

Invenția se referă la domeniul medicinei veterinare și anume la un unguent antimicrobian pe bază de produse apicole, care poate fi utilizat în tratamentul plăgilor infectate la animale.

Este cunoscut linimentul balzamic după Vișnevski A.V., care conține smoală, aerosol și ulei de ricin cu proprietăți antiseptice, care contribuie la accelerarea procesului de regenerare [1].

Dezavantajele linimentului constau în acțiunea slab iritantă asupra receptorilor, țesuturilor, tratamentul de lungă durată, eficacitatea slabă, care limitează utilizarea clinică a acestui remediu.

Se mai cunoaște linimentul de sintomicină, substanța activă a căruia este antibioticul levomicitină [2].

Dezavantajul acestui liniment constă în aceea că substanța activă componentă levomicitina poate provoca fenomene dispeptice, precum și excitarea mucoaselor, dermatite și erupții. Levomicitina influențează toxic funcția hematopoietică (reticulocitopenie, granulocitopenie, uneori micșorarea numărului de eritrocite), este contraindicată în cazul diminuării hematopoietice, psoriazei, exemelor, micozelor și al altor boli dermatologice.

La utilizarea preparatelor, ce conțin antibiotice, pe o perioadă mai îndelungată se observă rezistență față de multe microorganisme patogene (stafilococul auriu, salmonela, bacilul purulent), care are o mare importanță în practica chirurgiei veterinare. În caz de plăgi infectate cu un termen mai mare de 3 ore, antibioticele nu sunt efective, ceea ce se observă des în medicina veterinară. În aceste cazuri exsudatul purulent și membrana fibroasă slăbesc brusc efectul curativ al oricărui antibiotic.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unui unguent ecologic pur cu efect antimicrobian, anestezic, trofic, stimulator al proliferației epitelului și creșterea țesutului granulocitar, destinat tratării animalelor cu plăgi infectate și a altor procese inflamatorii.

Esența invenției constă în obținerea unguentului antimicrobian care, conform variantei I, conține miere de albine, extracte alcoolice de polen, de propolis și de *Callisia fragrans*, ceară de albine, lanolină și vaselină în următorul raport al componentelor, % mas.:

miere de albine	2...20
extract alcoolic de polen	2...20
extract alcoolic de propolis	2...25
extract alcoolic de <i>Callisia fragrans</i>	1...6
ceară de albine	1...6
lanolină	5...24
vaselină	18...68.

și unguentului antimicrobian care, conform variantei II, conține miere de albine, extracte alcoolice de polen, de propolis și de *Callisia fragrans*, polietilenglicol 1500 și polietilenglicol 400 în următorul raport al componentelor, % mas.:

miere de albine	2...20
extract alcoolic de polen	2...20
extract alcoolic de propolis	2...25
extract alcoolic de <i>Callisia fragrans</i>	1...6
polietilenglicol 1500	12...37
polietilenglicol 400	17...56.

Rezultatul invenției constă în obținerea unguentului antibacterian pe bază de produse apicole datorită alegerii a 5 ingrediente (miere, polen, propolis, ceară și extractul din *Callisia fragrans*) care dispun de proprietăți antimicrobiene, anestezice, trofice și stimulative a proliferației epitelului și creșterii țesutului granulocitar.

La fel, esența invenției constă în acțiunea cu efect antibiotic asupra majorității microorganismelor testate, mai ales asupra *E. coli* ATCC 25922, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25823, *Salmonella tiphimurium* 89, *E. faecalis* ATCC 8750, *Candida albicans* ATCC 8035. La tratarea animalelor cu unguent crește cicatrizarea plăgilor cu 2...4 zile, diminuează infectarea cu microflora microbiană cu 2...3 zile, se accelerează regenerarea țesutului cu 2 zile, se reduce numărul de aplicări până la 3 și numărul perioadelor de convalescență cu 4 zile comparativ cu tratarea clasică.

