

На правах рукописи

*Казakov*



003493463

**КАЗАКОВ ВЛАДИМИР ИВАНОВИЧ**

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ  
ЛЕВОТИЛА ПРИ КОЛИБАКТЕРИОЗЕ ТЕЛЯТ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

16.00.04 – ветеринарная фармакология с токсикологией.

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Краснодар- 2010

Работа выполнена в лаборатории терапии ГНУ Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт и ГНУ Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии.

- Научные руководители:** доктор ветеринарных наук  
**Басова Наталья Юрьевна**
- доктор ветеринарных наук, профессор  
**Шабунин Сергей Викторович**
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Терехов Владимир Иванович**  
кандидат ветеринарных наук  
**Поветкин Сергей Николаевич**
- Ведущая организация:** **Донской государственный аграрный университет**

Защита состоится «28» января 2010 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220.038.07. при ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет» по адресу: 350044, г.Краснодар, ул.Калинина, 13.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»

Автореферат размещен на официальном сайте ФГОУ ВПО «Кубанский ГАУ» <http://www.kubsau.ru> «25» декабря 2009 г.

Автореферат разослан «26» декабря 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор вет. наук



Родин И.А.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1. Актуальность темы.** В настоящее время возрастает значение фармакопрофилактики и лечения болезней молодняка сельскохозяйственных животных в связи с появлением инфекций со сложной этиологией, обусловленной повышением вирулентности условно-патогенных микроорганизмов. Часто эти болезни имеют общую симптоматику поражения дыхательных путей или пищеварительного тракта, приобретают характер смешанных инфекций, отличающихся от классических форм проявления той или иной болезни с осложненным течением. (В.А.Мищенко с соавт., 2000, 2001).

В специализированных хозяйствах, особенно в межхозяйственных предприятиях, широкое распространение получили желудочно-кишечные болезни молодняка, на долю которых приходится до 80% общей заболеваемости (В.П.Иноземцев с соавт.,1997, 2000). Комплексное изучение их этиологии показало, что на фоне нарушения технологии получения и выращивания молодняка, возбудителями диарей у телят являются энтеропатогенные и энтеротоксигенные эшерихии, псевдомонады, энтеробактеры, протей, стрептококки, сальмонеллы и др. (А.Г. Шахов 1999; О.В. Вавина с соавт. 1999; А.Ф. Иванов 1999; В.В. Субботин, М. А. Сидоров,2004).

Огромный экономический ущерб, причиняемый животноводческим хозяйствам желудочно-кишечными заболеваниями, вызывает необходимость поиска путей и методов совершенствования и изыскания новых эффективных средств в их профилактике и лечении.

В комплексе мероприятий по борьбе с желудочно-кишечными болезнями бактериальной этиологии у молодняка сельскохозяйственных животных широкое применение нашли такие химиотерапевтические средства, как сульфаниламиды, антибиотики, нитрофураны и др. (В.Ф. Ковалев с соавт., 1988; А.В. Голиков с соавт., 1994; Н.Т. Климов с соавт., 2000; И.П.Кондрахин,2003). Однако длительное и бессистемное применение их в животноводстве привело к появлению резистентных штаммов микроорганизмов (М.И. Немченко, 1987; И.Х. Рахмонов, 1988; А.Г.Шахов с соавт.,1996).

Одним из путей, повышающих эффективность лечения животных и уменьшающих расхода лекарств, при этом, является создание комплексных препаратов. Известно, что широкий спектр антимикробной активности препаратов, как правило, достигается путем комбинирования нескольких лекарственных субстанций на базе одной или нескольких групп химических веществ. При этом сочетание различных химических структур в композиции позволяет достичь синергидного эффекта и получить препараты с новыми полезными свойствами. (М.Д. Машковский,1998; С.В.Шабунин, 1999; Т.Н.Ракова, 1999).

В связи с этим перспективным является создание комплексных препаратов пролонгированного действия, обладающих широким спектром антимикробной активности и высокой эффективностью при лечении желудочно-

кишечных заболеваний бактериальной этиологии у молодняка крупного рогатого скота.

**1.2. Цель и задачи исследований.** Целью настоящей работы является разработка, изучение фармако-токсикологических свойств нового антибактериального препарата левотил, клиническое изучение препарата при лечении колибактериоза у молодняка крупного рогатого скота.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Изучить распространение желудочно-кишечных болезней телят.
2. Изучить этиологическую структуру желудочно-кишечных болезней у телят и чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам;
3. Разработать состав и лекарственную форму пролонгированного композиционного препарата левотил;
4. Изучить антимикробную активность левотила;
5. Изучить фармако-токсикологические свойства левотила;
6. Изучить терапевтическую эффективность левотила при колибактериозе у телят;
7. Разработать нормативную документацию по контролю и применению левотила.

**1.3. Научная новизна.** Разработан и экспериментально обоснован состав нового препарата левотил на основе левомицетина и тилозина, изучены его фармако-токсикологические свойства, разработано применение, определена его эффективность при терапии желудочно-кишечных болезней бактериальной этиологии у телят.

**1.4. Практическая значимость и внедрение.** Изучена этиологическая структура желудочно-кишечных болезней телят. Разработан и изучен новый комплексный антибактериальный препарат для лечения желудочно-кишечных болезней бактериальной этиологии у телят – левотил. Разработаны методы контроля его качества, схемы применения и определены оптимальные дозы левотила, сроки возможного убоя животных после лечения левотилом. Разработана и утверждена в установленном порядке нормативная документация на левотил (Технические условия, Временное наставление по применению препарата при желудочно-кишечных болезнях бактериальной этиологии у телят № 001051-ОП от 25.05.2002 г.)

