

Ионов Сергей Николаевич

**Разработка комплексного антибактериального препарата  
на основе клиндамицина и спектиномицина  
для лечения бактериальных инфекций птиц**

16.00.04 – Ветеринарная фармакология с токсикологией.

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2003

Работа выполнена в отделе химиотерапевтических препаратов Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов - Центр качества ветеринарных препаратов и кормов».

**Научный руководитель:** кандидат ветеринарных наук, доцент  
Виоллин Б.В.

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, профессор  
Преображенский С. Н.  
доктор ветеринарных наук  
Мерзленко О. В.

**Ведущая организация** – Московский государственный университет прикладной биотехнологии.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2003 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов - Центр качества ветеринарных препаратов и кормов» МСХ РФ (Россия, г Москва, Звенигородское ш., д. 5, ФГУ ВГНКИ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВГНКИ.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат ветеринарных наук, доцент,  
заслуженный ветеринарный врач РФ

Козырев Ю. А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Серьезной проблемой современного промышленного птицеводства являются бактериальные инфекции птиц. По данным Департамента ветеринарии РФ, эта группа заболеваний остается основной причиной гибели птицы (Яковлев С.С., 2000).

Среди бактериальных инфекций наиболее значимый урон птицеводству наносят следующие заболевания: колибактериоз, сальмонеллез, стрептококкоз, стафилококкоз, респираторный микоплазмоз. Экономические потери складываются из снижения яйценоскости и привесов, гибели эмбрионов, цыплят и взрослой птицы (Бурун В. Г., 2001; Бессарабов Б. Ф., Сумкова Н. К., 2001; Козак С.Н., 2001).

Борьба с бактериальной патологией включает в себя комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий, среди которых важным элементом является использование химиотерапевтических препаратов. Однако в связи с развитием антибиотикорезистентности к используемым препаратам, остро стоит проблема поиска новых путей предупреждения формирования устойчивости и воздействия на резистентных микроорганизмов (Ковалев В.Ф., Виолин Б.В., 1985; Brown M.B., Scasserra A.E., 1980; Ashkenazi S., Mayzahav M., 1995).

Развитие у микроорганизмов устойчивости является основным фактором, ограничивающим эффективность антимикробных препаратов и стимулирующим разработку новых соединений, а также поиск комбинаций антибиотиков, обладающих взаимосоиливающим антимикробным действием (Белоусов Ю.Б., Моисеев В. С., Лепяхин В. К., 1997; Бриан Л. Е., 1984).

Одним из антибиотиков, проявляющих высокую активность в отношении стафилококков, стрептококков и микоплазм, является линкомицин, представляющий собой продукт жизнедеятельности гриба *Streptomyces lincolnensis* (сем. *Streptomycetaceae*). Препарат известен давно и хорошо зарекомендовал себя для борьбы с грамположительными микроорганизмами в ветеринарии и медицине. Путем химической модификации линкомицина был получен другой антибиотик – клиндамицин. Особенностью его строения является замощенный из гидро-



кислых групп молекулы линкомицина на анион хлора. Данное изменение привело к значительному усилению антимикробных свойств клиндамицина и расширению спектра его антибактериального действия (Braden T.D., Johnson C.A., 1988; Brown S.A., Dieringer T.M., 1989).

В Российской Федерации для ветеринарных целей клиндамицин не применялся. Отсутствие перекрестной резистентности с другими антибиотиками (включая линкомицин), а также высокая антибактериальная и антимикоплазменная активность позволили нам выбрать клиндамицин в качестве одного из действующих веществ комплексного препарата для лечения бактериальных инфекций птиц.

Заболевания сельскохозяйственных птиц редко протекают в виде моноинфекции, - чаще в сочетании друг с другом. Так, микоплазмоз может осложняться колибактериозом, сальмонеллезом и наоборот. Для борьбы с такими ассоциациями недостаточно применения одного препарата, требуются комплексы антибиотиков, одновременно действующих на большинство возбудителей (Бессарабов Б.Ф., Сумкова Н.К., 2001; Артемьева С.А., 1977; Bradbery J.M., 1984).

Обладая высокой активностью в отношении грамположительной микрофлоры и анаэробов, клиндамицин не действует на грамотрицательные бактерии. Поэтому для расширения спектра антибактериального действия комплексного препарата мы ввели в его состав спектиномицин – антибиотик, подавляющий развитие эшерихий и сальмонелл, а также, по нашим данным усиливающий антимикробные свойства клиндамицина.

Разработанный нами комплексный препарат на основе клиндамицина и спектиномицина обладает широким спектром антибактериального действия и высокой активностью в отношении этиологически значимых в промышленном птицеводстве микроорганизмов.