Propolisul – parte componentă a unguentului apidermic, – influențează pozitiv asupra proceselor ce se desfășoară în plăgi și dispune de proprietăți anestezice, antiinflamatorii, antibacteriene și acționează ca stimulator asupra proceselor regenerative în plăgi prin intensificarea proceselor de proliferare a epitelului, sporirea proceselor de granulație, limitarea creșterii cicatricelor, ameliorarea fluxului sangvino-limfatic.

Valoarea polenului constă în aceea că el conține glicozida rutină, valoarea biologică a căreia constă în optimizarea proceselor, ce se desfășoară în plăgi, manifestând o activitate bactericidă, ce completează proprietățile analogice ale mierii și propolisului.

Mierea este inclusă ca parte componentă a unguentului datorită manifestării proprietăților bactericide, antiinflamatorii, dezinfectante, precum și de stimulare a proceselor de regenerare a țesuturilor.

Callisia Fragrans este un stimulator puternic, cu un spectru larg de acțiuni terapeutice. În frunzele ei se conțin substanțe tanante, flavonoide (quercitină, camferol), acizii ascorbic și nicotinic, cantități mai sporite de calciu (Ca^{2+}) și un șir de micro- și macroelemente.

Callisia Fragrans posedă proprietăți anestezice, antiinflamatorii, imunoregulatorii. Exerciță un efect pozitiv asupra sistemului circulator.

Pregătirea extractelor. Extractul moale de propolis a fost preparat după metoda Brăileanu C., Gheorghiu A., Popescu Ar., Velescu Gh. Cercetări asupra unor forme farmaceutice cu propolis. Propolis (Ediția a IV-a revizuită și adăugită). Apimondia. București, 1990, p. 137-145.

1. Prepararea extractului de propolis

80 g de propolis se mărunțesc (sita II) și se introduc într-un cartuș celulozic, care apoi se trece într-un diacolator cilindric înalt de 35 cm, cu diametrul de 3,6 cm. Produsul se umectează cu lichid extractiv (alcool 70°) până când începe să curgă robinetul inferior deschis, iar deasupra amestecului se mai află un strat de lichid. Se închide robinetul și după 24 ore începe percolarea. În tot timpul extracției produsul este acoperit cu lichid extractiv, percolarea efectuându-se până la epuizarea propolisului de principiile active (1 g propolis, 6-8 ml alcool 70°).

2. Extractul alcoolic de polen din ghemotoc colectat de albine – 20 g sunt majorate și extrase cu alcool etilic (80 ml) la rece (timp de 72 ore). După filtrare alcoolul este evaporat (1 cm³ de soluție conține 115 mg de substanță uscată).

3. Extractul de *Callisia fragrans* a fost pregătit prin extragerea cu alcool etilic (70°), frunzele fiind măcinate în raport de 1:10. Conținutul substanței uscate într-un 1 cm³ este de 40 mg.

Pregătirea unguentului varianta I, pe extract de propolis, polen, *Callisia fragrans* și miere dispersată omogen și bază de unguent clasic vaselină-lanolină.

Extractele se dispersează în 40 g de bază de unguent (30 g vaselină și 10 g lanolină) în prealabil topite pe baie de apă și semisolidificate. După omogenizarea unguentului se adaugă restul de vaselină și se amestecă. Excipientul folosit curent în farmacii este vaselina cu adaos de 10% lanolină, ca agent de emulsionare.

Pregătirea unguentului varianta II, cu poliglicoli, extractele se încorporează într-o bază lavabilă. Baza este solubilă în apă, nu este grasă, aderă de epidermă și se poate ușor spăla cu apă. Componentele (poliaetilenglicoli) se încălzesc pe baie de apă la temperatura de 65°C și după fluidizare se amestecă la răcire. În acest excipient hidrosolubil s-au dispersat extractele necesare.

Au fost efectuate experiențe pentru determinarea eficacității terapeutice și dozei optime a extractelor (tab. 1, 2).

