

На правах рукописи



003487084

НИЖЕГОРОДОВ МАКСИМ ЮРЬЕВИЧ

**«Фармако-токсикологическая оценка и эффективность
тилоколина при лечении колибактериоза телят»**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

1 0 ДЕК 2009

Воронеж – 2009

Работа выполнена в отделе фармакологии ГНУ Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии

- Научный руководитель:** доктор биологических наук
Вострилова Галина Анатольевна
- Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук
Бригадиров Юрий Николаевич
доктор ветеринарных наук
Жолобова Инна Сергеевна
- Ведущая организация:** ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» Россельхознадзора МСХ РФ (Казань)

Защита состоится «28» декабря 2009 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ДМ 006.004.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии (ВНИВИПФиТ) по адресу: 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИВИПФиТ

Автореферат разослан «23» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н., доцент



Ермакова Т.И.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Важным условием в системе мероприятий по обеспечению населения продуктами питания является увеличение производства молока и мяса. Выполнение поставленных задач требует интенсификации отрасли молочного скотоводства. Важнейшей задачей при этом является сохранность молодняка, поскольку уже в первые часы жизни телятам угрожает инфицирование возбудителями многих бактериальных и вирусных болезней (С.И. Плященко с соавт., 1987; В.П. Иноземцев, 1988; К.В. Степанов, 1990; Н.А. Сидоров, В.В. Субботин, 1998; В.И. Терехов, 2000).

В современных условиях массовые желудочно-кишечные болезни новорожденных телят причиняют большой ущерб животноводству, состоящий из высокого уровня падежа телят и расхода средств при лечении больных (С.И. Джупина, 2002; В.Ф. Лысов с соавт., 1988). Согласно литературным данным гибель телят в последние годы составляет 12-25% (Ю.Н. Алехин с соавт., 1995; А.Л. Буланкин, 1996; П.Н. Сисягин с соавт., 1991).

Высокая концентрация поголовья, иммунодефицитное состояние новорожденных телят, несоблюдение основных принципов ветеринарно-санитарного режима при их выращивании способствует возникновению и развитию в хозяйстве колибактериоза (А.С. Каврук, 1993; Л.И. Ефанова, 1994, 1995; Б.Т. Артемов; Л.И. Ефанова, 1997; Э.А. Светоч с соавт., 1997, 1999; Л.С. Каврук с соавт., 1999).

Таким образом, перед ветеринарной наукой стоит ряд задач по получению здорового приплода с высокой резистентностью и реактивностью, путем совершенствования технологических систем на животноводческих комплексах и специализированных фермах. С другой стороны – разработка наиболее эффективных средств и методов профилактики и терапии болезней животных, в частности молодняка (В.И. Касюк, 1990; А.И. Ануфриев с соавт., 1992; П.П. Голышенков, 1993; А.Г. Шахов с соавт., 1995, 2001; Л.И. Ефанова, 1997).

Важными направлениями современной химиотерапии бактериальных инфекций является предотвращение или замедление развития резистентности микроорганизмов, а также борьба с уже сформировавшейся лекарственно устойчивой микрофлорой.

Выходом из создавшегося положения является рациональное использование надежных и безопасных с токсикологической точки зрения, антибактериальных средств, и в первую очередь комплексных антимикробных средств с минимальным влиянием на микрофлору кишечника (В.Т. Самохин, 1987; М.И. Немченко, 1988; В.Ф. Лысов, 1988; А.Г. Шахов с соавт., 1995; М.А. Костына с соавт., 1997; В.Д. Соколов, 1997).

Комплексные антимикробные средства, содержат в своем составе несколько антибактериальных веществ различной фармакологической природы и, соответственно, обладающих различными избирательными антибиотическими свойствами. Терапевтическая широта таких препаратов достигается многокомпонентностью, а выраженная антимикробная активность - синерги-

ческим или аддитивным эффектом (С.М. Кузнецов, 1983; В.П. Шуклин, 1997; С.В. Шабунин, 1999, W. Bolanowska, T. Gessner, 1978).

Разработка пролонгированных форм антибактериальных препаратов предпочтительнее, чем нативных, так как длительное удержание рабочих концентраций антибиотиков в крови, тканях и органах сокращает количество инъекций за курс лечения, тем самым, обеспечивая предупреждение или уменьшение развития токсического или побочного действия препаратов (С.М. Кузнецов, 1983; С.М. Навашин, 1982; П.П. Достоевский, 1986).

При этом особое внимание должно быть обращено на то, что входящие в состав комплексного препарата ингредиенты не должны взаимодействовать друг с другом в разработанной лекарственной форме и сохранять стабильность в период всего срока хранения препарата.

Цель и задачи исследований. Разработать оптимальный состав нового комплексного антибактериального препарата тилоколин, провести его фармако-токсикологическую оценку и разработать показания по его применению.

Для достижения общей цели решали следующие основные задачи:

- Экспериментально обосновать состав и разработать лекарственную форму нового комплексного антибактериального препарат тилоколин;
- Изучить антимикробную активность тилоколина в опытах *in vitro* и *in vivo*;
- Провести токсикометрическую оценку препарата (острая, хроническая, субхроническая токсичность, раздражающее, аллергизирующее действие, кумулятивные свойства);
- Изучить фармакокинетику и определить остаточные количества компонентов тилоколина в организме телят;
- Изучить терапевтическую эффективность тилоколина при лечении колибактериоза телят;
- Разработать показания к применению тилоколина при терапии колибактериоза телят.

Научная новизна. Впервые на основе изучения антимикробной активности в опытах *in vitro* и *in vivo* и фармакокинетических параметров экспериментально обоснован состав и разработан новый комплексный пролонгированный антибактериальный препарат тилоколин на основе колистина и тилозина. Изучены его фармакотоксикологические свойства, определены параметры токсичности препарата, а так же установлено отсутствие возможных отдаленных последствий после его применения. Изучена эффективность применения тилоколина при терапии желудочно-кишечных болезнях телят бактериальной этиологии. Получена приоритетная справка на изобретение «Препарат для лечения колибактериоза у молодняка сельскохозяйственных животных» №2008127112 от 03.07.2008 г.