### **Цели и задачи исследования:**

- Изучить антимикробную активность клиндамицина и спектиномицина, а также комбинации этих антибиотиков.
- Разработать требования к качеству комплексного препарата и методы его контроля.
- Изучить стабильность комплексного препарата в процессе хранения.
- Изучить острую токсичность комплексного препарата на лабораторных животных и птице.
- Изучить субхроническую токсичность комплексного препарата на лабораторных животных и птице.
- Изучить фармакокинетику клиндамицина и спектиномицина в организме птиц после применения комплексного препарата.
- Определить сроки выведения остаточных количеств клиндамицина и спектиномицина из организма птиц после применения комплексного препарата.
- Изучить терапевтическую эффективность комплексного препарата в производственных условиях.

**Научная новизна.** Теоретически и экспериментально обоснован состав комплексного антибактериального препарата на основе клиндамицина и спектиномицина.

Установлены параметры острой и субхронической токсичности комплексного препарата для лабораторных животных и птиц.

Изучена фармакокинетика и определены оптимальные дозы комплексного препарата, обеспечивающие эффективные антибактериальные концентрации клиндамицина и спектиномицина в организме птиц.

Определены сроки выведения остаточных количеств клиндамицина и спектиномицина из организма птиц, а также изучена терапевтическая эффективность комплексного препарата в производственных условиях.

### **Практическая ценность работы.**

Разработан и изучен новый комплексный антибактериальный препарат для лечения бактериальных инфекций птиц.

Разработаны методы контроля качества комплексного препарата.

Определены сроки возможного убоя птиц на мясо после курсового применения комплексного препарата.

Разработана нормативная документация на комплексный препарат (проект технических условий на опытную партию, временное наставление по применению комплексного препарата при бактериальных инфекциях птиц).

**Публикации:** По теме диссертации опубликовано 2 статьи.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- теоретическое и экспериментальное обоснование состава комплексного препарата;
- качественные и количественные методы контроля комплексного препарата, результаты изучения его стабильности при хранении;
- результаты изучения острой и субхронической токсичности комплексного препарата на лабораторных животных и птице;
- результаты изучения фармакокинетики комплексного препарата и определения сроков выведения остаточных количеств клиндамицина и спектиномицина из организма птицы после применения комплексного препарата;
- результаты изучения терапевтической эффективности комплексного препарата при колибактериозе цыплят-бройлеров.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на листах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, выводы и практические предложения. Работа иллюстрирована таблицами и диаграммами. Список литературы содержит источники, в том числе иностранных. Приложение на листах.

# СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## Материалы и методы исследований

Работа выполнена в течение 2000-2003 гг. В опытах было использовано 180 беспородных белых мышей обоего пола и 168 цыплят. Клиническое испытание препарата в производственных условиях проведено на 112200 цыплятах-бройлерах.

Определение чувствительности выделенных от больных птиц эшерихий (n=10), сальмонелл (n=23), стрептококков (n=8), стафилококков (n=19) к клиндамицину и спектиномицину, а также их комбинациям проводили методом серийных разведений в плотной питательной среде (Навашин С.М., Фомина И.Л., 1982). Для сравнения определяли чувствительность этих же изолятов микроорганизмов к наиболее широко используемым в ветеринарии антибактериальным препаратам: амоксициллину, цефтиофуру, тетрациклину, левомицетину, эритромицину и гентамицину.

При разработке лекарственной формы комплексного препарата учитывали, что современное промышленное птицеводство требует применения рационального способа введения лекарственных препаратов при профилактике и терапии болезней. Таким способом является пероральный, позволяющий проводить обработку большого поголовья птицы с одновременным снижением трудовых затрат. Поэтому лекарственной формой комплексного препарата выбрали водорастворимый порошок.

Для стандартизации и контроля качества комплексного препарата, а также изучения его стабильности при хранении были разработаны методы качественного и количественного контроля действующих веществ с использованием метода тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем и микробиологический метод диффузии в агар на плотной питательной среде OXOID CM 261. В качестве тест-культур выбраны микроорганизмы *Micrococcus luteus* ATCC 9341 и *Escherichia coli* ATCC 26.

Стабильность комплексного препарата в процессе хранения для определения срока его годности изучали методом «ускоренного старения» при повышенных температурах (37 и 50 °С). Образцы препарата экспериментальных серий помещали в термостаты на сроки, соответствующие 0,5; 1; 2; 3; 4 и 5 годам естественного хранения. Оценку качества препарата проводили по основным показателям: внешний вид, растворимость, содержание действующих компонентов.

Острую токсичность комплексного препарата изучали на 60 белых беспородных мышах обоего пола средней массой 18 - 20 г и 20 цыплятах-бройлерах обоего пола массой 450 - 550 г.

Препарат в форме суспензии в 2% растворе крахмала вводили однократно перорально через металлический зонд с оливой в желудок мышам и через резиновый зонд в зоб цыплятам в следующих дозах:

- мыши – 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000 мг/кг массы тела;
- цыплята – 9250, 18500, 27750, 37000 мг/кг массы тела.

Каждую дозу препарата испытывали на 10 мышах и 5 цыплятах.

Наблюдение за клиническим состоянием мышей и птиц проводили в течение 7 суток после введения препарата.