Analizând datele expuse în tabelul 1 se poate concluziona că efectul terapeutic al unguentului ce conține (% mas.): miere 2...20, extract de polen 2...20, extract de propolis 2...25, extract de *Callisia fragrans* 1...6, polietilenglicol 1500 12...37, polietilenglicol 400 17...56 (conținutul de substanță uscată în 1 g unguent de 3,1...145 mg) este mai înalt decât al linimentului de sintomicină – 1%.

Unguentul solicitat reduce numărul de proceduri până la 5...7 comparativ cu linimentum de sintomicină – 8...10.

La administrarea unguentului Apidermin, varianta II (hidrosolubil) în diferite doze ale extractelor în tratamentul plăgilor infectate se observă un efect terapeutic mai pronunțat comparativ cu linimentul de sintomicină – 1%, numărul procedurilor fiind redus până la 5...7 comparativ cu linimentul de sintomicină – 8...10 (tab. 2).

Unguentul obținut în baza hidrofilă se recomandă pentru folosirea în prima fază a tratamentului plăgilor purulente, în cazul când apare necesitatea de eliminare urgentă a conținutului plăgilor. Baza hidrofilă sporește esențial activitatea antibacteriană a unguentului, ceea ce contribuie la sporirea eficacității substanțelor active.

Exemplul 1. Elaborarea unei aprecieri a acțiunii antimicrobiene și antifungice a preparatului apidermin asupra tulpinilor tip din colecția Laboratorului de bacteriologie.

Etapale de cercetare. Controlul s-a efectuat organoleptic (vizual, olfactiv, senzorial). Controlul sterilității preparatelor prin metoda bacteriologică (metoda microscopică, metoda însămânțărilor pe mediile nutritive specifice organizate). Incubarea însămânțărilor s-a efectuat în termostat la temperatura 37°C, iar obținerea rezultatelor după 24 ore.

În urma studiului antibacterial al remediului dat s-a constatat că apiderminul acționează cu efect antibiotic asupra majorității microorganismelor testate, mai ales asupra *E. coli* ATCC 25922, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella tiphimurium* 89, *E. feccalis* ATCC 8750, *Candida albicans* ГИСК 8035 (tab. 3).

Exemplul 2. Studiarea eficacității remediului apidermin asupra tratării leziunilor corporale infectate. Investigațiile au fost efectuate pe parcursul anilor 2006-2008 în cadrul catedrei de Biotehnologii în Zootehnie a UASM. Partea experimentală s-a realizat în clinica veterinară a Societății de protecție a animalelor domestice și în clinica de creștere a câinilor „Extrenum” (mun. Chișinău).

Eficacitatea terapeutică a preparatului a fost studiată pe 114 câini bolnavi cu diagnozele: răni după prelucrarea chirurgicală – 6 animale (4,5%); abcese – 10 animale (8,9%); răni posttraumatice infecțioase – 28 animale (25%); ulcere trofice – 12 animale (10,7%); fracturi – 8 animale (7,1%); operații ce țin cont de cerințele standardului de rasă – 36 animale (32,1%), arsuri dermice – 14 animale (12,3%).

Câinii bolnavi apăruți în clinică cu diagnostic de plăgi infectate au fost divizați în 2 grupuri: experimental (15 animale) și martor (5 animale).

Pentru animalele din grupul experimental a fost prescris remediul apidermin, iar pentru lotul martor terapia clasică (soluție hipertonică - clorură de sodiu, linimentul de sintomicină – 1%).

Rezultatele eficacității terapeutice a remediului. Au fost folosite diverse metode: statutul clinic al animalelor bolnave în dinamică, s-au întreprins studii bactericide ale exsudatului din leziunile corporale în dinamică cu determinarea cantitativă și calitativă a conținutului investigațiilor citologice ale frotiurilor, aprecierea eficacității tratamentului în baza indicilor clinici al procesului în rană.