#### **1.5. Основные положения, выносимые на защиту:**

- распространение желудочно-кишечных болезней телят;
- этиологическая структура желудочно-кишечных болезней телят;
- разработка и обоснование состава препарата левотил;

- фармако-токсикологические свойства левотила;
- терапевтическая эффективность левотила при колибактериозе телят.

#### **1.6. Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены:

- на 4-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции», Москва, 2002 г.;

- на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях», Воронеж, 2002 г.;

- на заседаниях научно-технического совета научно-производственного предприятия «Агрофарм» 2000-2002 г.г.;

- на заседании Ветфармсовета Департамента ветеринарии (протокол №2 от 12 апреля 2000 г.).

**Публикации.** Основные материалы диссертации опубликованы в 7 статьях, в том числе 1 в издании, рекомендованном ВАК РФ.

**1.8. Структура и объем диссертационной работы.** Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста в компьютерном варианте и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований, заключения, выводов, практических предложений. Список литературы содержит 191 источник, в том числе 45 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 51 таблицей, 5 рисунками.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа выполнена в 2000-2007 годах в Всероссийском НИВИ патологии, фармакологии и терапии, ГНУ Краснодарский НИВИ.

Экспериментальные и научно-производственные опыты проведены в соответствии с требованиями к врачебно-биологическому эксперименту по подбору аналогов, постановке контроля, соблюдению одинаковых условий кормления и содержания животных в период проведения работы и учета результатов (И.Т.Фролов, 1965). При постановке опытов были использованы токсикологические, фармакологические, физиологические, клинические, биохимические, морфологические, иммунологические и другие методы исследований.

В лабораторных и клинических опытах использовано 178 белых мышей с массой тела 18-22 г, 284 белых беспородных крысы с массой тела 170-250 г, 10 морских свинок с массой тела 250-300 г, 25 кроликов с массой тела 2,5-3,0 кг, а также 527 телят 5-10-дневного и 2,0-2,5-месячного возраста.

Анализ заболеваемости и отхода крупного рогатого скота проводили по данным ветеринарной отчетности РФ и Краснодарского края.

Бактериологические исследования – общепринятыми методами согласно «Методическим указаниям по диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» (1999), «Методическим указаниям по диагностике колибактериоза животных и птицы» (2000), «Методическим указаниям по лабораторной диагностике стрептококкоза животных» (1990). Чувствительность выделенных культур к антимикробным препаратам – методом диффузии в агаровом геле (среда АГВ) с использованием дисков, лунок. Оценку чувствительности осуществляли по диаметру зоны ингибиции роста тест-культуры.

Изучение оптимального соотношения компонентов в левотиле в опытах *in vivo*, общего действия на организм и лечебной эффективности препарата при желудочно-кишечных болезнях бактериальной этиологии у телят проведены в специализированных хозяйствах по выращиванию крупного рогатого скота.

Изучение оптимального соотношения компонентов композиции левомицетина и тилозина, определение синергидности комбинаций *in vitro* проводили определением активности препарата с различным соотношением компонентов методом серийных разведений, вычислением и сравнением фракциональной ингибирующей концентрации (ФИК) и суммы ФИК (ФИК-индекс). Антимикробную активность левотила изучали методом серийных разведений *E.coli*, типированных по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам. Минимальную бактериостатическую концентрацию (МБСК) выявляли в мясопептонном бульоне, минимальную бактерицидную концентрацию (МБЦК) – путем посева из пробирок с МПБ на плотные питательные среды. Содержание микробных клеток в одном мл среды составляло 200 тыс., рН мясопептонного агара и мясопептонного бульона составляла 7,2-7,6. Результаты опытов учитывали в течение 7 суток.

Общетоксические свойства левотила оценивали путем определения острой и субхронической токсичности, возможных побочных свойств и отдаленных последствий в соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве», утвержденными ГУВ СССР и «Методическими рекомендациями по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии», одобренных секцией отделения ветеринарной медицины РАСХН (1998).

Изучение острой токсичности левотила проводили на белых мышах и крысах общепринятыми методами (М.П. Беленький, 1963; И.В. Саноцкий, 1970; О.Н. Елизарова, 1971). Исследуемый препарат вводили перорально и подкожно. Во время клинических наблюдений учитывали внешний вид, поведение, потребление корма, изменение массы тела, динамику морфологического и биохимического состава крови.

На основании гибели животных от применения разных доз исследуемых соединений методом интегрирования по Беренсу (1929) устанавливали: абсолютно смертельную дозу ( $LD_{100}$ ) и максимально переносимую дозу (МПД). Значения  $LD_{16}$  и  $LD_{34}$ , найденные по характеристической кривой, построенной на основании интегральных данных, использованы для определения коэффициентов вариабельности смертельных доз.

Подострую токсичность левотила изучали на белых крысах при длительном подкожном введении препарата в дозах, в 3 и в 5 раз превышающих ориентировочно-терапевтическую. Препарат вводили ежедневно в течение 21 суток. Наблюдение за клиническим состоянием животных вели на протяжении 31 суток от начала опыта. Определение массы тела у всех животных проводили до начала введения препарата, а также на 7, 14, 21, 31 сутки. На 21 сутки от начала введения левотила и на 31 сутки от начала опыта у 3 животных из каждой группы определяли относительную массу (коэффициенты) внутренних органов – головного мозга, печени, почек, легких, сердца, селезенки, надпочечников и семенников (В.М.Гацура, 1974).

Изучение кумулятивных свойств левотила проводили на 20 белых крысах с массой тела 180-200 г по методу Лима (И.В.Саноцкий, И.П.Уланова, 1975).