Субхроническую токсичность комплексного препарата изучали на 120 белых беспородных мышах обоего пола с начальной массой тела 18 - 20 г и 48 цыплятах-бройлерах с начальной массой 290 - 330 г, которых по принципу аналогов разделили на 4 равные группы.

Препарат применяли животным и птице ежедневно в течение 20 суток в следующих дозах:

Мыши		Цыплята	
Группа	Доза (мг/кг массы тела)	Группа	Доза (мг/кг массы тела)
1	12000	1	7400
2	6000	2	3700
3	3000	3	1850
4 (контроль)	-	4 (контроль)	-

Мышам комплексный препарат в форме суспензии в 2% - м растворе крахмала вводили перорально, через металлический зонд с оливой в желудок, цыплятам - с питьевой водой, растворяя суточную дозу препарата в объеме воды, выпиваемой птицей за сутки.

Наблюдение за клиническим состоянием животных вели на протяжении 31 суток с момента первого введения. Определение массы тела мышей проводили перед опытом, на 11, 21 и 31 - е сутки от начала введения препарата, птиц – перед опытом, на 7, 14, 21 и 30 - е сутки.

Для выявления возможного токсического действия комплексного препарата на 21-е и 31-е сутки от начала введения препарата на 10 мышах каждой группы оценивали детоксицирующую функцию печени с помощью гексеналовой пробы. Гексенал вводили внутрибрюшинно в дозе 60 мг/кг массы тела в виде 0,2% - го водного раствора. Учет времени сна начинали с момента принятия мышами бокового положения и заканчивали при появлении координированных движений. В эти же сроки на других 10 мышах каждой группы изучали общекомпенсаторные реакции организма с помощью функциональной пробы плаванием и определяли относительную массу (коэффициенты) внутренних органов: печени, почек, сердца, легких, селезенки.

Оценку кумулятивных свойств препарата проводили путем определения коэффициента кумуляции, который рассчитывали как отношение суммарной дозы вещества, вызывающей гибель мышей при многократном введении, к  $LD_{50}$ , установленной в опыте по острой токсичности.

У птиц на 21-й и 30-й дни эксперимента брали кровь для гематологических и биохимических исследований, а также определяли значения масс внутренних органов.

Фармакокинетику комплексного препарата изучали в двух опытах.

В первом опыте исследовали фармакокинетику после однократного перорального введения комплексного препарата 50 цыплятам массой 400-450 г.

Препарат, растворенный в воде, вводили через резиновый зонд в зоб перед утренним кормлением в дозе 150 мг/кг массы тела. Через 0,5; 1; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21 и 24 часа забивали по 5 цыплят, от которых брали образцы сыворотки крови, скелетной и сердечной мускулатуры, печени, почек, легких, содержимого тонкого и толстого отделов кишечника. Полученные пробы исследовали на содержание в них клиндамицина и спектиномицина микробиологическим методом диффузии в агар на плотной питательной среде OXOID CM 261. В качестве тест-культур использовали микроорганизмы *Micrococcus luteus* ATCC 9341 и *Escherichia coli* ATCC 26.

Во втором опыте по изучению фармакокинетики препарата в организме птицы при его постоянном поступлении с водой использовали 25 цыплят массой 400 - 500 г. В течение 5 дней в качестве единственного источника питья все цыплята получали только воду, содержащую препарат в количестве 5 г/л. Начиная с первого дня, ежедневно, через 3 часа после утреннего кормления, подвергали убою по 5 цыплят. В образцах сыворотки крови, скелетной и сердечной мускулатуры, печени, почек, легких, содержимого тонкого и толстого отделов кишечника определяли содержание клиндамицина и спектиномицина вышеописанным микробиологическим методом.

Сроки выведения остаточных количеств комплексного препарата изучали на 25 цыплятах массой 400 - 500 г, которым в течение 5 суток ежедневно давали питьевую воду с растворенным в ней препаратом в концентрации 5 г/л. Через 1, 2, 3, 4 и 5 суток после окончания применения препарата подвергали убою по 5 цыплят. В пробах сыворотки крови, скелетной и сердечной мускулатуры, печени, почек, легких определяли содержание клиндамицина и спектиномицина теми же способами, что и при исследовании фармакокинетики.

Терапевтическую эффективность комплексного препарата изучали при колибактериозе цыплят на птицефабриках Московской области - ОАО «Красногорское агропромышленное общество» и ЗАО «Птицефабрика Мирная» в сравнении с комплексным препаратом аналогичного назначения спелинк-44.

Всего в опытах было использовано 112200 цыплят трехдневного возраста.