Практическая значимость работы. Результаты проведенных исследований послужили основанием для разработки нового комплексного анти-

бактериального препарата для лечения желудочно-кишечных заболеваний телят, технологии его промышленного производства и контроля качества, которые в соответствии с широкими производственными испытаниями вошли в нормативно-техническую документацию на препарат (Инструкция по применению тилоколина и технические условия по изготовлению и контролю опытной партии тилоколина за номером ТУ 9337-028-00482909-09), согласованные с Главным государственным ветеринарным инспектором по Воронежской области.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены, обсуждены и одобрены на научно-практической конференции фармакологов РФ, посвященной 85-летию со дня рождения проф. Рабиновича М.И. (Троицк, 2007), международной научно-производственной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения проф. Спирюхова И.А. (Пенза, 2007), международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА (Ульяновск, 2008), международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию ветеринарии Курской области (Курск, 2008), международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях» (Воронеж, 2008).

Публикации. Основные научные результаты, включенные в диссертацию, опубликованы в 7 печатных работах, в том числе 1 статья в журнале «Ветеринария и кормление», рекомендованном ВАК Минобразования РФ.

Основные положения, выносимые на защиту:

- научное обоснование состава нового комплексного антибактериального препарата на основе тилозина и колистина;
- результаты изучения острой и хронической токсичности тилоколина в опытах на лабораторных животных и телятах;
- результаты изучения фармакокинетики тилозина и колистина и определения сроков выведения остаточных количеств антибиотиков из организма телят после применения препарата;
- результаты определения терапевтической эффективности тилоколина при колибактериозе телят;
- практические предложения по применению комплексного антибактериального препарата на основе тилозина и колистина.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований внедрены в ООО "Новая деревня" Липецкого района Липецкой области и СПК "Староникольское" Хохольского района Воронежской области.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 132 страницах и включает: введение, обзор литературы, материал, объем и методы исследований, результаты собственных исследований, их обсуждение, выводы, предложения, список литературы и приложения. Диссертационная работа проиллюстрирована 34 таблицами и 6 рисунками. Список литературы включает 218 источников, в том числе 88 на иностранных языках.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2006-2009 г.г. в отделе фармакологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН в соответствии с планом научно-исследовательских работ по заданию 08.04.01. «Разработать методы ранней диагностики, эффективные средства и способы профилактики и лечения массовых незаразных и вызываемых условно-патогенными микроорганизмами заболеваний у молодняка высокопродуктивных животных» (№ гос. рег. 15070.3666026906.06.8.001.2), программа фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации Россельхозакадемии на 2006-2010 г.г.

В проведении ряда исследований принимали участие сотрудники ВНИВИ патологии, фармакологии и терапии Г.А. Востроилова, Л.В. Ческидова, А.В. Топольницкая, В.В. Чернов, А.А. Михайлов, С.Н. Кабицкий, А.Г. Шахов, Ю.Н. Бригадиров, Л.Ю. Сашнина, С.М. Сулейманов, В.И. Шушлебин и другие, которым автор выражает искреннюю признательность за оказанную помощь и плодотворное сотрудничество.

Лабораторные и опытные образцы препарата тилоколин изготовлены в отделе фармакологии ВНИВИФит Россельхозакадемии.

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). Перед экспериментом животные выдерживались в течение 2 недель в карантинных условиях на стандартном пищевом рационе (И.П. Западнюк с соавт., 1983). Для опытов животных брали в эксперимент после внутригрупповой адаптации. Доступ к воде и корму был свободным, световой режим естественным.

При выполнении работы проводили токсикологические, физико-химические, гематологические, биохимические, иммунологические исследования с применением современных методов.

В опытах было использовано следующее количество животных: беспородные белые мыши обоего пола массой 18-22 г – 256 гол.; беспородные белые крысы обоего пола массой 160-220 г – 200 гол.; морские свинки обоего пола массой 270-310 г белого цвета или имеющих крупные белые пятна на боках туловища – 24 гол.; кролики массой 2,2-3,1 кг – 18 гол.; телята массой 45-50 кг – 163 гол. Клинические испытания препарата в производственных условиях проведены на телятах массой тела 45-50 кг.

Изучение антимикробной активности и оптимального соотношения компонентов в препарате тилоколин проводились *in vitro* методом серийных разведений (В.И. Антонов с соавт., 1986, В.Ф. Ковалев с соавт., 1988, М.А. Сидоров с соавт., 1995). В качестве тест-культур использовали референтные и полевые (патогенные) штаммы микроорганизмов - возбудителей желудоч-

но - кишечных болезней телят, типированных по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам.

МБсК изучаемых препаратов определяли методом серийных разведений в мясопептонном бульоне (МПБ); МБцК – путем посева из пробирок с прозрачной средой на плотные питательные среды (МПА), не содержащие препарат.

Кроме того, был определен индекс специфической защиты тилоколина на модели эшерихиозной инфекции белых мышей с массой тела 18-20 г. Перед заражением животных определяли минимальную 100%-ю летальную дозу (DLM) суточных культур микроорганизмов. Мышей заражали взвесью бактерий внутрибрюшинно. Тилоколин вводили внутримышечно. Для определения специфичности гибели лабораторных животных проводили бактериологическое исследование крови, взятой из камер сердца, а также легких, печени, селезенки и почек.

Острую и хроническую токсичность оценивали в соответствии с «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве», утвержденными ГВУ СССР (1991), аллергенную активность - в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке аллергенных свойств фармакологических средств» (1988), эмбриотоксическую и тератогенную активность - в соответствии с «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств» (1997).

Изучение острой токсичности препаратов проводили общепринятыми методами (М.П. Беленький, 1963; И.В. Саноцкий, 1970) на белых мышках (240 гол.) и белых крысах (96 гол.) при однократном пероральном, подкожном и внутримышечном введении. После введения препарата за опытными животными вели постоянное наблюдение на протяжении первого дня. В последующие 14 дней состояние животных отмечали один раз в сутки. Регистрировали общий статус и поведение животных, состояние нервно-мышечных и вегетативных функций, шерстного покрова, поедание корма, потребление воды и времени наступления токсикоза и гибели.