Оценку результатов проводили по Ю.С. Кагану и В.В. Станкевичу (1974).

Местное действие проверяли на кроликах путем однократного и многократного применения препарата на кожу, а также конъюнктивальной пробой (Г.А. Хмельницкий, 1987). Изучение кожно-резорбтивного действия левотила проводили на кроликах методом накожных аппликаций при однократном и многократном нанесении и втирании. Для выявления резорбции препарата с поверхности кожи кроликов использовали метод с трипановым синим. Кожно-резорбтивное действие изучали на белых мышах и крысах методом погружения хвоста в раствор препарата, аллергенность левотила с помощью конъюнктивальной (Г.П.Трубецкая, 1976) и кожно-провокационной проб (О.Л.Алексеева, Л.А. Дуева, 1978) при накожной аппликации и выявлению аллергического энтерита, изотонической дегидратации и изучению содержания гистамина в тонкой кишке при пероральном введении препарата.

Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия левотила проведено по методике А.П. Шицковой с соавт. (1977) на самках белых крыс массой  $220,0 \pm 20,0$  г. Раннюю и позднюю резорбцию, общую эмбриональную смертность, выживаемость подсчитывали по формулам, предложенным А.М. Малашенко и И.К. Егоровым (1977). В целях выявления патологии внутренних органов эмбрионов материал фиксировали в жидкости Боуэна и 70° спирте. Аномалии скелета выявляли по методу Даусона (1984).

Влияние левотила на качество мясопродуктов проведено с использованием слепого метода по 9-ти бальной шкале для органолептической оценки качества вареного мяса и бульона, разработанного ВНИИМП (1985).

Исследования по фармако-токсикологической и клинической оценке эффективности применения левотила при лечении колибактериоза телят про-

ведены в условиях животноводческих комплексов. Структура опытов представлена по тексту.

Общее действие препарата при внутримышечном применении телятам оценивали по клиническому состоянию, морфологическим, биохимическим и иммунологическим показателям крови. Кровь для исследования брали у телят из яремной вены в утреннее время до кормления. В крови и сыворотке определяли количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, лейкограмму – общепринятыми методами, общий белок – рефрактометрически, фракции белка – по Оллу и Маккорду (С.А. Карпюк, 1962) или электрофорезом в агарозном геле. В сыворотке крови определяли бактерицидную активность (О.В. Смирнова, Т.А.Кузьмина, 1966), комплементарную активность (Г.Ф. Вагнер, 1963), содержание лизоцима (О.В. Бухарин с соавт., 1974), циркулирующие иммунные комплексы (Д.В.Белокриницкий, 1987), общие иммуноглобулины набором фирмы «Ляхема», концентрацию общих липидов, триглицеридов, мочевины, глюкозы, креатинина, активность аспартат – и аланинаминотрансферазы (АсАТ и АлАТ), щелочной фосфатазы – наборами фирмы «Ляхема», билирубин – набором фирмы «Коне» (Финляндия), молочную кислоту – по Н.С.Балаховскому, Ю.В. Надточину (1973), пировиноградную кислоту по П.М. Бабаскину (1976), холестерин – по В.В. Меньшикову (1973).

Определение левомицетина в биологическом материале проводили методом, описанным Д.С. Гров и В.А. Рендалл (1958) с некоторыми модификациями. В частности, для диазотирования использовали 0,5% раствор монокалиевой соли 2-амино-8-нафтол-2, 4-дисульфокислоты. Поглощение окрашенного раствора определяли на спектрофотометре СФ-26 или СФ-46 при  $\lambda$ -520 нм. При использовании указанного реактива минимальная концентрация левомицетина была менее 1 мкг/мл или 1 мкг/г. Калибровочный график строили по стандартному образцу левомицетина с активностью 985 мкг/мг, полученному в ВГНКИ вет. препаратов.

Определение содержания тилозина проводили микробиологическим методом диффузии в агар. При проведении исследований руководствовались "Методическими указаниями по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства" № 3049-84 от 29.06.84. Приготовление тест-культур, приготовление микробной взвеси, агаризованных сред и буферных растворов, приготовление основного и промежуточных растворов стандарта антибиотика и построение стандартной кривой (В.Ф. Ковалев с соавт., 1988). Тест-микроб *M.luteus* ATCC 9341 был получен в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича. Определение содержания тилозина проводили в надосадочной жидкости. Сыворотку крови и мочу закапывали в лунки чашек Петри без предварительной обработки.

Определение стабильности левотила при хранении препарата проводили в соответствии с требованиями технических условий. При проведении анализа использован рабочий стандартный образец тилозина основания по РСО 9347-191-00494185-99 с содержанием активного вещества 1002 ЕД/мг и

рабочий стандартный образец левомицетина по РСО 9348-008-00494189-00 с содержанием активного вещества 993 мкг/мг.

Экономическая эффективность применения левотила рассчитана в соответствии с «Методикой экономической эффективности использования в сельском хозяйстве результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, новой техники и рационализаторских предложений», М., 1980, а также «Методикой определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий». – М., 1982.

Статистическая обработка полученных данных проведена методами математической статистики (Г.Ф.Лакин,1973; Е.В.Гублер,1978), а также с использованием прикладных программ «STATGRAPHICS» и «QUATTRO PRO» на PC «Pentium 200 MMX».

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1. Распространение болезней органов пищеварения крупного рогатого скота**

Анализ данных ветеринарной отчетности свидетельствует о высокой заболеваемости КРС в РФ. В период 2001-2005 годы ежегодно заболело 4631100 – 9988700 голов крупного рогатого скота, в среднем – 7523980 в год.

