

На правах рукописи



Игнатова Ирина Дмитриевна

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ФЛОРФЕНИКОЛА**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2007

8

Работа выполнена в отделе качества и стандартизации фармакологических лекарственных средств для животных Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук, доцент
Виолин Б.В.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Таланов Г.А.

кандидат биологических наук
Савенкова Е.Е.

Ведущая организация – Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» Россельхознадзора МСХ РФ (г. Казань).

Защита состоится «12» апреля 2007 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д. 220.011.01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») по адресу: Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д.5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ВГНКИ».

Автореферат разослан «17» апреля 2007 г.

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


Козырев Ю.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бактериальные инфекции птиц представляют серьезную проблему для современного птицеводства, как в Российской Федерации, так и во многих зарубежных странах. Среди них колибактериоз и сальмонеллез наносят значительный экономический ущерб, складывающийся из снижения яйценоскости и привесов, гибели эмбрионов, цыплят и взрослой птицы, затрат на оздоровление хозяйства (Н.Л.Андреева, М.Е. Дмитриева, 2004; А.Н. Борисенкова, 1999; Р.Н. Коровин, 1991).

Меры борьбы с бактериальными инфекциями включают в себя комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий, среди которых немаловажную роль играет использование антибактериальных лекарственных средств (В.Г. Бурун, 2001; Н.В. Кожемяка, 2002; В.П. Федотов, 1983).

Широкое внедрение в практику птицеводческих хозяйств антибактериальных препаратов и часто их нерациональное применение привело к распространению резистентных микроорганизмов, особенно в семействе энтеробактерий (Т.В. Вершняк, А.Я. Самуйленко, 2003; В.А. Кузьмин, В.П.Урбан, 1989; J. Asar, V. Rostel, 2003; S. Benredjeb, A. Hammami, 2003).

Развитие резистентности у микроорганизмов является основным фактором, ограничивающим эффективность антибактериальных препаратов. В связи с этим актуальным становится поиск новых путей предупреждения формирования устойчивости возбудителей бактериальных инфекций, одним из которых является химическая трансформация молекул антибиотиков, направленная на создание новых препаратов, активных в отношении резистентных микроорганизмов (Л.Е. Бриан, 1984; В.Ф. Ковалев, И.Б. Волков, Б.В. Виолин, 1988; Г.А. Ноздрин, А.И. Леляк, 1999).

Хлорамфеникол (левомицетин) в течение многих лет считался одним из наиболее эффективных антибиотиков в медицинской и ветеринарной практике. Однако, установленное в последние годы токсическое влияние антибиотика на гемопозз и иммунную систему, а также широкое распространение левомицетинрезистентных микроорганизмов значительно ограничили его применение. В настоящее время из-за потенциального риска токсического воздействия на организм человека остаточных количеств хлорамфеникола, содержащихся в продукции животноводства, антибиотик запрещен к применению продуктивным животным в США и странах Евросоюза (M. Cannon et al., 1990; Y. Ueda et al., 1995; A.A. Yunis, 1988).

В связи с этим возникла необходимость в разработке и изучении аналогов хлорамфеникола, обладающих, наряду с высокой антибактериальной активностью, отсутствием побочных эффектов, характерных для данного антибиотика. Путем химической модификации молекулы хлорамфеникола был синтезирован ряд новых соединений группы амфениколов, одним из которых является антибиотик широкого спектра действия - флорфеникол (E. Lavy, G. Ziv, 1991; D.J. Miller, 1991; H.C. Neu, 1980).

Некоторые особенности молекулярной структуры флорфеникола обуславливают снижение его токсичности и повышение антимикробной активности по сравнению с хлорамфениколом. Во-первых, замещение одной из гидроксильных групп на атом фтора делает флорфеникол нечувствительным к действию хлорамфениколацетилтрансферазы микроорганизмов, которая модифицирует структуру молекулы хлорамфеникола путем ацетилирования ОН-группы, вследствие чего антибиотик теряет противомикробные свойства. Поэтому микроорганизмы, устойчивые к хлорамфениколу, остаются чувствительными к флорфениколу (С. Kehrenberg, D. Meunier et al., 2006; К. Keyes, С. Hudson, 2000; S. Soback, M.J. Paape, 1995).