Хроническую токсичность тилоколина изучали на белых крысах (80 гол.) и белых мышках (80 гол.) в дозах 1/20, 1/10 и 1/5 от LD₅₀. Препарат вводили ежедневно внутримышечно в течение 20 суток. Наблюдение за клиническим состоянием животных вели на протяжении 30 дней от начала опыта. Определение массы тела у всех животных проводили до начала введения препарата и подекадно. На 10-е, 20-е и 30-е сутки от начала введения препаратов определяли относительную массу (коэффициенты) внутренних органов крыс – печени, почек, легких, сердца, селезенки, тимуса, надпочечников и семенников (В.М. Гацура, 1974).

Для выявления возможного токсического действия препарата на организм животных на 10, 20 и 30 сутки от начала опыта на 10 мышках каждой группы проводили определение детоксицирующей функции печени с помощью гексеналовой пробы (С.В. Сперанский, 1980). Гексенал вводили внутримышечно в дозе 60,0 мг/кг массы тела в виде 0,2% водного раствора. Тест

проводили в условиях тишины и теплового комфорта (23⁰С). Эффект гексена оценивали по длительности утраты гравитационного рефлекса (бокового положения головы). В эти же сроки на других 10 мышах каждой группы изучали общекомпенсаторные реакции организма с помощью функциональной пробы плаванием (В.И. Гацура, 1974).

Влияние тилоколина на моторно-эвакуаторные функции желудка и кишечника изучали на самцах белых мышей (19-21,0 г) - по 6 мышей в каждой группе. В первой серии экспериментов тилоколин вводили животным внутримышечно в дозах 0,03 и 0,15 мл/кг (1/50 и 1/10 дозы от LD₅₀, установленной в остром опыте) однократно за 1 час до постановки тестов, во второй серии опытов препарат вводили в тех же дозах, один раз в сутки в течение 10 дней. Контрольным животным вводили физиологический раствор. (В.С. Бузлама с соавт., 2007).

Тест на эвакуаторную функцию желудка проводили на крысах-самцах методом Brodie. Для этого крысам после 18-часового голодания (с исключением копрафагии) в желудок вводили по 1 мл 35% суспензии сульфата бария на 15% водном растворе ПВП. Через 18 минут после введения индикатора животных умерщвляли, извлекали желудок, его содержимое смывали на предварительно взвешенный фильтр и после высушивания его до постоянного веса определяли массу остатка. По разнице между введенным количеством индикатора и остатка оценивали моторно-эвакуаторную функцию желудка.

Тест на моторно-эвакуаторную функцию кишечника проводили по той же методике. Индикатор вводили внутрь в дозе 1мл. Убой животных проводили через 18 минут после введения индикатора. Извлекали кишечник. Измеряли расстояние от пилоруса до переднего фронта индикатора и длину всего кишечника. Величину транзита определяли по процентному соотношению первой длины ко второй. Кроме этого взвешивали содержимое слепой и толстой кишок.

Раздражающее действие тилоколина на кожу изучали в опытах на кроликах (при нанесении препарата в дозах 0,02-0,12 мл/см²). Площадь нанесения составляла 80-82 см² (5% от общей поверхности тела животных). За два дня до эксперимента тщательно выстригали шерсть на спине, избегая механических повреждений кожных покровов. Экспозиция препарата составляла 4 часа, после чего кожу аккуратно протирали ватным тампоном, смоченным дистиллированной водой. Реакцию кожи на воздействие препарата оценивали через 1 и 16 часов после однократного нанесения.

Учитывали функциональные нарушения кожи, характеризующиеся появлением различной степени выраженности эритемы, отека, трещин, изъязвлений, изменением температуры тела.

При определении раздражающих свойств препарата при внутрикожном способе введения проводили в опыте на 2 кроликах. Предварительно выстриженный участок кожи делили на 6 полей площадью 20 см². В центре 3 полей каждого кролика вводили тилоколин. Препарат вводили внутрикожно в объеме 0,3 см³. Через 20 минут после введения внутривенно вводили 1% раствор трепанового синего в дозе 1 см³/кг массы тела кролика. Через 30, 60

и 180 минут после введения красителя оценивали окраску кожных зон в местах инъекции тилоколина по 8-бальной системе.

Для изучения влияния тилоколина на слизистую глаза в конъюнктивный мешок правого глаза каждому кролику, закапывали однократно тилоколин в объеме 0,05 мл, а в левый глаз, который служил контролем закапывали физиологический раствор в таком же объеме. Через 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 и 6 часов после инстилляций препарата учитывали клиническое состояние организма животных (температуру тела, частоту пульса, количество дыхательных движений), а также изменение кровенаполнения конъюнктивы, наличие лакримации и выделений, состояние роговицы и век, оценивая согласно схеме, приведенной в таблице 1.

Таблица 1

Балльная система оценки раздражающего действия препарата на конъюнктиву глаза кроликов

Интенсивность реакции	Оценка в баллах	Раздражающий эффект
Нет реакции	0	Отсутствует
Слабая реакция	2	Слабый
Выраженная реакция	4	Умеренный
Лакримация	6	Слабо выраженный
Наличие выделений	8	Выраженный
Отек век	10	Сильно выраженный

Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия проведено по методике А.П. Шицковой с соавт. (1977) на самках белых крыс массой $210,0 \pm 10,0$ г. Фазу полового цикла устанавливали путем исследования вагинального содержимого. Первым днем беременности считали день обнаружения спермиев после подсадки самцов к самкам. На 19-20 день беременности оценивали состояние матки, плацент и плодов, равномерность расположения плодов в рогах матки, подсчитывали количество желтых тел беременности. Раннюю и позднюю резорбцию, общую эмбриональную смертность, выживаемость рассчитывали 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). Критериями оценки эмбриотоксического и тератогенного действия препарата служили показатели гибели зародышей на пред- и постимплантационных стадиях развития (эмбриотоксический эффект), наличие аномалий развития внутренних органов и скелета (тератогенный эффект), уровень плодовитости, масса зародышей.

Аллергизирующие свойства тилоколина изучали согласно Методическим рекомендациям, разработанным в НИИ медицины труда АМН РФ по единой схеме постановки токсикоаллергических экспериментов.