S-a constatat că microflora inițială din leziuni atât în grupul experimental, cât și în cel de control este mărită ($13 \cdot 10^8$... $14 \cdot 10^8$ anticorpi în 1 g de țesut al plăgii).

În urma studiului calitativ al microflorei conținutului exsudatului mai frecvent se evidențiază *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epider.* În monocultura obținută de la 2 animale (13,4%), în asociație cu alte microorganisme, stafilococii au fost depistați la 13 animale bolnave (86,6%). La 8 animale (61,5%) s-au depistat stafilococi în asociație cu *Ps. aeruginosa*. La 3 animale bolnave (23%) s-a depistat *St. aureus* în asociație cu *E. coli*. La 2 animale (15,4%) din exsudat s-au depistat *St. aureus* în asociație cu streptococi.

La etapa inițială a procesului în plagă, atât în grupul experimental, cât și în cel de control măsurile au fost îndreptate spre lichidarea infecției și neutralizarea produselor toxice din țesuturi și a toxicozelor microbiene.

Eficacitatea terapeutică a preparatului apidermin poate fi lămurită prin prisma eficacității antibacteriene. Luând în considerație conținutul microflorei până la tratament ($13 \cdot 10^8$ și $14 \cdot 10^8$ în grupul martor), în grupul experimental deja la a 3-a zi dezvoltarea microflorei patogene din exsudatul plăgilor dispărea. În grupul de control de asemenea se observă o scădere a numărului de microorganisme în plagă (de la $14 \cdot 10^8$ până la $14 \cdot 10^6$), dar rămâne încă la un nivel înalt.

A existat o perfectă concordanță între evoluția clinică a animalelor bolnave și rezultatul analizelor de laborator (dispariția microflorei patogene din exsudatul plăgilor).

Astfel înlăturarea edemului reacției de inflamare are loc după $2,73 \pm 0,12$ Lim (variația indicilor individuali ai animalelor) 2...3 zile față de grupul experimental cu $4,8 \pm 0,23$ Lim 4...5 zile în grupul de control ($P < 0,001$). Eliberarea plăgilor de conținut în grupul experimental la $2,67 \pm 0,13$ Lim 2...3 zile comparativ cu în grupul martor la $4,4 \pm 0,14$ Lim 4...5 ($P < 0,01$). Apariția granulațiilor în grupul experimental se înregistrează la $2,93 \dots 0,12$ Lim 3...4 zile, pe când grupul martor la $5,8 \dots 0,23$ Lim 5...6 zile ($P < 0,001$) (tab. 4).

Începutul dezvoltării epitelului în grupul experimental are loc la $6,3 \pm 0,6$ Lim 5...7 zile comparativ cu grupul martor $9,5 \pm 0,7$ Lim 8...10 zile ($P < 0,01$). Viteza de cicatrizare a răni (%/zi) în grupul experimental este de $12,3 \pm 0,3$ Lim 11...14%, pe când în grupul martor de $9,46 \pm 0,27$ Lim 9...10% ($P < 0,001$).

S-a stabilit că durata vindecării la animalele bolnave din grupul experimental alcătuiește $8,1 \pm 0,4$ Lim 7...9 zile comparativ cu grupul martor $10,5 \pm 0,7$ Lim 9...12 ($P < 0,01$), ceea ce denotă că preparatul solicitat micșorează durata tratamentului cu 3,0 zile.

Exemplul 3. Studiarea eficacității terapeutice a aplicației locale a unguentului apidermin în complex tratamentului arsurilor dermice.

Investigațiile au fost efectuate pe 12 câini înregistrați cu diagnoza arsuri de gradul II și III. În grupul experimental a fost aplicat remediul apidermin, pe când la lotul martor - linimentul balsamic al lui Vișnevski.

Pe parcursul tratamentului au fost întreprinsă investigarea bacteriologică a bioptatelor și frotiurilor - amprentă a exsudatului de plagă după metoda Pocrovski și Makarov, desăvârșită de Ștreinberg.