Ежегодный падеж крупного рогатого скота в РФ 403100 - 722000 голов или 2,8%– 3,9% к обороту стада, в том числе молодняка – 235500 – 405500 голов или 1,1% – 2,7% к обороту стада.

Основными заболеваниями животных являются болезни органов пищеварения, доля которых составляет 36,9%.

Наиболее подвержен болезням молодняк. В 2005 году в РФ заболело 3615300 телят или 86,5% к полученному приплоду и 55,8% - ко всему заболевшему поголовью, в т. ч. болезнями органов пищеварения – 35,8% к приплоду или 50,4% к заболевшему молодняку. Отход по этой причине составил 52,7% от всего павшего молодняка, а вынуждено убито – 95300 телят или 23% от числа заболевших. Наиболее часто заболевают и гибнут телята до месячного возраста, в период развития острых расстройств органов пищеварения. В возрасте младше месяца заболевает 69,7% телят, а падеж в этой возрастной группе составляет 64,6% от числа павших телят. В возрасте старше 30 дней эти показатели снижаются до 30,3% и 35,4% соответственно.

В Краснодарском крае в 2005-2007 годах заболеваемость крупного рогатого скота колебалась в пределах 51,2%- 52,9%, или ежегодно заболело 346900-400200 животных. За период 2005-2007 годы болезнями органов пищеварения ежегодно заболело 102800 – 113300 телят или 28,02% – 29,6% (28,64%±0,49), а отход по этой причине колебался в пределах 46,9% – 49,6% от числа павших.

Ежегодный падеж крупного рогатого скота от болезней органов пищеварения за последние 3 года в крае составил 48,27%±0,78, а вынужденный убой – 46,02%±0,16. В РФ регистрируется высокая смертность телят от инфекционных болезней бактериальной этиологии..

Наиболее часто у телят регистрируют колибактериоз. Ежегодно колибактериозом заболевает 14300 – 19600 телят или 36,4 – 45,3% от заболевших инфекционными болезнями, летальность от колибактериоза колеблется в пределах 35,6 – 38,9%.

В Краснодарском крае инфекционными болезнями бактериальной этиологии (согласно данным ветеринарной отчетности) ежегодно переболевает 3150 – 3367 телят, или 1,19 – 1,25% к получаемому приплоду, а летальность составляет в среднем 21,3 – 21,5%. Наиболее часто регистрируется колибактериоз – 51,9 – 52,1%. Летальность телят при колибактериозе достигает 23,9 – 24,9%.

У новорожденных телят при диареях, как правило, в 95 – 98% случаев регистрируют смешанное течение болезни: колибактериоз и стрептококкоз, колибактериоз и псевдомоноз, УП бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и псевдомоноз, УП бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и стрептококкоз.

### 3.2. Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней телят и чувствительность возбудителей к антимикробным препаратам.

Изучив видовой состав бактерий, выделенных от больных диарейными заболеваниями новорожденных телят, установили, что наиболее часто из патологического материала, полученного от павших и вынужденно убитых животных, изолировали микроорганизмы кишечной группы - 44 изолята или 56,4%. В том числе *E. coli* – 24,3%, *P. mirabilis* – 8,9%, микроорганизмы рода *Klebsiella* – 10,3%.

Стрептококки были выделены в 28,2% случаев, стафилококки – 7,7%, как и *P. aeruginosa*. В видовом аспекте преобладали так же *E. coli* – 24,3% от всех видов выделенных бактерий.

При изучении серологической структуры эшерихий, выделенных от больных диареей новорожденных телят установили, что адгезивные антигены присутствовали у 36,8% выделенных культур. У 14% присутствовали антигены А-20, 10,5% - К-88, в 5,3% - *E. coli* F-41 и 3,5% - P987. Характерный для телят адгезивный антиген К-99 выявлен у 3,5% культур.

При изучении серологических вариантов *E. coli* по карпускулярному антигену установили наличие 8 серологических вариантов. Наиболее часто изолировали вариант  $O_1$  – в 15,8%, реже – в 12,3% случаев  $O_{20}$ ,  $O_{111}$ , и  $O_{115}$  в 10,5%, вариант  $O_{18}$  – 8,8%,  $O_{33}$  выделяли в 5,3% и  $O_{78}$  - 1,7%, а не типировались имеющимися в наличии сыворотками 20 культур или 35,1%. 79% выделенных культур *E. coli* были патогенны для белых мышей.

При определении чувствительности культур 8 родов к 30 фармакологическим антимикробным препаратам установили широкое распространение среди микроорганизмов, вызывающих желудочно-кишечные болезни телят, антибиотикорезистентных культур. Из 30 протестированных антимикробных препаратов, входящих в группы, наиболее часто применяемых при терапии желудочно-кишечных болезней телят: пенициллины, тетрациклины, цефалоспорины, нитрофураны, аминогликозиды, стрептомицины, левомицетин, макролиты, производные хиноксалина и оксихинолина, комплексные препа-

раты, только 5 были активны в отношении всех культур *E. coli* – ципрофлоксацин, офлаксацин, тилазин, леномак, леводиоксид. По отношению к *Proteus* ssp. были активны только 4 препарата, к *Ps. aeruginosa* – 7, *Streptococcus* ssp. – 8. Только 2 препарата – офлоксацин и тилозин были активны по отношению ко всем тестируемым культурам.

Активность левомицетина колебалась в пределах  $12,80 \text{ мм} \pm 2,56 - 19,00 \text{ мм} \pm 0$ , тилозина –  $14,67 \text{ мм} \pm 1,33 - 24,13 \text{ мм} \pm 0,98$ .