Исследование аллергенных свойств препарата проведено на морских свинках-аналогах массой тела 300-350 г, обоего пола белого цвета или имеющих крупные белые пятна на боках туловища, с использованием реакции специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) и реакции специфической агломерации лейкоцитов (РСАЛ). РСАЛ учитывается по величине отношения

процента агломерации лейкоцитов в опытном мазке (АО) к проценту агломерации лейкоцитов в контрольном мазке (АК), при этом реакция считается положительной, если процент агломерированных лейкоцитов в опыте выше или ниже показателя агломерации в контроле в 1,5 раза.

Показатель РСЛЛ рассчитывали по формуле:

$$\text{РСЛЛ \%} = \frac{\text{Лк} - \text{Лоп}}{\text{Лк}} \times 100, \text{ где}$$

Л – количество лейкоцитов

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

С целью характеристики общего состояния животных при проведении модельных опытов общепринятыми методами, описанными в соответствующих руководствах (И.П. Кондрахин с соавт., 2004) в крови определяли количество эритроцитов ($10^{12}/\text{л}$); гемоглобина (г/л); СОЭ (мм/ч); лейкоцитов ($10^9/\text{л}$); тромбоцитов ($10^9/\text{л}$). Фракции белка определяли электрофорезом в агарозном геле, концентрацию общего белка, липидов и билирубина наборами фирмы «Vital Diagnostics», концентрацию мочевины, фосфора, холестерина, глюкозы, креатинина, кальция, активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (АсАТ и АлАТ), щелочной фосфатазы и γ -глутамилтрансферазы – на биохимическом анализаторе «Hitachi-902».

Определение тилозина и колистина проводили микробиологическим методом диффузии в агар, основанном на сравнении величин зон задержки роста, образуемых испытуемым биоматериалом и стандартными образцами антибиотиков известной концентрации.

При проведении исследований руководствовались «Методическими указаниями по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства» №3049-84 от 29.06.84 г. Приготовление тест-культур, микробной взвеси, агаризованных сред и буферных растворов, основного и промежуточных растворов стандартов антибиотиков и построение стандартных кривых проводили по методикам, описанным в справочнике «Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии» (Ковалев В.Ф. с соавт., 1988).

Навески органов и тканей вырезанные из средней части образца, очищали от фасций, серозных оболочек, измельчали ножницами, а затем микроизмельчителем тканей с последующим растиранием в ступке со стерильным кварцевым песком. Далее в ступку добавляли 10 мл фосфатного буфера с рН 7,8-8,0 (тилозин) или буфер №3 (колистин), тщательно перемешивали и переносили в центрифужные пробирки. После экстракции и центрифугирования определение содержания колистина и тилозина проводили в надосадочной жидкости.

При определении тилозина основания в плазме крови, ее закапывали в лунки чашек Петри без предварительной обработки. В качестве тест-культуры использовали *M. luteus* ATCC 9341.

Для определения колистина сульфата кровь раскапывали в лунки чашек Петри после разбавления 1:1 стерильным буфером №3. В качестве тест-культуры использовали *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617.

Клинические опыты по изучению химиотерапевтической активности тилоколина проводили на телятах 2-5 дневного возраста (163 гол.) в зимне-весенний период в условиях ООО «Новая деревня» Липецкого района Липецкой области и СПК «Староникольское» Хохольского района Воронежской области. Для определения клинического статуса больных телят проводили измерение температуры, устанавливали частоту дыхания и пульс. Методами пальпации и перкуссии оценивали состояние печени, тонкого и толстого отделов кишечника, а также учитывали частоту дефекации, количество фекалий, выделяемое за одну дефекацию и за сутки, их консистенцию, форму, цвет, запах, наличие таких примесей, как кровь, слизь, гной и т.д.

Диагноз на заболевание колибактериозом устанавливали комплексно на основании данных клинического обследования животных, бактериологического исследования, патологоанатомического вскрытия, с учетом эпизоотической ситуации в хозяйстве.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel», «Statistica 5,0» на PC «Pentium III». Достоверность отличий оценивали методом парных сравнений, используя t-критерий Стьюдента (Г.Ф. Лакин, 1990).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Антибактериальная активность колистина и тилозина и их различных комбинаций

Было изучено 5 композиций препарата в сравнении с колистином и тилозином. Как видно из данных, представленных в таблице 2, изученные композиции в отношении эшерихий обладали высоким антибактериальным действием. Минимальная бактериостатическая концентрация (МБСК) в отношении *E. coli* 57/853 составила для колистина 1,56 мкг/мл, для тилозина – 3,12 мкг/мл.

При изучении антибактериального эффекта различных композиций установлено, что совместное применение колистина и тилозина позволило снизить МБСК для колистина – до 0,076-0,234 мкг/мл, а тилозина – до 0,086-0,214 мкг/мл. В отношении эшерихий по абсолютной массе препарата активность композиций 1, 3 и 4 увеличилась по сравнению с колистином в 8,2 раза, а по сравнению с тилозином – в 16,4 раза.

В то же время совместное применение колистина и тилозина позволило снизить МБСК в композиции 1 для колистина и тилозина до 0,095 мкг/мл, в композиции 3 – для колистина – до 0,105 мкг/мл, а для тилозина – до 0,086 мкг/мл, в композиции 4 – для колистина – до 0,076 мкг/мл, а для тилозина – до 0,114 мкг/мл. Таким образом, в пересчете на абсолютную массу составляющих компонентов наиболее активной оказалась композиция 1 (тилоколин).

Таблица 2

Антимикробная активность (МБсК) колистина, тилозина и различных композиций препарата, мкг/мл

Композиция	Колистин	Тилозин	По Σ ДВ	В пересчете на	
				Колистин	Тилозин
E. coli 57/853					
K1	1,56	3,12	0,19	0,095	0,095
K2			0,39	0,176	0,214
K3			0,19	0,105	0,086
K4			0,19	0,076	0,114
K5			0,39	0,234	0,156

Более детальное изучение антимикробной активности показало, что тилоколин обладает выраженными антимикробными свойствами. Активность препарата в отношении как музейных, так и полевых штаммов эшерихий была достаточно высокой – 0,19 – 0,39 мкг/мл. Установленное взаимоусиливающее действие комбинации колистина и тилозина в отношении изученных этиологически значимых в развитии колибактериоза телят микроорганизмов, а также расширение спектра антибактериальной активности при их совместном применении позволили включить эти активные действующие вещества в состав комплексного препарата.