Оценивали сравнительную эффективность комплексного препарата в дозах 75, 100, 150 мг/кг и спелинк-44 в дозе 1,1 г/кг массы тела. Суточную дозу препаратов растворяли в объеме воды, выпиваемой птицей за сутки. Воду с препаратами цыплята получали в качестве единственного источника питья.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Чувствительность бактерий к антибиотикам

В результате исследований установлено, что клиндамицин активен в отношении стафилококков и стрептококков. Минимальная подавляющая концентрация, действующая на 90% изолятов, составляла 0,31 мкг/мл, на 50% изолятов – 0,16 мкг/мл, что более чем в 2 раза ниже МПК<sub>50</sub> для амоксицилина (0,39 мкг/мл), цефтиофура (0,78 мкг/мл) и левомецетина (6,25 мкг/мл). Полученные данные свидетельствует о более высокой чувствительности грамположительных микроорганизмов к клиндамицину в сравнении с другими антибиотиками. В то же время клиндамицин не влияет на развитие грамотрицательных бактерий, о чем свидетельствуют его МПК, превышающие 100 мкг/мл, в частности, в отношении эшерихий и сальмонелл.

Отсутствие активности клиндамицина в отношении грамотрицательных бактерий компенсирует спектиномицин. Этот антибиотик обладает широким спектром действия и способен подавлять развитие большинства аэробных бактерий, хотя и в несколько больших концентрациях. В наших исследованиях МПК<sub>90</sub> спектиномицина для эшерихий и сальмонелл составила 12,5 мкг/мл, для стафилококков и стрептококков – 6,3 мкг/мл.

При изучении антибактериального эффекта сочетания клиндамицина со спектиномицином установлено, что их комбинация обладает синергидным действием в отношении грамположительной микрофлоры. Так, например, в присутствии 3,1 мкг/мл спектиномицина минимальная подавляющая концентрация клиндамицина для стафилококков и стрептококков снижается в зависимости от штамма в 2 - 4 раза до 0,078 - 0,039 мкг/мл.

Высокая антимикробная активность комбинации клиндамицина и спектиномицина в отношении большинства этиологически значимых в промышленном птицеводстве микроорганизмов позволила включить их в качестве действующих веществ в состав комплексного препарата для лечения бактериальных инфекций птиц.

При разработке лекарственной формы комплексного препарата учитывали, что для успешного лечения бактериальных инфекций требуется одновременная обработка большого поголовья птиц. Поэтому в качестве лекарственной формы мы выбрали водорастворимый порошок для перорального применения.

В состав комплексного препарата входят: клиндамицина гидрохлорид – 5%, спектиномицина дигидрохлорид – 10% и в качестве наполнителя - лактоза до 100%.

Для стандартизации и контроля качества комплексного препарата, его стабильности при хранении нами разработаны качественные и количественные методы исследований, предусмотренные ОСТ 91500.05.001.00 в требованиях к качеству порошков: определение внешнего вида и цвета; определение массовой доли влаги; определение растворимости; определение pH 10% - го водного раствора; определение подлинности клиндамицина и спектиномицина; определение массовой доли клиндамицина и спектиномицина; испытание на токсичность.

Результаты проверки качества трех экспериментальных серий показали хорошую воспроизводимость и точность разработанных качественных и количественных методов контроля комплексного препарата (табл. 1).

Качество препарата характеризуется следующими показателями: внешний вид и цвет (порошок белого или светло-желтого цвета), массовая доля влаги (не более 7 %), растворимость в воде (препарат растворим в воде в соотношении 1:10), pH 10%-го водного раствора (4,8 - 5,3), подлинность клиндамицина и спектиномицина, массовая доля клиндамицина (4,5 - 5,5%), массовая доля спектиномицина (9 - 11%), токсичность в тест дозе 0,8 г/ на мышь (нетоксичен).

Таблица 1. Результаты изучения опытных серий комплексного препарата.

Показатели	1 серия	2 серия	3 серия
Внешний вид и цвет	Порошок белого или светло- желтого цвета		
Массовая доля влаги, %	6,3	6,1	5,8
Растворимость в воде	Растворим	Растворим	Растворим
pH 10% водного раствора	4,92	5,23	5,08
Подлинность клиндамицина	Соответств.	Соответств.	Соответств.
Подлинность спектиномицина	Соответств.	Соответств.	Соответств.
Массовая доля клиндамицина, %	5,12	5,20	5,08
Массовая доля спектиномицина, %	10,56	10,63	10,24
Токсичность в дозе 0,8 г/ на мышь	не токсичен	не токсичен	не токсичен

На основании проведенных исследований были предложены требования к качеству готовой лекарственной формы на основе клиндамицина и спектиномицина, которые вошли в проект технических условий на опытную партию комплексного препарата.

При изучении стабильности комплексного препарата установлено, что в течение 36 условных месяцев хранения содержание антибиотиков находилось в пределах требований нормативной документации (активность клиндамицина снизилась на 6,29 %, а спектиномицина - на 5,08 %). Дальнейшее хранение приводило к снижению активности клиндамицина на 10,96 % и 15,02 % за 4 и 5 лет, соответственно, а спектиномицина - на 10,08% за 5 лет, что не удовлетворяет требованиям Государственной фармакопеи (изд. XI) к качеству порошков. На основании проведенных исследований установлен срок годности препарата 3 года.