Из тестированных микроорганизмов не было выявлено родов и видов, абсолютно, на 100% устойчивых к левомицетину и тилозину.

Наиболее активными в отношении выделенных от телят, больных диарейными заболеваниями, бактерий оказались комплексные препараты.

### **3.3. Состав, физико-химические свойства, получение левотила и оптимального соотношения левомицетина и тилозина**

На основании проведенных исследований, был сконструирован новый комплексный препарат – левотил, содержащий в качестве действующих веществ левомицетин (5,0%), тилозин основание (5,0%), спирт бензиловый, а также пролонгаторы – полиэтиленоксид 400 – 20,0 г и 1,2 пропиленгликоль – до 100,0 мл.

Препарат представляет собой вязкую прозрачную жидкость светло-зеленоватого цвета.

Стабильность левотила изучалась на трех сериях препарата (031002, 041102 и 010103) при естественном хранении в хорошо укупоренной таре в сухом защищенном от света месте при температуре от  $5^{\circ}\text{C}$  до  $10^{\circ}\text{C}$  в течение одного года. Установлено, что при хранении препарата в течение одного года качественные и количественные показатели отвечают требованиям технических условий.

Изучение различных соотношений левомицетина с тилозином в отношении кишечной палочки – *Escherichia coli* (A-20/0<sub>8</sub>), сальмонеллы – *Salmonella dublin*, стрептококка - *Streptococcus faecalis* показало, что наиболее выраженным антимикробным действием в отношении изученных штаммов микроорганизмов обладает комбинация в соотношении: левомицетина – 5,0; тилозин – 5,0. Минимальная бактериостатическая концентрация (МБСК) данной комбинации в отношении *Salmonella dublin* и *Streptococcus faecalis* составила 3,1 мкг/мл, а в отношении *Escherichia coli* (A-20/0<sub>8</sub>) – 6,25 мкг/мл и превосходила МБСК, как составных частей комбинации (левомицетина, тилозина), так и комбинаций с другими соотношениями компонентов.

#### **3.3.1. Антимикробная активность левотила**

Фракционная ингибирующая концентрация (ФИК) левомицетина оптимальной комбинации в опыте со *Staphylococcus aureus* составила 0,008, тилозина – 0,01, а сумма фракциональных ингибирующих концентраций (ФИК-индекс) – равнялся 0,018, ФИК левомицетина в опыте с культурой *Escherichia coli* (A-20/0<sub>8</sub>) составил 0,008, тилозина – 0,011. ФИК-индекс ком-

бинации в опыте с культурой *Escherichia coli* (A-20/0<sub>8</sub>) равнялся 0,019. ФИК левомицетина в опыте с культурой *Staphylococcus aureus* составила 0,04, тилозина – 0,02; ФИК-индекс составил 0,024.

Для лечения больных колибактериозом телят применяли левотил в дозе 0,3 мл/кг массы тела с интервалом между введениями 48 часов до исчезновения клинических признаков заболевания. Назначение левотила уменьшает срок лечения животных, больных колибактериозом на 14,3% по сравнению со сроками лечения левотилом с другими соотношениями компонентов (таблица 1).

Таблица 1 - Эффективность применения левотила с различным соотношением левомицетина и тилозина при лечении колибактериоза у телят

Показатели	Соотношение левомицетина и тилозина		
	6:4	5:5	4:6
Количество животных, гол.	50	51	49
Продолжительность лечения, дней	4,3±0,3	3,6±0,4	4,1±0,4
<u>Выздоровело, гол.</u>	<u>43</u>	<u>47</u>	<u>42</u>
%	86,0	92,2	85,7
<u>Осталось больными, гол.</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>4</u>
%	8,0	3,9	8,2
<u>Пало, гол.</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
%	6,0	3,9	6,1
Лечебная эффективность, %	86,0	92,2	85,7

В группе телят, которым для лечения колибактериоза применяли левотил с оптимальным соотношением компонентов, выздоровело 92,2% животных, в тоже время в двух других группах лечебная эффективность препарата составила 86,0% и 85,7%, а падеж животных составил 3,9% и 6,0%, 6,1%.

В результате проведенных исследований было установлено, что после однократного введения препарата левомицетин и тилозин обнаруживали в сыворотке крови уже через один час после введения, максимальная концентрация достигалась к 3 часу. Терапевтическая концентрация обоих компонентов сохранялась в крови в течение 48 часов.

### 3.4.Токсикологические свойства левотила

Острую токсичность левотила изучали на белых мышах и крысах. Группы животных формировали по принципу парных аналогов, учитывая массу тела (у мышей - 18-20г, у крыс - 180-210г), развитие и клиническое состояние. Препарат вводили однократно внутрь в дозах от 5,0 до 30,0 мл/кг массы тела в объеме 0,6 мл на мышь и 6,0 мл на крысу (дозы являются предельно допустимыми по объему для перорального введения). За весь период наблюдения (14 дней) гибели опытных животных зарегистрировано не было. Патоморфологическое изучение по окончании эксперимента не выявило на-

рушений в структурной организации внутренних органов животных, участвующих в эксперименте.

Среднелетальную дозу -  $LD_{50}$  левотила при пероральном введении определить не удалось. Левотил относится к IV классу опасности – малоопасные вещества (ГОСТ 12.1.007-76). При подкожном способе введения в двух повторностях в диапазоне доз от 2,5 до 9,0 мл/кг массы тела, дозой левотила, являющейся максимально переносимой, является доза 2,5 мл/кг ( $LD_0$ ). Доза 6,19 мг/кг массы тела для белых мышей и 5,51 мг/кг массы тела для белых крыс, вызвавшая гибель 50% животных, является среднесмертельной и соответствует  $LD_{50}$ . Доза 9,0 мг/кг массы тела, является абсолютно смертельной для обоих видов лабораторных животных и соответствует  $LD_{100}$ .