3.2. Токсикологическая характеристика тилоколина

3.2.1. Острая токсичность

В результате изучения острой токсичности комплексного антибактериального препарата тилоколин на лабораторных животных установлено (табл. 3), что по параметрам острой токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к IV классу опасности – веществам малоопасным.

Таблица 3

Параметры острой токсичности тилоколина при однократном введении для лабораторных животных (мг/кг)

Вид животных	Параметры токсичности					SLD ₅₀
	МПД	LD ₁₆	LD ₅₀	LD ₈₄	LD ₁₀₀	
Внутрижелудочное введение						
Белые мыши	3500,0	6209,2	10702,6 (9190-1200)	15260,8	17523,7	±754,3
Белые крысы	3500,0	7166,1	11669,7 (8630-14700)	17086,2	19566,2	±1438,2
Внутримышечное введение						
Белые мыши	600,0	1004,8	1500,3 (1310-1690)	1995,4	2243,0	±95,2
Белые крысы	450,0	622,1	1033,8 (807-1260)	1428,3	1629,8	±109,7
Подкожное введение						
Белые мыши	600,0	660,1	789,4 (749-830)	915,9	979,9	±20,1
Белые крысы	950,0	1089,1	1421,1 (1210-1630)	1733,7	1894,8	±99,2

3.2.2. Хроническая токсичность

При изучении хронической токсичности препарата гибели белых крыс в опытных и контрольной группах на протяжении всего опыта не регистрировали. Препарат не вызывал существенных изменений в клиническом состоянии животных: поведение, груминг, аппетит, частота дыхания у всех животных опытных групп, как в период применения препарата, так и в течение 10 дней после окончания применения тилоколина оставались в пределах физиологической нормы.

Установлено, что тилоколин, в дозах 0,05 и 0,10 мл/кг не оказывает негативного влияния на интенсивность роста животных (рис. 1). В изученных дозах в течение курса введения препарата, подопытные животные не отличались от контрольных по приросту массы тела, и в конце эксперимента статистически достоверных различий по этому показателю не было обнаружено.

У крыс, которым препарат вводили внутримышечно в дозе 0,20 мл/кг массы тела, на протяжении всего опыта отмечали снижение прироста массы тела по отношению к контролю, что свидетельствует о токсическом действии

препарата. Однако через 10 суток после последнего введения тилоколина среднесуточный прирост массы тела крыс приближается к среднесуточному приросту массы тела контрольных животных.

Относительная масса внутренних органов крыс, которым применяли препарат внутримышечно в дозе 0,05 и 0,1 мл/кг, существенно не отличались от контроля.

В группе животных, ко-

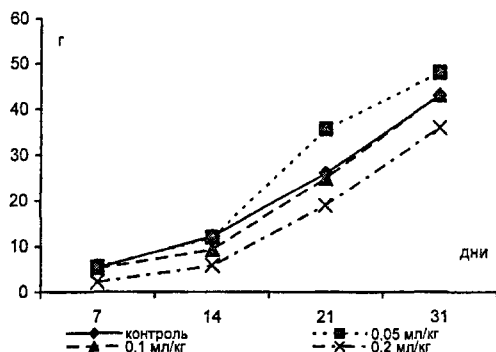


Рис. 1. Динамика изменения массы тела белых крыс при многократном введении тилоколина (относительно к исходной массе тела)

торым вводили препарат в дозе 0,20 мл/кг массы тела, была отмечена инъекция сосудов внутренних органов и их большее, по сравнению с контрольной группой, кровенаполнение. Относительная масса почек опытных крыс по сравнению с контролем на 14 день была выше на 21,1%, через 21 день это увеличение было менее значительным – на 12,5%. Относительная масса печени опытных крыс (0,2 мл/кг) по сравнению с контролем на 14 день была выше на 27,4%, на 21 день – на 8,5%. Через 10 дней восстановительного периода, данные показатели у опытных животных восстанавливались до физиологических значений.

При исследовании крови животных, которым вводили тилоколин в дозах 0,05 и 0,10 мл/кг массы тела, не отмечено достоверных изменений в морфологическом составе крови, и биохимических показателях по сравнению с показателями в крови животных контрольной группы.

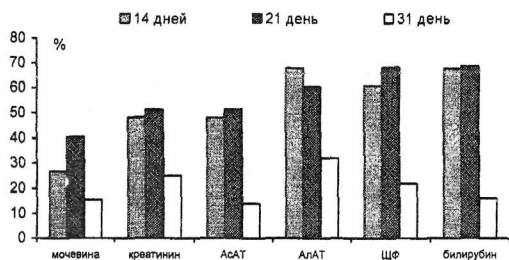


Рис. 2. Влияние тилоколина в наивысшей токсической дозе (0,2 мл/кг) на биохимические показатели крови белых крыс в хроническом опыте (% к контролю)

В дальнейшем введении препарата в наивысшей дозе до 21 дня наблюдалось более выраженное увеличение данных показателей: креатинина – на 51,3%, мочевины – на 40,4%. Во все сроки исследования возрастала активность цитолитических ферментов: АсАТ – на 48,2-51,5%, АлАТ – на 67,9-60,3%, гаммаглутамилтрансферазы – на 60,8-67,5%. Активность ЩФ повышалась в 1,6-1,7 раза. Уровень общего билирубина сыворотки крови повышался в опытной группе на 67,6-68,6%.

При этом на 14 сутки отмечали выраженное увеличение количества α - и β -глобулинов на 48,3% и 62,8% соответственно, при умеренном снижении содержания в сыворотке крови альбуминов (на 14,4%) и γ -глобулинов (на 15,5%). На 21-е сутки эти изменения были менее выраженные.