Во-вторых, в молекуле флорфеникола, в отличие от хлорамфеникола, отсутствует нитрогруппа, оказывающая токсическое влияние на систему кроветворения, что повышает безопасность его применения (R.A. Sams, 1994).

Учитывая, что флорфеникол не применялся ранее в ветеринарной практике на территории Российской Федерации, и в настоящее время к нему не должно существовать резистентных микроорганизмов, нам представляется целесообразным разработать на основе флорфеникола новую лекарственную форму препарата для лечения колибактериоза и сальмонеллеза птиц, изучить его фармако-токсикологические свойства и терапевтическую эффективность.

Цели и задачи исследования. Разработать на основе флорфеникола новый антибактериальный препарат для лечения колибактериоза и сальмонеллеза цыплят.

Для этого было необходимо:

- обосновать состав и разработать лекарственную форму антибактериального препарата на основе флорфеникола;
- разработать требования к качеству препарата и методы его контроля;
- определить стабильность препарата в процессе хранения;
- изучить острую и субхроническую токсичность антибактериального препарата в опытах на лабораторных животных и цыплятах;
- изучить фармакокинетику флорфеникола в организме птиц после однократного и курсового применения препарата;
- определить сроки выведения остаточных количеств флорфеникола из организма цыплят после применения препарата;
- определить терапевтическую эффективность антибактериального препарата на основе флорфеникола в производственных условиях и разработать схему его применения для лечения колибактериоза и сальмонеллеза цыплят.

Научная новизна. Впервые разработан антибактериальный препарат на основе флорфеникола в форме раствора для орального применения для лечения колибактериоза и сальмонеллеза цыплят.

Установлена чувствительность хлорамфениколрезистентных микроорганизмов к флорфениколу; изучены фармако-токсикологические свойства и определена терапевтическая эффективность антибактериального препарата на основе флорфеникола при лечении колибактериоза и сальмонеллеза цыплят.

Практическая значимость работы.

Разработан и предложен для ветеринарной практики новый антибактериальный препарат на основе флорфеникола в форме раствора для орального применения для лечения колибактериоза и сальмонеллеза цыплят.

Разработаны методы контроля качества антибактериального препарата и установлен срок его годности.

Определены сроки возможного убоя птиц на мясо после применения антибактериального препарата на основе флорфеникола.

Разработана схема применения антибактериального препарата на основе флорфеникола при колибактериозе и сальмонеллезе цыплят.

Разработана нормативная документация - технические условия и инструкция по применению антибактериального препарата на основе флорфеникола.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- Научное обоснование состава антибактериального препарата на основе флорфеникола.

- Качественные и количественные методы контроля антибактериального препарата на основе флорфеникола.

- Результаты изучения стабильности антибактериального препарата на основе флорфеникола при хранении.

- Результаты изучения острой и субхронической токсичности антибактериального препарата на основе флорфеникола в опытах на лабораторных животных и цыплятах.

- Результаты изучения фармакокинетики флорфеникола и определения сроков выведения остаточных количеств антибиотика из организма птиц после применения препарата.

- Результаты определения терапевтической эффективности антибактериального препарата при колибактериозе и сальмонеллезе цыплят.

- Практические предложения по применению антибактериального препарата на основе флорфеникола в птицеводстве.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 3 научные работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 155 листах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, выводы, практические предложения, список литературы. Работа иллюстрирована 38 таблицами, 5 графиками, 1 диаграммой и 1 рисунком. Список литературы содержит 238 источников, в том числе 105 иностранных. Приложение на 8 листах.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа выполнена в течение 2003-2007 гг. В опытах было использовано 156 беспородных белых мышей обоего пола массой 18-22 г и 205 цыплят разного возраста массой 450-900 г. Клиническое испытание препарата в производственных условиях проведено на 306480 цыплятах.