Подострую токсичность левотила изучали на белых крысах при длительном подкожном введении препарата в терапевтической дозе, а также дозах, в 3 и в 5 раз превышающих терапевтическую.

В результате проведенных исследований отмечено, что длительное (21 сутки), внутримышечное применение левотила в дозах 0,3; 0,9 и 1,5 мл/кг массы тела животного не вызывает существенных изменений в клиническом состоянии лабораторных крыс. При проведении патоморфологических исследований у лабораторных животных как опытных, так и контрольной групп, макроскопически не было выявлено отклонений и особенностей в строении внутренних органов. Введение препарата животным в меньших дозах (0,3 и 0,9 мл/кг массы тела) не вызвало выраженного изменения относительной массы внутренних органов.

При исследовании крови животных, получавших левотил в дозе 0,3 мл/кг массы тела, не отмечено достоверных изменений в морфологическом составе крови, биохимических показателях и показателях иммунного статуса по сравнению с показателями в крови животных контрольной группы.

Изучение субхронической токсичности левотила в дозах 0,3 и 0,9 мл/кг массы тела, проведенное на 24-х телятах 2-х месячного возраста не оказывает заметного влияния на морфобиохимические и иммунологические показатели телят.

Для изучения кумулятивных свойств левотила препарат вводили белым крысам в течение 28 дней подкожно с начальной дозой 0,10 от  $LD_{50}$ . Дозы левотила - 70,53 мл/кг не вызвали гибели животных. Учитывая, что полученные дозы составляют 12,8  $LD_{50}$ , возможный коэффициент кумуляции превышает 12, что, согласно классификации кумулятивного действия (Медведь Л.И. с соавт., 1968) определяет левотил как вещество со слабо выраженной кумуляцией.

Однократное нанесение левотила на кожные покровы кроликов при плотности аппликации от 0,020 до 0,10 мл/см<sup>2</sup>, не вызывает повреждения кожи в виде эритемы или ее отеков, что позволяет ответную реакцию организма оценить как отрицательную. При определении раздражающих свойств препарата при внутрикожном методе введения кроликам установлено, что через 30 минут после введения красителя левотил оказывал слабое раздра-

жающее действие, через 60 и 180 минут раздражающее действие препарата было умеренным, через 4 часа – слабым, а через 5 часов отсутствовало.

В опытах установлено, что 20-ти кратная аппликация левотила на кожные покровы крыс не вызывает гибели животных, не нарушает целостности кожи на месте нанесения, не нарушает функционирования организма животных, что свидетельствует об отсутствии кожно-резорбтивного действия левотила.

Результаты опытов по изучению аллергенных свойств левотила проведенные на белых крысах в чистом виде при накожном применении и сенсибилизирующего действия – на морских свинках, свидетельствуют, что препарат не обладает алергизирующими свойствами.

Установлено, что левотил в дозе 0,3 мл/кг массы тела не оказывает отрицательного влияния на процессы овуляции и эмбриогенеза. Препарат не оказывает влияния на продолжительность беременности. Уродств, аномалий развития внутренних органов и скелета не обнаружено. Терапевтичным действием левотил не обладает.

Исследования влияния терапевтических доз левотила на качество мясопродуктов, проведенных на кроликах, свидетельствуют, что левотил в дозе 0,3 мл/кг массы тела не влияет отрицательно на качество и вкусовые особенности мяса животных.

### 3.6. Фармакологические свойства левотила

Изучение фармакокинетики левотила проведено по определению содержания левомицетина и тилозина в органах, тканях и биологических жидкостях телят, а также по определению остаточных количеств составляющих препарата (левомицетина и тилозина) в организме животных.

С этой целью были подобраны 17 телят 2,0-2,5-месячного возраста с массой тела 60-80 кг, которым внутримышечно однократно вводили левотил в дозе 0,3 мл/кг массы тела. Через 3, 6, 12, 24, 48 часов после введения препарата проводили забой 3-х подопытных животных. Через 3 и 48 часов осуществлялся забой и по одному контрольному теленку, которым препарат не вводили. Как видно из данных, представленных в таблице 3, через 3 часа после применения препарата, левомицетин в разной степени обнаруживается в органах и тканях. Бактериостатическая концентрация антибиотика в крови сохраняется в течение 48 часов, достигая максимума через 3 часа после инъекции. Максимальная концентрация в почках и печени наблюдается через 6 часов.

Следовательно, терапевтическая концентрация действующих веществ левотила при применении его в дозе 0,3 мл/кг массы тела однократно сохраняется до 48 часов. Бактериостатическая концентрация тилозина также сохраняется на протяжении 48 часов, достигая максимума через 3 часа после введения препарата. Наивысшая концентрация тилозина в почках и печени установлена через 12 часов после введения (5,12 и 4,72 мкг/г соответственно).