Таблица 4

Биохимические показатели крови белых крыс при многократном внутримышечном введении тилоколина (21 день)

Показатели	Контроль	Дозы тилоколина, мл/кг		
		0,05	0,10	0,20
Общий белок, г/л	66,9 $\pm$ 0,91	69,5 $\pm$ 0,33	69,6 $\pm$ 1,02	70,1 $\pm$ 1,11
Альбумины, г/л	33,6 $\pm$ 0,63	33,8 $\pm$ 3,59	38,3 $\pm$ 3,43	31,9 $\pm$ 1,79
Глобулины, г/л	- α	7,56 $\pm$ 0,20	7,37 $\pm$ 0,86	6,81 $\pm$ 0,69
	- β	15,0 $\pm$ 0,06	16,9 $\pm$ 1,49	14,6 $\pm$ 2,08
	- γ	10,7 $\pm$ 0,78	11,3 $\pm$ 1,28	9,92 $\pm$ 1,81
Глюкоза, мМ/л	10,13 $\pm$ 0,21	9,78 $\pm$ 0,07	9,65 $\pm$ 0,59	9,61 $\pm$ 0,74
Холестерин, мМ/л	1,28 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,15	1,35 $\pm$ 0,04	1,56 $\pm$ 0,28
Общ. липиды, г/л	2,31 $\pm$ 0,12	2,24 $\pm$ 0,07	2,46 $\pm$ 0,07	2,37 $\pm$ 0,10
γ -ГТ, Ед/л	0,40 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,08	0,45 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,09*
Фосфор, мМ/л	2,33 $\pm$ 0,02	2,82 $\pm$ 0,12	2,76 $\pm$ 0,16	2,40 $\pm$ 0,25
Кальций, мМ/л	2,38 $\pm$ 0,08	2,37 $\pm$ 0,02	2,48 $\pm$ 0,07	2,44 $\pm$ 0,14

* - $P < 0,05 - 0,001$ по сравнению с контролем

Все изменения в организме лабораторных животных, вызванные двадцатидневным введением комплексного антибактериального препарата в высоких дозах, носили обратимый характер, о чем свидетельствует восста-

новление функций организма животных до нормы через 10 суток после отмены препарата.

Как однократное, так и длительное введение тилоколина белым мышам в дозах 0,03 и 0,15 мл/кг (1/50 и 1/10 дозы от LD₅₀) в течение 20 дней не приводит к нарушениям моторно-эвакуаторной функции желудка, не влияет на перистальтическую активность тонкого кишечника и не изменяет распределение содержимого в компартаментах пищеварительного тракта.

При изучении кумулятивных свойств по методу Р. Lime суммарно введенные дозы тилоколина – 12,4 мл/кг для белых крыс не вызвали 50%-ной гибели животных. Это не позволило рассчитать коэффициент кумуляции по показателю смертельный эффект. Но, учитывая, что введенные дозы составляют 12,8 ЛД₅₀, то возможный коэффициент кумуляции превышает 12. Это свидетельствует об отсутствии кумулятивного эффекта у тилоколина.

3.2.3. Изучение субхронической токсичности на телятах

В опыте по изучению субхронической токсичности на телятах тилоколин в изученных дозах не оказывал существенного влияния на клинический статус, скорость роста, поведение и аппетит телят. Показатели клинического состояния телят всех групп в течение всего опыта находились в пределах физиологической нормы. В период всего опыта телята контрольной и опытных групп были подвижны, аппетит выражен, рефлексы сохранены. Нарушений функций пищеварения и мочеотделения не установлено. Препарат в различных дозах не снижал скорости роста телят.

Результаты опыта представлены в таблице 5.

Таблица 5

Показатели крови клинически здоровых телят при внутримышечном применении тилоколина в течение 14 дней

Показатели	Контроль	Дозы тилоколина, мл/кг		
		0,05	0,1	0,2
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,90±0,33	7,35±0,39	7,67±0,32	7,10±0,15
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,26±0,27	9,68±1,21	9,58±0,77	9,16±0,17
Гемоглобин, г/л	114,9±3,60	106,4±3,13	113,0±3,10	113,8±4,65
Общий белок, г/л	62,7±0,75	62,8±1,38	62,7±1,72	63,0±0,34
Альбумины, г/л	31,9±2,17	32,3±3,21	31,4±1,72	31,7±2,15
Глобулины, г/л	- α	8,71±1,67	9,11±1,08	9,08±2,31
	- β	9,12±2,51	9,60±2,86	8,89±1,19
	- γ	12,9±0,98	11,8±1,21	13,3±0,88
Мочевина, мм/л	3,78±0,17	3,12±0,14	3,24±0,27	4,44±0,16*
Креатинин, мкм/л	70,7±7,87	75,1±6,18	74,8±5,84	82,8±6,17
Глюкоза, мм/л	3,73±0,22	3,50±0,09	3,72±0,17	3,84±0,15
Холестерол, мм/л	2,00±0,19	2,48±0,19	2,29±0,12	2,29±0,31
АсАТ, ЕД/л	49,1±5,62	43,9±2,19	48,2±6,88	55,7±1,22
АлАТ, ЕД/л	64,7±3,16	66,3±6,11	68,1±5,11	76,2±3,02*

*- P < 0,05 по отношению к контролю

Многократное применение его в условно-терапевтической и в 2 и 4 раза ее превышающей дозах существенно не влияло на морфологические и биохимические показатели крови. Была отмечена лишь тенденция повышения в пределах нормы уровня мочевины, креатинина и активности АЛАТ.

3.2.4. Местнораздражающее действие

В результате проведенных исследований местнораздражающего действия тилоколина установлено, что при однократной аппликации на кожные покровы кроликам при плотности нанесения от 0,020 до 0,10 мл/см² препарат не вызывает повреждение кожи в виде эритемы или ее отеков.

Изучение раздражающих свойств препарата на слизистые оболочки, проведенное на кроликах, показало, что через 60, 180 минут и 4 часа раздражающее действие препарата отсутствовало.

3.2.5. Аллергенные свойства

Опыты по изучению аллергенных свойств тилоколина проведены на белых беспородных крысах и морских свинках при наружном, конъюнктивальном и внутрикожном способах применения препарата.

Результаты оценки сенсибилизирующего действия тилоколина показали отсутствие выраженной реакции иммунной системы подопытных животных на введение препарата. Препарат не вызывал контактного дерматита после многократных накожных аппликаций, при этом реакции специфического лизиса, специфической агломерации лейкоцитов и не прямой дегрануляции тучных клеток были отрицательны. Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии аллергенного действия у изучаемого препарата.