Pentru studiul dinamicii schimbărilor morfologice ale exsudatului de plagă și a stării proceselor generative s-au efectuat investigații asupra proceselor, ce se desfășoară la suprafața plăgii.

Pe parcursul studiului evaluării indicelui calitativ al populației microbiene s-a constatat că până la tratare 1 g de țesut infectat la animalele din grupul experimental conținea $(3,06 \pm 0,4) \cdot 10^8$ microbi, la animalele din grupul martor - $(2,8 \pm 0,1) \cdot 10^8$. Indicii obținuți atestă un înalt grad de infectare ($P < 0,01$) a rănilor atât la animalele din grupul experimental, cât și la martor.

La cea de a 5-a zi de tratament al animalelor, conținutul (populația) microorganismelor în țesuturile infectate la animalele bolnave din grupul experimental, la care a fost aplicat apiderminul, s-a micșorat cu $(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$ celule/g, comparativ cu nivelul înalt la animalele din grupul martor - $(2,94 \pm 0,3) \cdot 10^6$ ($P < 0,001$).

La cea de a 10-a zi a tratamentului de infectare a arsurilor la animalele din grupul experimental s-a diminuat până la $(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^2$ celule/g de țesut, pe când în grupul martor a fost mai înalt - $(2,3 \pm 0,4) \cdot 10^5$ ($P < 0,01$).

La cea de a 20-a zi a tratamentului rezultatele obținute de la animalele din grupul experimental creșterea coloniilor nu a fost înregistrată boala, pe când în grupul martor, indicele de infectare a rănilor a fost de $(1,6 \pm 0,12) \cdot 10^5$ celule/g ($P < 0,001$).

Dinamica schimbărilor fondului microbial al plăgi corespunde cu schimbarea indicilor clinici ai plăgilor animalelor din grupurile experimental și martor.

La animalele bolnave din grupul experimental la care au fost aplicat local apidermin, cicatrizarea decurgea mai accelerat în comparație cu grupul martor. La animalele din grupul experimental la cele $10,14 \pm 0,42$ Lim 9...11 zile a avut loc respingerea escarelor de arsură (tab. 5).

Studiile indicilor citologici ai amprentelor plăgilor la animalele din grupul experimental au indicat o tendință clară de diminuare a numărului de neutrofile și sporirea poliblastelor, ceea ce mărturisește despre activizarea proceselor regenerative.

La cele $18,7 \pm 0,33$ Lim 17...19 zile plăgile animalelor din grupul experimental s-au epitelizat. Însănătoșirea s-a finisat la cea de a 20-a Lim 18...21 zi.

La animalele din grupul martor, la care local s-a aplicat linimentul după Vișnevski, respingerea escarelor provocată de arsură a avut loc cu reținere la $12,2 \pm 0,15$ Lim 13...13 zile, epitelializarea plăgilor la $23,6 \pm 0,39$ Lim 21...25 zile, însănătoșirea - la $24,8 \pm 0,29$ Lim 24...25 zile, adică cu 5 zile mai târziu comparativ cu animalele din grupul experimental ($P < 0,05$).

Rezultatele obținute în urma tratării animalelor bolnave cu arsuri corporale denotă că aplicarea locală a preparatului apidermin sporește esențial cicatrizarea plăgilor, diminuează infectarea cu microfloră bacteriană, accelerează regenerarea proceselor în plagă cu 3...6 zile

Efectul terapeutic al remediei se explică prin acțiunea particularităților lui antimicrobiene și stimulative de regenerare.