Таблица 2 - Содержание левомицетина и тилозина в органах и тканях телят после введения левотила в дозе 0,3 мл/кг массы тела

Биосубстрат	Содержание левомицетина (мкг/г/мл) через, часов				
	3	6	12	24	48
Кровь	3,07±0,105	2,91±0,154	2,84±0,043	2,44±0,102	1,34±0,082
Печень	0,99±0,114	2,19±0,269	3,04±0,332	2,87±0,089	1,62±0,244
Почки	2,34±0,131	4,13±0,106	5,39±0,147	5,25±0,096	2,39±0,261
Мышцы	0,11±0,031	0,26±0,124	0,92±0,106	1,07±0,104	0,00±0,000
Моча	1,57±0,217	4,55±0,149	4,74±0,200	4,58±0,226	3,42±0,096
Сод. толсто-го кишечн.	0,80±0,078	1,46±0,131	2,33±0,135	2,37±0,125	2,02±0,145
	Содержание тилозина (мкг/г/мл), через, часов				
	3	6	12	24	48
Кровь	5,24±0,311	4,40±0,083	4,35±0,320	3,20±0,521	1,52±0,208
Печень	3,09±0,301	4,24±0,167	5,12±0,183	4,05±0,469	2,32±0,061
Почки	2,32±0,243	2,96±0,205	4,72±0,144	3,92±0,101	1,96±0,046
Мышцы	0,00±0,000	0,24±0,038	0,61±0,215	0,84±0,069	0,00±0,000
Моча	0,72±0,061	4,12±0,349	4,56±0,189	5,20±0,302	1,84±0,183
Сод. толсто-го кишечн.	0,96±0,183	3,99±0,450	4,57±0,301	4,52±0,288	3,84±0,205

Проведенные исследования по изучению остаточных количеств компонентов левотила (левомицетин, тилозин) в органах, тканях и биологических жидкостях телят после 5-ти кратного применения препарата, позволяют с полной уверенностью установить срок ожидания для левотила по всем компонентам – 7 суток.

### 3.7. Эффективность применения левотила

Для лечения больных колибактериозом телят левотил применяли в дозах 0,15 мл/кг; 0,3 мл/кг; 0,6 мл/кг массы тела с интервалом между введениями 48 часов до исчезновения клинических признаков заболевания. Лечебную эффективность различных доз левотила оценивали по количеству выздоровевших телят в течение 14 дней со дня начала курса лечения.

В группе, где левотил применяли в дозе 0,15 мл/кг, исчезновение клинических признаков заболевания наступило на 7 день лечения и отмечено у 48 голов, что составило 75%. В группе, где левотил применяли в дозе 0,3 мл/кг, исчезновение клинических признаков заболевания наступило на 4 сутки лечения и отмечено у 60 голов, что составило 92,3%. В группе, где левотил применяли в дозе 0,6 мл/кг, исчезновение клинических признаков заболевания наступило на 4 сутки лечения и отмечено у 59 голов, что составило 92,2%.

Левотил в дозе 0,3 мл/кг обладает значительным терапевтическим эффектом, количество выздоровевших животных составило 92,3%, в то время как при дозировке 0,15мл/кг – 75,0%, что на 17,3% ниже.

При дальнейшем повышении дозировки до 0,6мл/кг лечебный эффект существенно не увеличился, что говорит об экономической необоснованности применения левотила в дозе 0,6мл/кг.

Таким образом, оптимальной терапевтической дозой левотила при лечении колибактериоза телят, является доза 0,3мл/кг.

Изучение терапевтической эффективности левотила проводили в трех сериях опытов в хозяйствах Белгородской, Воронежской областей и Краснодарского края на телятах 2-10 дневного возраста, больных колибактериозом в сравнении с зинапримом и байтрилом. Животным опытной группы (25 голов) при лечении применяли левотил внутримышечно в дозе 0,3 мл/кг живой массы один раз в сутки с интервалом 48 часов. При тяжелом течении болезни препарат вводили трехкратно с интервалом между введениями 24 часа. Телятам контрольной группы препараты вводили в дозах и кратности, согласно наставлениям по их применению. За животными вели ежедневное клиническое наблюдение в течение 10-15 дней, при этом учитывали общее состояние, падеж, скорость роста, сроки выздоровления.

Левотил обладает более высокой терапевтической эффективностью по сравнению с зинапримом и байтрилом. При его применении клиническое улучшение (прекращение диарей) и улучшение аппетита наступало чаще всего через 3-4 дня лечения. В контрольной группе клинические признаки заболевания исчезали обычно на 4-5 день лечения. При применении левотила значительно снижался падеж телят - с 26,3 %, в контрольной группе до 8,0 %, при применении зинаприма и с 26,5% в контрольной группе до 7,7% - в опытной - байтрилом. Лечение животных левотилом не снижает эритропоз, гемопоз. Снижение относительного количества нейтрофильных гранулоцитов свидетельствует о затухании воспалительной реакции. Нормализуется белковый обмен и активизируется фагоцитоз. Среднесуточный прирост массы тела у телят опытной группы был выше на 24,7%.

Левотил является эффективным средством для лечения колибактериоза у телят.

Экономический эффект применения левотила при колибактериозе у телят составляет 15,69 рублей на 1 рубль затрат.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Желудочно – кишечные болезни телят широко распространены в РФ и ЮФО. Ежегодно ими заболевает только в Краснодарском крае 28,3 – 29,6% от приплода. Отход от болезней органов пищеварения составил: падеж - 48,27%±0,78, вынужденный убой – 46,02%±0,16 от количества погибших телят. Наиболее часто у телят регистрируют колибактериоз. Ежегодно колибактериозом заболевает 14300 – 19600 телят, летальность телят от колибактериоза колеблется в пределах 35,6 – 38,9%,

2. Видовой состав бактерий, изолированных от больных диареей телят широк, включает 19 видов. Наиболее часто, в 24,3% выделяли *E. coli*, в том числе патогенных - 79%. Адгезивные антигены присутствовали у 36,8% выделенных культур. У 14% - А-20, 10,5% - К-88, в 5,3% - *E. coli* F-41 и 3,5% - P987, К-99 выявлен у 3,5% культур. Из корпускулярных антигенов наиболее часто выявляли  $O_1$  - в 15,8%. Выделенные культуры *E. coli* высоко резистентны к антимикробным препаратам: только 5 из 30 антибиотиков были активны в отношении всех культур *E. coli*.