3.2.6. Влияние тилоколина на качество мясопродуктов

Гигиеническую оценку влияния тилоколина на качество мясопродуктов проводили на кроликах со средней массой 2,1 кг. Животным опытной группы вводили тилоколин в дозе 0,05 мл/кг массы тела один раз в сутки в течение 7 дней.

В результате проведенных органолептических исследований не установлено существенных различий между качеством проб бульона и мяса кроликов контрольной и опытной групп. Пробы мяса имели хороший, свойственный продукту цвет и вид на разрезе, ароматный запах, приятный вкус, нежную консистенцию и достаточную сочность. Бульоны были прозрачные, слегка золотистого цвета с капельками жира, приятные на вкус и достаточно ароматные. Общая органолептическая оценка проб мяса и бульона – хорошая.

3.3. Фармакокинетика тилоколина

Изучение фармакокинетики тилоколина проведено по определению содержания тилозина и колистина в крови телят с массой тела 40-45 кг.

Телятам вводили тилоколин однократно внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг. Для определения содержания активно действующих веществ у телят брали кровь из яремной вены через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 и 24 часа после введения препарата.

Фармакокинетические исследования показали, что уже через 30 минут после введения препарата тилозин и колистин обнаруживаются в крови телят

(рис. 3). Установлено, что максимальное содержание тилозина и колистина в крови телят наблюдается через 1 час в концентрациях 1,98 и 3,84 мкг/мл соответственно, после чего их концентрация в течение 24 часов плавно снижалась. Минимальная концентрация тилозина и колистина через 24 часа продолжает оставаться на уровне минимальной подавляющей концентрации для многих микроорганизмов (0,22 и 0,14 мкг/мл), что позволяет назначать тилоколин 1 раз в сутки, при этом на все протяжении интервала дозирования,

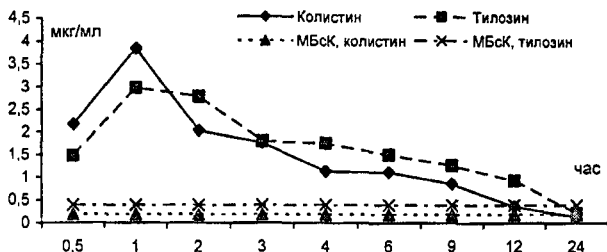


Рис. 3. Содержание колистина и тилозина в крови телят после однократного внутримышечного введения тилоколина в дозе 0,05 мл/кг массы тела

поддерживающая концентрация тилозина и колистина превышает МПК для основных возбудителей желудочно-кишечных заболеваний.

3.4. Изучение остаточных количеств тилоколина в биологическом материале

При изучении сроков выведения тилозина и колистина после курсового 5 дневного применения тилоколина в дозе 0,05 мл/кг с интервалом 24 часа было установлено, что колистин менее длительное время находится в организме, чем тилозин. Наибольшее его количество обнаружено через сутки после отмены препарата в почках ($5,10 \pm 0,32$), крови ($3,28 \pm 0,53$), печени ($1,79 \pm 0,33$), легких ($3,54 \pm 0,33$), моче ($4,53 \pm 0,44$). На 3 суток после последнего введения препарата колистин обнаруживается в следовых количествах в почках ($1,41 \pm 0,12$), легких ($0,50 \pm 0,13$) и моче ($1,94 \pm 0,13$) на уровне мкг/г соответственно. Через 5 суток колистин отсутствует во всех органах, тканях и жидкостях организма телят.

Через 24 часа после последнего применения тилоколина при курсовом внутримышечном применении остаточные количества тилозина определяются во всех исследуемых органах и биологических жидкостях. Наибольшее его количество обнаружено в этот период в почках ($3,33 \pm 0,18$), крови ($3,17 \pm 0,19$), печени ($4,83 \pm 0,35$) и легких ($4,74 \pm 0,56$).

На 5 сутки после последнего введения препарата тилозин обнаруживается в следовых количествах в почках ($0,13 \pm 0,03$), легких ($0,64 \pm 0,13$) и печени ($0,87 \pm 0,09$). Через 7 суток тилозин отсутствует во всех органах, тканях и жидкостях организма телят.

Таким образом, срок возможного убоя животных на мясо после применения тилоколина должен быть не менее 7 суток.

3.5. Терапевтическая эффективность тилоколина при колибактериозе телят

Научно-производственные опыты были проведены в хозяйствах Воронежской и Липецкой областей: ООО «Новая деревня» Липецкого района Ли-

пецкой области, СПК «Староникольское» Хохольского района Воронежской области.

Терапевтическую эффективность тилоколина изучали на больных колибактериозом телятах 2-5 дневного возраста. Препарат применяли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг один раз в сутки в течение 5 дней. В качестве препарата сравнения использовали энроколи раствор для инъекций в соответствии с инструкцией по применению.

Проведенные исследования показали (табл. 6), что тилоколин обладает высокой терапевтической эффективностью при лечении колибактериоза у телят (в среднем она составила 92,6%), что на 6,2% выше эффективности препарата энроколи. По сравнению с контрольными группами при применении препарата тилоколин снизился процент животных, которые остались больными в среднем на 6,2%. Уменьшился срок выздоровления в среднем на 20,6%.

Таким образом, результаты изучения терапевтической эффективности тилоколина в производственных условиях позволяют считать, что разработанное нами комплексное антибактериальное лекарственное средство на основе колистина и тилозина при введении внутримышечно один раз в сутки в дозе 0,05 мл/кг в течение 4-5 дней может быть использовано для лечения желудочно-кишечных заболеваний телят бактериальной этиологии.

Таблица 6

Эффективность применения тилоколина для лечения колибактериоза у телят

Показатели	Группа животных			
	ООО «Новая деревня»		СПК «Староникольское»	
	Энроколи	Тилоколин	Энроколи	Тилоколин
Количество животных, гол.	52	64	19	28
Выздоровело, гол.	46	59	16	26
%	88,5	92,2	84,2	92,9
Пало, гол.	-	-	-	-
%				
Остались больными, гол.	6	5	3	2
%	11,5	7,8	15,8	7,1
Сроки выздоровления, дн.	4,3±0,6	3,5±0,3	5,4±0,3	4,2±0,2
Среднесуточный привес, г.	83,0±4,8	92,0±3,6	-	-
Терапевтическая эффективность, %	88,5	92,2	84,2	92,8

Результаты проведенных нами исследований по разработке лекарственной формы, изучению антибактериальных, фармако-токсикологических свойств и терапевтической эффективности комплексного антибактериального лекарственного средства на основе колистина и тилозина были использованы при разработке технических условий и инструкции по применению лекарственного средства в ветеринарии.