При оценке острой токсичности на лабораторных животных установлено, что максимально вводимая доза препарата 60000 мг/кг массы тела не вызвала гибели животных, поэтому ЛД<sub>50</sub> рассчитать не удалось. Клиническое состояние животных в группах, получавших дозы от 10000 до 30000 мг/кг, не отличалось

от контрольной группы. При введении мышам больших доз препарата (40000 - 60000 мг/кг) отмечалось временное (в течение 2 - 3 часов) угнетение общего состояния, связанное с переполнением желудка большим объемом препарата.

Установлено, что по ГОСТ 12.1.007-76 комплексный препарат относится к 4 - му классу опасности - вещества малоопасные ( $LD_{50} > 5000$  мг/кг).

Изучение острой токсичности на птице показало, что однократное пероральное введение комплексного препарата в зоб в дозах 9250; 18500; 27750 и 37000 мг/кг массы тела не вызывает гибели цыплят. Большие количества препарата ввести не удалось из-за его значительного объема. Клиническое состояние опытных цыплят не отличалось от контрольной группы. Таким образом доза, в 185 раз превышающая терапевтическую, не является летальной для птиц.

Результаты изучения субхронической токсичности на лабораторных животных выявили закономерности влияния комплексного препарата на рост и развитие мышей. Установлено наличие у препарата ростостимулирующего действия, характерного для многих антибиотиков. Так, у животных опытных групп отмечали более высокие темпы развития по сравнению с контрольной группой. В то же время самые большие привесы на 21-й день опыта (коэффициент привеса 1,13) отмечали в 3 группе, получавшей наименьшее количество препарата (3000 мг/кг массы тела). Введение препарата в дозах 12000 и 6000 мг/кг массы тела оказало менее выраженное стимулирующее действие, что, видимо, связано с угнетением темпов анаболических процессов большими дозами препарата. Гибели мышей во всех группах на протяжении опыта не отмечали.

Результаты исследований по изучению общекомпенсаторных реакций организма на введение комплексного препарата в течение 20 дней с помощью пробы плаванием показали, что время плавания мышей опытных групп, получавших комплексный препарат в дозах 6000 и 3000 мг/кг массы тела, достоверно не отличалось от контрольной группы. Увеличение дозы до 12000 мг/кг массы тела приводило к недостоверному уменьшению продолжительности времени плавания, что, возможно, связано с угнетением высокой дозой препарата

биохимических реакций в печени и, как следствие, снижением скорости утилизации молочной кислоты и других продуктов мышечного обмена.

Еще одним подтверждением гепатотоксического действия комплексного препарата в высоких дозах (12000 и 6000 мг/кг массы тела) служило увеличение продолжительности гексеналового сна. Нарушение детоксицирующей функции печени, по-видимому, вызвано ингибированием препаратом микросомальных ферментов гепатоцитов, замедляющим разрушение гексенала. Такое ингибирование может быть вызвано гепатотропностью одного из компонентов препарата клиндамицина, о чем свидетельствует максимальное значение этого антибиотика под фармакокинетической кривой в печени ( $AUC_{tot}$ ), установленное нами при изучении фармакокинетики комплексного препарата.

Все изменения, связанные с нарушением функции печени, носили временный и обратимый характер и восстанавливались через 10 суток после отмены препарата.

Рассчитать коэффициент кумуляции в опыте по субхронической токсичности на мышах по показателю смертельный эффект мы не смогли, так как суммарно введенная доза комплексного препарата 240000 мг/кг массы тела не вызвала гибели животных. Но, учитывая, что полученная доза в 24 раза больше максимально вводимой, возможный коэффициент кумуляции значительно превышает 5 и по классификации Л.И. Медведя препарат можно отнести к веществам со слабо выраженной кумуляцией.

При изучении субхронической токсичности на птице установлено, что введение комплексного препарата в течение 20 дней в дозах, в 37; 18,5 и 9,25 раз превышающих терапевтическую, не приводит к гибели птицы. Цыплята опытных групп развивались интенсивнее по сравнению с контролем, о чем свидетельствуют максимальные коэффициенты привеса у птицы (1,21 на 7 - й день и 1,80 на 31 - й день опыта) в первой группе, получавшей наибольшую дозу препарата.

Средние значения относительных масс внутренних органов цыплят отличались по группам, однако ошибки средних величин в большинстве

случаев превышали 5%, что говорит о недостоверности данных различий, связанных с физиологическими колебаниями, а также индивидуальными особенностями опытных птиц.

Показатели общего клинического анализа крови цыплят в период опыта и спустя 10 дней после его окончания не выявили различий между опытными и контрольной группами ( $P < 0,05$ ) и находились в пределах физиологической нормы. Биохимические исследования сыворотки крови не установили гепатотоксического и нефротоксического действия комплексного препарата. Таким образом, двадцатидневное непрерывное введение комплексного препарата в дозах, в 9 - 37 раз превышающих терапевтическую, не приводит к нарушению функционального состояния птицы.

