in the following amounts in punctates from the interdigital cleft: *Fusobacteria necrophorum* 29,3 %, *Borrelia* spp. - 50.3% and *Treponema* spp. - 71.5%.

The specific gravity of pathogens in 29 punctate samples of damaged skin and the skin coverings of the interdigital cleft of sick animals of experimental group No. 2 amounted to: *Fusobacteria necrophorum* 53,5 %, *Borrelia* spp. - 67.6% and *Treponema* spp. - 83.9%.

In punctates taken from cows of experimental group No. 3, the number of pathogens was determined: *Fusobacteria necrophorum* in 56,2% of samples, *Borrelia* spp. - 69.1%, *Treponema* spp. 91.8%.

From animals of the 4th experimental group, pathogens were isolated in the following amounts: *Fusobacteria necrophorum* 46,3 %, *Borrelia* spp. - 31.8% and *Treponema* spp. - 56.8%.

On average, in all groups, the isolation rate of *Fusobacteria necrophorum* was  $41.8 \pm 14.4$ ; *Borrelia* spp. -  $51.1 \pm 19.3$ ; *Treponema* spp. -  $72 \pm 19.8$ .

After carrying out therapeutic measures, punctate samples were taken from the healing surfaces of the skin with further plating on previously used nutrient media. It was found that in all samples taken from animals of the pure control group, the specific gravity of microorganisms in relation to the previously obtained was: *Fusobacteria necrophorum* 42%, *Borrelia* spp. - 51.1% and *Treponema* spp. - 68.8%.

In punctates taken from animals of the control group No. 1, these indicators amounted to *Fusobacteria necrophorum* 7.2 %, *Borrelia* spp. - 4.8% and *Treponema* spp. - 5.3%.

In punctates taken from animals of the first and second experimental groups, pathogens of Mortellaro's disease were not detected.

In punctates taken from animals of groups 3 and 4, *Fusobacterium necrophorum* was found from 1 and 2 animals, respectively. In general, the bactericidal effect of the drug was 99.9%.

After conducting therapeutic measures using the samples of the BelNano that we obtained, it was found that in pure control the state of the skin and skin coverings in animals affected by Mortellaro's disease only worsened, which was manifested by an increase in the number of animals with M4 lesions from 3 to 9, M3 from 4 to 69, and a decrease in M1 from 7 to 1, M2 from 6 to 4.

In cows of control group No. 1, the state of the affected areas of the skin and skin coverings with varying degrees of affection tended to slightly improve among the M1 lesions from 14 to 11 to 21%, in one animal at stage M3 there was a full recovery, in 3 animals the condition of lesions remained unchanged and in cows with M2 lesions the state worsened, with an increase in area to M3 (n = 2).

In experimental group No. 1 (M1), when examining lesions on the 3rd day after application of the drug, treatment of the interdigital cleft had a positive trend with the results: full recovery - 11 animals, and the formation of granulation tissue with a smooth surface of bright pink color - 29 animals. On day 7, the number of fully recovered animals reached 37, which amounted to 92.5%, and in the remaining 3 animal units, complete replacement of the affected areas with granulation tissue was not observed.

Among the animals of experimental group No. 2 (M2), the dynamics of improving the state of the skin and skin coverings was as follows: examination on day 3 showed that the acute phase of the lesions was replaced by healing in all cows, and in several animals (n = 6) the healing reached the granulation phase. On day 7, a full recovery of the skin and skin coverings was achieved in 25 animals, which amounted to 86%, in the rest of animals (n = 4) stage M2 transferred to M1 without exudation.

When examining the dynamics of treatment of lesions of skin and skin coverings in cows of experimental group No. 3 (M3), softening and dropping of squarrous necrotic surfaces and pale pink epithelial tissue were observed already on day 3

when removing gauze dressings, which characterizes the picture of full recovery for 20 animal units of cows, in the remaining animals (n = 39) lesions of skin and skin coverings were transformed into the granulation stage. On day 7, 52 animals had secondary intention healing, the skin in previously affected areas had no visible changes, in 7 animals the process was at stage M1.