ВЫВОДЫ

1. Тилоколин – комплексный антибактериальный препарат, состоящий из тилозина и колистина в % соотношении 5:5, на пролонгированной основе.

2. Компоненты тилоколина – тилозин и колистин обладают взаимоусиливающим антимикробным действием в отношении микроорганизмов вызывающих колибактериоз телят. Антимикробная активность тилоколина (МБсК составляет 0,19 мкг/мл) в отношении эшерихий увеличивается по сравнению с колистином в 8 раз, а по сравнению с тилозином - в 16 раз.

3. Тилоколин является малотоксичным препаратом (4 класс опасности). ЛД₅₀ тилоколина при внутрижелудочном введении для белых мышей составляет 10702,6 мг/кг, для белых крыс – 11669,7 мг/кг; при подкожном введении для белых мышей – 789,4 мг/кг, для белых крыс – 1421,1 мг/кг; при внутримышечном введении для белых мышей – 1500,3 мг/кг, для белых крыс – 1033,8 мг/кг.

4. При многократном (21 день) внутримышечном введении тилоколина белым крысам в дозах 1/20 от ЛД₅₀ (51,7 мг/кг) и 1/10 от ЛД₅₀ (103,4 мг/кг) не выявлено функциональных изменений в организме животных. Применение препарата в максимальной дозе 1/5 от ЛД₅₀ (206,8 мг/кг) повышает нагрузку на печень (повышение активности АсАТ на 48,2-51,5%, АлАТ – на 67,9-60,3%, ГГТ – 60,8-67,5%, ЩФ – в 1,6-1,7 раза, билирубина – на 67,6-68,6%) и, главным образом, на почки (повышение содержания креатинина на 48,2-51,3%, мочевины – на 26,8-40,4%) при отсутствии клинических признаков интоксикации и восстанавливающихся через 10 суток после отмены препарата.

5. Тилоколин не обладает раздражающим и кожно-резорбтивным действием. У препарата отсутствуют кумулятивные и аллергенные свойства.

6. При внутримышечном введении в дозе 0,05 мл/кг (терапевтическая доза) в течение 14 дней телятам тилоколин не оказывает существенного влияния на их клинический статус, скорость роста, поведение и аппетит. Многократное применение препарата в терапевтической дозе существенно не влияет на морфологические и биохимические показатели крови телят.

7. При внутримышечном введении тилоколина в дозе 0,05 мл/кг максимальное содержание колистина и тилозина в крови телят наблюдается через 1 час в концентрации в среднем 3,84 мкг/мл для колистина и 1,98 мкг/мл для тилозина. Минимальная концентрация через 24 часа для колистина составляет в среднем 0,14 мкг/мл, а для тилозина – 0,22 мкг/мл, что позволяет на всем протяжении интервала дозирования поддерживать их концентрацию на уровне минимальной подавляющей концентрации для возбудителей колибактериоза телят.

8. Терапевтическая эффективность препарата тилоколин в дозе 0,05 мл/кг при лечении колибактериоза у телят составляет 92,2-92,9 %.

9. Препарат при длительном применении не оказывает отрицательного влияния на качество мяса и бульона, срок возможного использования продуктов убоя составляет – 7 дней после окончания применения препарата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Ветеринарным специалистам животноводческих хозяйств применять тилоколин в соответствии с инструкцией по применению препарата для лечения колибактериоза у телят (в дозе 0,05 мл/кг массы тела один раз в день в течение 4-5 суток).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Востроилова Г.А. Параметры острой токсичности препарата тилоколин / Г.А. Востроилова, **М.Ю. Нижегородов**, С.В. Шабунин // Матер. Международной науч.-произв. Конференции, посвящ. 100-летию со дня рождения проф. Спирюхова И.А. – Пенза, 2007. – С.31-34.

2. **Нижегородов М.Ю.** Применение тилоколина для лечения желудочно-кишечных болезней телят / М.Ю. Нижегородов, С.В. Шабунин // Фармакологические и экотоксикологические аспекты ветеринарной медицины: Матер. науч.-практ. конф. Фармакологов РФ, посвящ. 85-летию со дня рождения проф. Рабиновича М.И. - Троицк, 2007. – С.192-194.

*3. Комплексные лекарственные препараты на основе гентамицина и колистина при бактериальных инфекциях телят / С.В. Шабунин, Г.А. Востроилова, В.В. Чернов, **М.Ю. Нижегородов** и др.// Ветеринария и кормление, 2007.- ноябрь-декабрь. - С. 12-13

4. Кабицкий С.Н. Профилактическое действие тилоколина при колибактериозе у новорожденных поросят / С.Н. Кабицкий, **М.Ю. Нижегородов** // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Матер.междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию ветеринарии Курской области – Курск, 2008. – С.146-147.

5. **Нижегородов М.Ю.** Фармако-токсикологическая характеристика препарата тилоколин / М.Ю. Нижегородов, С.Н. Кабицкий // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Матер.междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 125-летию ветеринарии Курской области – Курск, 2008. – С.278-280.

6. **Нижегородов М.Ю.** Изучение сенсibilизации организма животных при введении препарата на основе колистина и тилозина / М.Ю. Нижегородов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Матер.междунар. науч.- практ. конф. – Воронеж, 2008. – С. 331-334.

7. Ческидова Л.В. Лечение желудочно-кишечных болезней бактериальной этиологии у молодняка свиней препаратами колистина /Л.В. Ческидова, В.В. Чернов, **М.Ю. Нижегородов**// Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Матер.междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 65-летию Ульяновской ГСХА – Ульяновск, 2008. – Т.3. – С. 151-153.

Подписано в печать 17.11.2009 г.
Формат 60 x 84/16 . Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 1,0 Тираж 100 экз. Заказ № 2886

Отпечатано в типографии
Воронежский ЦНТИ – филиал ФГУ «Объединение
«Росинформресурс» Минэнерго России
394730, г. Воронеж, пр. Революции, 30