3. Разработан новый комплексный инъекционный препарат левотил для лечения желудочно-кишечных заболеваний бактериальной этиологии у телят, в состав которого входят левомицетин и тилозин, растворенные в полиэтиленоксиде-400 и 1,2-пропиленгликоле. Препарат представляет собой вязкую жидкость с удельным весом 1,19 г/см<sup>3</sup> от темно-желтого до красновато-желтого цвета, без запаха, горького вкуса. Стабилен в течение 12 месяцев хранения. Фракциональная ингибирующая концентрация (ФИК-индекс) тилозина с левомицетином в левотиле в соотношении 5:5 составляет 0,018-0,024, что указывает на высокую синергидность компонентов препарата.

4. Левотил обладает широким спектром антимикробной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, основных возбудителей желудочно-кишечных болезней телят, с минимальной бактериостатической концентрацией левотила 3,12-12,5 мкг/мл.

5. Комплексный антибактериальный препарат на основе левомицетина и тилозина по параметрам острой токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности - вещества малоопасные: среднетлетальную дозу - LD<sub>50</sub> левотила при пероральном введении определить не удалось, т.к. как при введении препарата в максимально возможных объемах 0,6 мл - белым мышам и 6,0 мл - белым крысам, не отмечалось гибели животных. LD<sub>50</sub> левотила при подкожном введении составила для мышей 6,19 мл/кг, а для белых крыс - 5,51 мл/кг массы тела.

6. Внутримышечное введение левотила в дозе, превышающей в 5 раз терапевтическую, белым крысам в течение 14 дней повышает нагрузку на почки и печень животных и частично проявляет нефротоксическое и гепатотоксическое действие при отсутствии клинических признаков интоксикации. Коэффициент по методу Лима превышает 12. Левотил не обладает эмбриотоксическим и тератогенным свойствами. Не оказывает отрицательного влияния на продолжительность беременности и плодовитости крыс, не вызывает уродств, аномалий развития внутренних органов и скелета плодов, не обладает кожно-раздражающим и кожно-резорбтивным действием. Многократные аппликации левотила на кожу кроликов в течение 14 дней не выявили аллергенных свойств препарата. По токсикологической оценке препарат относится к малоопасным веществам - 4 класс токсичности.

Многократное внутримышечное применение левотила телятам в дозах, равной терапевтической, 3-х и 5-тикратно превышающей терапевтическую дозу, не оказывает негативного влияния на клиническое состояние, поведение и аппетит животных, не снижает скорости роста телят. Длительное применение

ние левотила в течение 15 суток клинически здоровым телятам не оказывает отрицательного влияния на морфологические и иммунобиохимические показатели крови, улучшает эритропоэз, повышает уровень общего белка и, особенно, гамма-глобулинов.

Левотил не оказывает отрицательного влияния на качество мяса и мясопродуктов. Убой животных на мясо возможен через 10 дней после прекращения применения препарата.

7. Лечебная эффективность левотила при колибактериозе телят при внутримышечном введении в дозе 0,3 мл/кг массы тела один раз в сутки с интервалом 48 часов составляет 92%. Экономический эффект применения левотила при колибактериозе у телят составляет 15,69 рублей на 1 рубль затрат.

## 5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Левотил для терапии колибактериоза телят следует применять внутримышечно в дозе 0,3 мл/кг массы тела один раз в сутки с интервалом 48 часов. При тяжелом течении болезни препарат вводят трехкратно с интервалом между введениями 24 часа.

2. Разработано Временное наставление по применению левотила в ветеринарии (Утверждено Главным управлением ветеринарии Минсельхоза России за № 001051-ОП от 25.05.2002 г.)

## 6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Казаков В. И. Разработка комплексного препарата левотил и его антимикробная активность /В.И. Казаков Л.Ю. Сошнина // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях Матер. Междунар. науч.- практ. конференции. - Воронеж, 2002.- С.287-288.
2. Казаков В. И. Эффективность левотила при колибактериозе поросят и телят /В.И.Казаков// Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Матер, Междунар. науч.- практ. конференции. - Воронеж, 2002.- С.288-289.
3. Казаков В.И. Фармакокинетика левотила / В.И.Казаков Г.А. Вострилова, П.А Паршин.// Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Матер, Междунар. науч.- практ. конференции. - Воронеж, 2002.- С.290
4. Казаков В.И. Токсикометрическая характеристика комплексного антимикробного препарата левотил /В.И. Казаков П.А. Паршин// Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Матер, Междунар. науч.- практ. конференции. - Воронеж, 2002.- С.291-292.

5. Казаков В.И. Токсические и кумулятивные свойства левотила /В.И.Казаков П.А. Паршин.//Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно – санитарного контроля сельскохозяйственной продукции, Матер, IV междунар. науч.- практ. конференции. - Москва, 2002.- С.28-29.
6. Казаков В.И. Влияние левотила на качество мясопродуктов / В.И.Казаков // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно – санитарного контроля сельскохозяйственной продукции, Матер, IV Междунар. науч.- практ. конференции.- Москва, 2002.- С.29-30.
7. Казаков В.И. Фармако-токсикология и лечебная эффективность левотила /В.И.Казаков //Ветеринарная патология.-2007.- N 2.- С.202-205.