According to the study in experimental group No. 4 it was found that out of 21 animals in 18 animal units the lesion passed to the granulation stage on day 7, and in 2 animals – to stage M1, the secondary intention healing was noted in 1 animal later. (Table III)

#### IV. CONCLUSION

The effectiveness of the therapeutic effect of the Bel-NANO sample containing silver and copper nanoparticles in comparative aspect with 10% aqueous solution of copper sulfate for the prevention and treatment of skin and skin coverings of the distal portions of limbs in Mortellaro's disease was studied. Research showed 89% efficiency providing a high bactericidal effect on pathogens of infections, expressed in the appearance of epithelial and granulation tissues in the affected areas of the skin and skin coverings already on the 3rd day of treatment. Positive bactericidal and bacteriostatic effects were noted to the value of 99.9%, which contributes to the purification of the wound surface from purulent exudate, which entailed the resorption of infiltrates, the appearance and growth of granulation tissue in the absence of pathogenic microflora, and, accordingly, the activation of metabolic and regenerative recovery processes.

This is due to the fact that the composition of the drug includes, in addition to silver and copper nanoparticles, liposome fractions with adsorbing properties and rapid penetration into the deeper layers of the epidermis and subcutaneous tissue, resulting in a detrimental effect on both pathogenic and saprophytic microflora, while maintaining a long time in tissues and providing long-term prolonged therapeutic effect.

A new dosage form of an antiseptic wound healing drug for topical use in diseases of the distal portions of limbs

TABLE III. THE RESULTS OF THE STUDY OF THE THERAPEUTIC EFFECTIVENESS OF THE EXPERIMENTAL SAMPLE OF THE BEL-NANO

Group	Number of animal units (n/ level of prevalence according to Dopfer D.e.) before treatment	The number of remaining affected animals after treatment using Bel-NANO	Therapeutic efficacy,%
Pure control	20/ M1 - 7, M2 - 6, M3-4, M4 - 3	20/ M1 - 1, M2 - 4, M3-6, M4 - 9	0
Control 1	20 /M1 - 14, M2- 2, M3-4, M4 - 0	20/ M1 - 11, M2-0, M3-5, M4 - 0	20
Experimental No.1	40	3 (7.5%)	92.5
Experimental No.2	29	4 (14%)	86
Experimental No.3	59	7 (12%)	88
Experimental No.4	21	3 (14%)	86
Total in experimental groups	149	17 (11%)	89



(Mortellaro's disease) has been developed, which has not previously been used in veterinary medicine, based on nanotechnology. Copper and silver nanoparticles were embedded in the liposome fractions of the finished dosage form.