Результаты изучения субхронической токсичности комплексного препарата на мышах и птице показали видовую чувствительность грызунов к длительному назначению клиндамицина и спектиномицина, проявляющуюся во временном нарушении функции печени. В то же время для птицы продолжительное применение препарата даже в 37- кратной терапевтической дозе безопасно.

Изучение фармакокинетики комплексного препарата в организме птиц показало высокую степень биодоступности клиндамицина (табл. 2, диаграмма 1).

Спустя 30 минут после однократного перорального введения препарата в дозе 150 мг/кг массы тела, концентрация клиндамицина в тканях достигает терапевтического уровня. При этом наиболее высокий уровень антибиотика отмечается в печени и почках (5,62 и 4,63 мкг/г соответственно). Через 3 ч после введения максимальные концентрации клиндамицина регистрируются в печени (8,61 мкг/г), почках (5,98 мкг/г) и сыворотке крови (5,65 мкг/мл).

Диagr. 1. Фармакокинетика клиндамицина в организме цыплят.

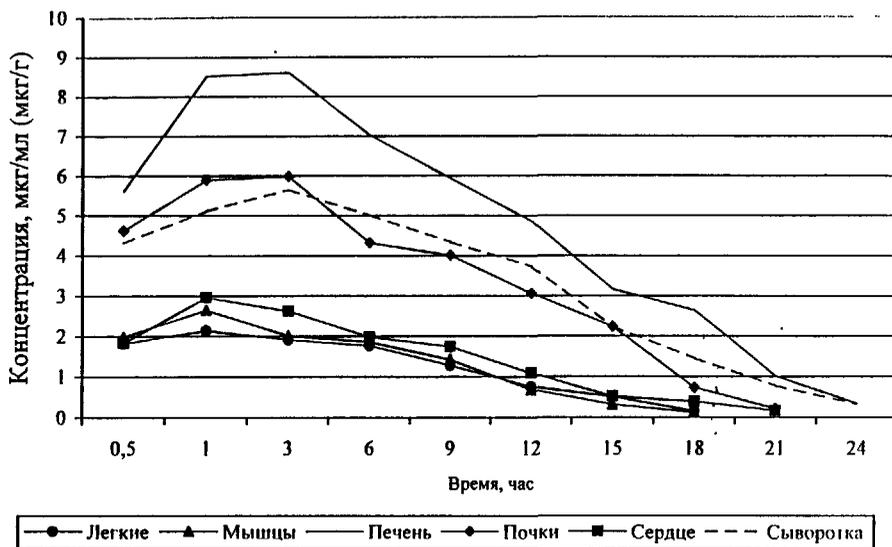


Табл.2. Фармакокинетические параметры клиндамицина

Орган	$C_{\max}$ , мкг/мл (мкг/г)	$T_{\max}$ , ч	$AUC_{\text{tot}}$ , мкг/(мл·ч) [мкг/(г·ч)]	$T_{1/2}$ , ч
Легкие	2,14	1	21,99	2,67
Мышцы	2,64	1	22,53	2,51
Печень	8,61	3	109,58	2,03
Почки	5,98	3	67,79	1,79
Сердце	2,96	1	29,22	2,55
Сыворотка крови	5,65	3	76,59	2,75

где,  $C_{\max}$  – максимальная концентрация клиндамицина в органе, мкг/мл (мкг/г);

$T_{\max}$  – время максимальной концентрации клиндамицина, час;

$AUC_{\text{tot}}$  – площадь под фармакокинетической кривой, мкг/(мл·ч);

$T_{1/2}$  – время полувыведения клиндамицина из органа, ч.

Наибольшие значения времени полувыведения ( $T_{1/2}$ ) клиндамицина приходятся на сыворотку крови, легкие и мышцы (2,75; 2,67 и 2,51 часа соответственно). Это связано со способностью антибиотика образовывать комплексы с белками (Ziv, 1973), которые удерживают молекулы клиндамицина и замедляют его элиминацию. Большая площадь под фармакокинетической кривой ( $AUC_{(0-t)}$ ) антибиотика в сыворотке подтверждает постепенное высвобождение клиндамицина из белковых комплексов и переход его во внутренние органы и ткани (Brown R. B., Barza M. 1975; Brown S. A., Zaia MJ, 1990).

Согласно нашим данным, МПК клиндамицина для большинства стрептококков и стафилококков находится в пределах 0,15-0,61 мкг/мл, а для микоплазм, по литературным данным, - 0,7-1,3 мкг/мл (Prescott J.F., Baggot J.D., 1993). Для подавления жизнедеятельности отдельных резистентных штаммов требуются концентрации клиндамицина 1,2-2,5 мкг/мл. Таким образом, уровень препарата, достаточный для ингибирования микроорганизмов, сохраняется в органах и тканях до 18-21 часов, а его трехкратное превышение в первые часы позволяет контролировать развитие устойчивых штаммов.