Anexă

Tabelul 1

Eficacitatea terapeutică a aplicației locale a unguentului apidermin liposolubil (variante I) cu diferite doze ale extractelor în tratamentul plăgilor infectate

Miere, %	Extract de polen, %	Extrat de propolis, %	Extract de Callisia fragrans, %	Ceară flavă, %	Lanolină, %	Vaselină	Nr. de bolnavi	Nr. de proceduri
2	2	2	1	1	24	68	3	7,0
5	5	10	2	2	15	61	3	6,2
10	10	20	5	5	10	40	3	6,8
20	20	25	6	6	5	18	3	7,2
Martor	Liniment de sintomicină						3	8,8

Tabelul 2

Eficacitatea terapeutică a aplicației locale a unguentului apidermin, varianta II (hidrosolubil) cu diferite doze ale extractelor în tratamentul plăgilor infectate

Miere, %	Extract de polen, %	Extrat de propolis, %	Extract de Callisia fragrans, %	Polietilenglicol 1500	Polietilenglicol 400	Nr. de bolnavi	Nr. de proceduri	
2	2	2	1	37	56	3	7,3	
5	5	10	2	33	50	3	7,2	
10	10	20	5	22	33	3	7,4	
20	20	25	6	12	17	3	7,9	
Martor	Liniment de sintomicină						3	8,6

Tabelul 3

Comportamentul unor tulpini microbiene din colecția laboratorului față de preparatul Apidermin

Tulpina testată	Dezolvarea preparatelor	Pregătirea diluțiilor tulpinilor						
		10-9	10-8	10-7	10-6	10-5	10-4	10-3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1:10	+	+	+	+	+	+	+
	1:100	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	1:10	+	+	+	+	+	+	+
	1:100	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1:10	+	+	+	+	+	+	+
	1:100	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella tiphimurium</i> 89	1:10	+	+	+	+	+	+	+
	1:100	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> ATCC 8750	1:10	+	+	+	+	+	+	+
	1:100	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ГИКС	1:10	+	+	+	+	+	+	+
	1:100	+	+	+	+	+	+	+

Unde: + sensibil; - rezistent; dezolvarea preparatelor – pregătirea diluanților preparatelor utilizate 1:10, 1:100 în bulion nutritiv de carne, t° =70°C; pregătirea diluției tulpinilor tip, prin titrare consecutivă în volumul 1:10 bulion nutritiv de carne după standardul 5 unități: 10-9; 10-8; 10-6; 10-5; 10-4; 10-3, la temperatura camerei.

Tabelul 4

Eficacitatea terapeutică a aplicării unguentului la tratarea rănilor purulente

Nr.	Denumirea indicilor	Unități de măsură	Indicii		P
			Lotul experimental (n=15)	Lotul martor (n=15)	
1	Înlăturarea edemului	Zile	27,3±0,12	4,8±0,23	P<0,001
2	Eliberarea plăgilor de conținutul microbilor patogeni	Zile	2,67±0,13	4,4±0,14	P<0,001
3	Apariția granulației	Zile	2,93±0,12	5,8±0,23	P<0,001
4	Începutul dezvoltării epitelului	Zile	6,3±0,6	8,5±0,7	P<0,01
5	Viteza de cicatrizare a plăgii	%/zi	12,3±0,3	9,46±0,27	P<0,001
6	Numărul de aplicații ale manipulațiilor de tratament	o dată	6,13±0,18	8,8±0,42	P<0,01
7	Perioadele de convalescență	Zile	8,1±0,4	10,5±0,7	P<0,01

n – numărul de animale

Tabelul 5

Eficacitatea terapeutică a aplicației locale a unguentului în tratamentul plăgilor după arsuri

Nr.	Specificare	Indici		Autenticitatea (P)
		Martor (n=5)	Experiment (n=7)	
1	Respingerea escarelor provocate de arsură (zile)	10,2±0,15	10,14±0,2	<0,01
		Lim 12-13	9-11	
2	Epitelizarea plăgii (zile)	23,6±0,39	18,7±0,33	<0,01
		Lim 21-25	17-19	
3	Însănătoșirea animalelor (zile)	24,8±0,29	20,2±0,30	<0,05
		Lim 24-25	18-21	

n – numărul de animale;

Lim – variația indicilor individuali ai animalelor