## REFERENCES

- [1] A.V. Ivanov, H.N. Makaev, D.A. Khuzin, S.V. Shabunin, Yu.N. Alekhin, Diagnosis, treatment and prevention of finger diseases and necrobacteriosis of highly productive cows. Voronezh: Istoki Publishing House, 2013, 132p.
- [2] R. Cheli, C.M. "Mortellaro, La dermatite digitale del bovino", Proc. 8th International Conference on Diseases of Cattle, P. 208-213.
- [3] D. Döpfer, "Dermatitis digitalis: Klauen-krankheit mit vielen Gesichtern", Milchpraxis das Magazin des Milchprüfungs Bayern E.V., vol. 3, pp. 12-17, 2012.
- [4] D.J. Sprecher, D.E. Hostetler, J.B. Kaneene, "Locomotion Scoring of Dairy Cattle", Theriogenology, vol. 47, pp. 1178-1187, 1997.
- [5] D. Döpfer, M. Holzhauer, M. van Boven, "The dynamics of digital dermatitis in populations of dairy cattle: Model-based estimates of transition rates and implications for control", The Veterinary Journal, vol. 193, pp. 648-653, 2012.
- [6] T. Manske, J. Hultgren, C. Bergsten, "Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel-horn erosion in a Swedish dairy herd", Prev. Vet. Med., vol. 53, pp. 215-231, 2002.
- [7] V.I. Koziy, "Etiology and course of endemic papillomatous digital dermatitis in high-yielding dairy cows", Vet. Medicine of Ukraine, № 26-28, 2005.
- [8] A.M. Kovalenko, S.A. Khomutovskaya, N.A. Belyakova, V.A. Kuzmin, A.V. Tsyganov, N.P. Ponomarenko, "Mortellaro's disease - approaches to the design of products containing nanoparticles for treating cows", Hippology and Veterinary Medicine - St. Petersburg, № 1 (27), pp. 53-61, 2018.
- [9] A.A. Samolovov, S.V. Lopatin, Diseases of the hooves and finger of cattle. Ros. akad. s.-kh. sciences. Sib. region Institute of Experiment. Veterinary medicine of Siberia and the Far East: Novosibirsk, 2010, pp. 80 - 95.
- [10] T.M.A. Santos, R.V. Pereira, L.S. Caixeta, C.L. Guard R.C. Bicalho, "Microbial diversity in bovine papillomatous digital dermatitis in Holstein dairy cows from upstate New York", FEMS Microbiol. Ecol., vol. 79, pp. 518-529, 2012.
- [11] G. Sayers, P.X. Marques, N.J. Evans, L. O'Grady, M.L. Doherty, S.D. Carter, J.E. Nally, "Identification of spirochetes associated with contagious ovine digital dermatitis", J. Clin. Microbiol., vol. 47, pp. 1199-1201, 2009.
- [12] Moter, G. Leist, R. Rudolph, K. Schrank, B.K. Choi, M. Wagner U.B. Göbel, "Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions", Microbiol. vol. 144, pp. 2459-2467, 1998.
- [13] I. Demirkan, S.D. Carter, R.D. Murray, R.W. Blowey, M.J. Woodward, "The frequent detection of a treponeme in bovine digital dermatitis by immunocytochemistry and polymerase chain reaction", Veterinary Microbiology, vol. 60, pp. 285-292, 1998.
- [14] R.J. Collighan, M.J. Woodward, "Spirochaetes and other bacterial species associated with bovine digital dermatitis", FEMS Mic. Lett., vol. 156, pp. 37-41, 1997.
- [15] K.K. Moe, T. Yano, K. Misumi, C. Kubota, W. Yamazaki, M. Muguruma, N. Misawa, "Analysis of the IgG Immune Response to Treponema phagedenis-Like Spirochetes in Individual Dairy Cattle with Papillomatous Digital Dermatitis", Clinical and vaccine immunology, vol. 17 (3), P. 376-383, 2010.
- [16] K. Klitgaard, M. Boye, N. Capion, T.K. Jensen, "Evidence of Multiple Treponema Phylotypes Involved in Bovine Digital Dermatitis as Shown by 16S rRNA Gene Analysis and Fluorescence In Situ Hybridization", Journal of clinical microbiology, vol. 46 (9), pp. 3012-3020, 2008.
- [17] J.G.C.J. Somers, K. Frankena, E.N. Noordhuizen-Stassen, J.H.M. Metz, "Risk factors for digital dermatitis in dairy cows kept in cubicle houses in The Netherlands", Preventive Veterinary Medicine, vol. 71, pp. 11-21, 2005.
- [18] S.J. Wells, L.P. Garber, B.A. Wagner, "Papillomatous digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds", Prev. Vet. Med., vol. 38, pp. 11-24, 1999.
- [19] M. Metzner, D. Döpfer, R. Pijl W. Kehler, "Dermatitis digitalis des Rindes: klinisches Bild, Epidemiologie und Maßnahmen", Prakt. Tierarzt., Sondernummer collegium veterinarium XXV. vol. 76, pp. 46-50, 1995.
- [20] J.E. Nocek, A.B. Johnson, M.T. Socha, "Digital characteristics in commercial dairy herds fed metal-specific amino acid complexes", J Dairy Sci, vol. 83(7). pp. 1553-1572, 2000.
- [21] M. Holzhauer, C.J.M. Bartels, D. Döpfer, G. van Schaik, "Clinical course of digital dermatitis lesions in an endemically infected herd without preventive herd strategies", The Veterinary Journal, vol. 177, pp. 222-230, 2008.
- [22] Olmos, L. Boyle, B. Horan, D.P. Berry, P. O'Connor, J.F. Mee, A. Hanlon, "Effect of genetic group and feed system on locomotion score, clinical lameness and hoof disorders of pasture-based Holstein-Friesian cows G.", The Animal Consortium Animal, vol. 3 (1), pp. 96-107, 2009.
- [23] R.A. Laven, D.N., "Logue Treatment strategies for digital dermatitis for the UK", The Veterinary Journal, vol. 171, pp. 79-88, 2006.
- [24] RF patent for invention No. 2601120 C1 A method for the treatment of infectious diseases of the distal portions of limbs in cattle, published on 10.27.2016, Authors: Kovalenko A.M., Dorofeev A.F., Spirina A.S. et al.
- [25] M. Shahabaddin, I. Nowrouzian, M. Nouri, S.M.K.S. Javad, "Clinical Assessment of Four Individual Treatment for Digital Dermatitis in Dairy Cows", Iranian journal of veterinary surgery, vol. 2, pp. 56-60, 2007.
- [26] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez et al., "The bactericidal effect of silver nanoparticles", Nanotechnology, vol. 16(10), pp. 2346-2353, 2005.