На содержание клиндамицина в кишечнике большое влияние оказывает его высокая способность к резорбции. Через полчаса после введения препарата содержание антибиотика в тонком отделе регистрируется на уровне 54,83 мкг/мл, но уже к первому часу снижается в 3 раза, а к 21-24 ч – более чем в 50 раз. В толстом кишечнике клиндамицин появляется через 3 ч и сохраняется на уровне 19,56 мкг/мл до 24 часов (табл. 3).

Совершенно по-другому ведет себя спектиномицин (Cook B., 1973; Gogen E., 1988), который очень плохо всасывается в кишечнике, в связи с чем в кровь и внутренние органы поступает не более 5-7% от общего введенного его количества. В наших опытах содержание антибиотика во внутренних органах было ниже чувствительности метода, поэтому мы изучали фармакокинетику спектиномицина только в желудочно-кишечном тракте.

Содержание спектиномицина в тонком отделе кишечника в первые 30 минут после введения комплексного препарата в дозе 150 мг/кг массы тела оп-

ределяется на уровне 914,2 мкг/мл. Затем, в связи с переходом препарата в толстый кишечник, концентрации антибиотика постепенно снижаются: к 6-му часу до 368,4 мкг/мл, к 12-му до 149,3 мкг/мл. Спустя 21 ч регистрируются 62,3 мкг/мл, а ко вторым суткам – лишь следы препарата.

Таблица 3. Фармакокинетика препарата в кишечнике цыплят

Время, ч	Клиндамицин, мкг/мл		Спектиномицин, мкг/мл	
	Тонкий кишечник	Толстый кишечник	Тонкий кишечник	Толстый кишечник
0,5	54,83 ± 5,13	-	914,2 ± 82,3	-
1	18,02 ± 3,61	-	623,1 ± 78,9	-
3	15,97 ± 2,03	1,39 ± 0,21	432,9 ± 32,2	654,2 ± 74,2
6	9,31 ± 1,26	12,34 ± 1,98	368,4 ± 21,9	532,8 ± 41,9
9	4,90 ± 0,96	23,12 ± 3,26	295,7 ± 31,2	440,9 ± 32,3
12	4,54 ± 0,62	38,45 ± 5,87	149,3 ± 11,8	453,1 ± 12,5
15	3,85 ± 0,23	41,78 ± 4,29	124,6 ± 5,6	321,7 ± 19,1
18	2,41 ± 0,32	32,53 ± 3,25	97,6 ± 4,3	238,2 ± 15,6
21	1,12 ± 0,19	24,59 ± 2,11	62,3 ± 7,5	174,8 ± 19,2
24	0,17 ± 0,05	19,56 ± 1,26	-	112,1 ± 9,7

В толстом кишечнике спектиномицин обнаруживается через 3 часа после введения препарата в концентрации 654,2 мкг/мл и регистрируется на уровне не менее 100 мкг/мл в течение суток.

Приведенные результаты исследований отражают фармакокинетику комплексного препарата после однократного перорального введения. Однако на практике чаще применяют иные способы дачи препаратов, при которых лекарственные вещества поступают в организм птицы постоянно с питьевой водой или кормом.

Для изучения фармакокинетики при таком способе введения мы поставили опыт, в котором смоделировали производственные условия. Препарат рас-

творяли в воде в количестве 5 г/л, что примерно соответствовало суточной дозе 150 мг/кг массы. В течение 5 дней подряд птицы получали эту воду в качестве единственного источника питья.

Спустя три часа после начала применения водного раствора препарата, содержание клиндамицина во внутренних органах достигало уровня, превышающего в 2-3 раза терапевтическую концентрацию, на котором поддерживалось на протяжении всего опыта. Как и в опыте с однократным введением препарата максимальные количества клиндамицина регистрировались в печени, почках и сыворотке крови – 6,86; 5,07 и 4,12 мкг/г (мкг/мл) соответственно, что подтверждает участие этих органов в накоплении, метаболизме и выделении антибиотика.

Количества спектиномицина в течение опыта в разных отделах кишечника находились на одном уровне: 336,5-405,4 мкг/мл в тонком и 236,7-416,8 мкг/мл в толстом. Это связано с отсутствием у спектиномицина способности всасываться в тонком кишечнике, благодаря чему вся порция препарата распределяется равномерно по отделам желудочно-кишечного тракта, что позволяет не допускать адгезию энтеробактерий к ворсинкам эпителиального слоя и препятствует развитию инфекции.

Результаты исследований показали, что введение комплексного препарата с водой позволяет быстро создать терапевтические концентрации антибиотика в организме птицы и поддерживать их на протяжении всего курса лечения.

При определении остаточных количеств клиндамицина в органах и тканях птиц установлено, что через сутки после курсового применения комплексного препарата содержание антибиотика в печени, почках и мышцах составляет соответственно 3,52; 2,04 и 0,32 мкг/г. На вторые сутки после последнего введения препарата клиндамицин регистрируется лишь в печени и почках (0,75 и 0,20 мкг/г соответственно). Антибиотик полностью выводится из организма птиц на четвертые сутки.

В связи с тем, что спектиномицин практически не всасывается из желудочно-кишечного тракта, обнаружить его во внутренних органах и тканях не удалось.

Таким образом, срок предубойной выдержки птиц, для последующего использования мяса в пищу человеку должен составлять не менее 4 суток.

Результаты изучения терапевтической эффективности комплексного препарата в условиях птицефабрик ОАО «Красногорское агропромышленное общество» и ЗАО «Птицефабрика Мирная» показали его эффективность при лечении колибактериоза цыплят в дозах 100 и 150 мг/кг массы тела. Сохранность птицы при использовании препарата составила 99,7 и 99,8% соответственно. Применение комплексного препарата в дозе 75 мг/кг было менее эффективно, так как сохранность цыплят не превышала 99,1%.

Сравнительная оценка комплексного препарата и спелинк-44 показала, что эффективность применения комплексного препарата в дозе 100 мг/кг аналогична эффективности спелинк-44 в дозе 1,1 г/кг и превосходит ее при увеличении дозы до 150 мг/кг.

Результаты изучения эффективности комплексного препарата на основе клиндамицина и спектиномицина в производственных условиях показали, что препарат может быть использован в комплексе мероприятий для профилактики и лечения бактериальных инфекций птиц.

Результаты проведенных нами исследований по разработке лекарственной формы, методов контроля качества, изучению фармакотоксикологических свойств препарата и терапевтической эффективности были использованы при разработке нормативной документации.

## ВЫВОДЫ

1. Комплексный препарат на основе клиндамицина и спектиномицина – антибактериальный препарат широкого спектра действия. Клиндамицин активен в отношении стрептококков и стафилококков в концентрации 0,16-0,31 мкг/мл, а спектиномицин – в отношении эшерихий и сальмонелл в концентрации 6,3-12,5 мкг/мл.

2. Комбинация клиндамицина и спектиномицина обладает синергидным действием в отношении грамположительной микрофлоры. Спектиномицин в суббактериостатических концентрациях 3,1 мкг/мл усиливает антимикробные свойства клиндамицина в отношении стафилококков и стрептококков в 2-4 раза.

3. Комплексный препарат на основе клиндамицина и спектиномицина – лекарственная форма, стабильная в течение 3 лет хранения, характеризующаяся стандартными количественными и качественными параметрами.

4. Комплексный препарат на основе клиндамицина и спектиномицина по параметрам острой токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности – вещества малоопасные (для белых мышей  $LD_{50} > 60000$  мкг/мл).

5. Двухдневное введение белым мышам комплексного препарата в дозе превышающей терапевтическую в 15 раз не вызывает функциональных изменений в организме животных. Применение препарата в дозе в 30 и 60 раз выше терапевтической приводит к временному нарушению функции печени, восстанавливающейся через 10 дней после отмены комплексного препарата.

6. Двухдневное введение цыплятам комплексного препарата в дозах в 9-37 раз превышающих терапевтическую не вызывает функциональных изменений в организме птицы.

7. Однократное введение цыплятам комплексного препарата в дозе 150 мг/кг массы тела обеспечивает антибактериальные концентрации клиндамицина во внутренних органах на протяжении 21-24 часов, а клиндамицина и спектиномицина в желудочно-кишечном тракте на протяжении суток.

8. Введение комплексного препарата цыплятам с питьевой водой в дозе 5 г/л, позволяет уже через 3 ч создать терапевтические концентрации антибиоти-

ков в паренхиматозных органах и желудочно-кишечном тракте птицы и под-  
держивать их на протяжении всего курса лечения.

9. Остаточные количества клиндамицина и спектиномицина после пяти-  
дневного применения комплексного препарата с водой в дозе 5 г/л выводятся из  
организма птиц за 4 суток.

10. Применение комплексного препарата при колибактериозе цыплят в  
дозах 100 и 150 мг/кг массы тела позволяет обеспечить сохранность птицы на  
уровне 99,7-99,8%.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Разработана нормативная документация:

1. Проект технических условий на опытную партию комплексного препа-  
рата;
2. Проект временного наставления по применению комплексного препа-  
рата.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ионов С. Н., Виолин Б. В. Линкозамиды в ветеринарии.// Ветинформ.-  
2003. - № 2., - с. 6-7.
2. Ионов С. Н., Виолин Б. В., Шаповалова Л. Р. Микробиологические ме-  
тоды определения активности клиндамицина.// Аграрная наука. - 2003. - № 4.,  
с. 8-10.
3. Положительное решение Федерального института промышленной соб-  
ственности от 10.06.02 по заявке № 2002116003/13(016936) на патент "Препарат  
для профилактики и лечения инфекционных заболеваний животных и птиц бак-  
териальной этиологии".

13745

2003-A  

---

13745