Определение чувствительности эшерихий, сальмонелл, стрептококков, стафилококков, пастерелл к флорфениколу проводили на мясопептонном агаре (МПА) методом серийных разведений в плотной питательной среде (С.М. Навашин, И.П. Фомина, 1982). Для сравнения определяли чувствительность этих же микроорганизмов к другому антибиотику группы амфениколов – хлорамфениколу.

В качестве тест-микроорганизмов использовали музейные культуры и выделенные от больных животных и птиц изоляты: *Escherichia coli* (сероварианты O₉:K₃₀; O₁; O₂; O₇₈; O₄; O₁₁₁; O₁₃₀; O₈; O₁₈; O₂₀; O₁₅; изоляты 1-4, 7, 27, 6/3, 4/1, 6/2, 1/5), *Salmonella enteritidis* (изоляты 1, 2, 4, 7, 11, 15, 27, G, 9/5, 2-23, 3/5), *Salmonella gallinarum-pullorum* (изоляты 24 КСТ, 10 Б, ЛБ, REV1), *Salmonella typhimurium* (изолят 371), *Pasterella multocida* (изоляты 1-8), *Staphylococcus aureus* (изоляты 1-23), *Streptococcus* spp. (изоляты 1-3).

За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотика для испытуемого тест-штамма принимали ту, при которой отсутствовали признаки роста микроорганизма.

При разработке лекарственной формы антибактериального препарата, учитывая, что флорфеникол практически не растворим в воде, необходимо было подобрать вспомогательный компонент с таким расчетом, чтобы он обеспечивал хорошую растворимость действующего вещества и его стабильность на протяжении всего срока хранения.

Принимая во внимание то, что современная технология применения лекарственных средств в птицеводстве предусматривает предварительное приготовление концентрированных водных растворов антибиотиков, которые постепенно добавляются в питьевую воду, были проведены опыты по изучению растворимости готовой лекарственной формы препарата в воде.

Для стандартизации и контроля качества антибактериального препарата, а также изучения его стабильности при хранении, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к лекарственным формам для орального применения, были предложены методики качественного и количественного контроля препарата с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения подлинности и массовой доли флорфеникола.

Стабильность антибактериального препарата изучали в соответствии с «Временной инструкцией по определению сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре». Для этого три опытные серии антибактериального препарата, расфасован-

ные в стеклянные флаконы по 10 мл, для «старения» помещали на хранение в термостаты при температурах 37 и 50 °С и исследовали через промежутки времени, соответствующие 6, 12, 18 и 24 месяцам хранения. Параллельно изучали стабильность антибактериального препарата в условиях естественного хранения при комнатной температуре (23±2 °С) в течение 24 месяцев.

Оценку качества препарата в процессе хранения проводили по показателям: внешний вид, цвет, прозрачность, окраска, плотность, подлинность и массовая доля флорфеникола.

Острую токсичность антибактериального препарата изучали на 36 беспородных белых мышах обоего пола массой 18-20 г и 30 цыплятах массой 350 - 400 г. Мышам препарат вводили в желудок при помощи шприца и иглы, на конце которой имелось булавовидное утолщение, однократно в дозах: 17255, 23006, 28758, 34509, 40260 и 46000 мг/кг. Цыплятам препарат вводили непосредственно в зоб через зонд, однократно в дозах: 14375, 21563, 25163, 28750 и 35947 мг/кг.

Наблюдение за клиническим состоянием подопытных животных проводили в течение 14 суток после введения препарата, учитывали количество погибших животных и рассчитывали основные токсикологические параметры (ЛД₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, ЛД₁₀₀) по методу Личфилда-Уилкоксона (М.Л. Беленький, 1969).

Субхроническую токсичность антибактериального препарата изучали на 120 беспородных белых мышах обоего пола с начальной массой 18-22 г. Подопытных животных по принципу аналогов разделили на 4 группы по 30 мышей в каждой.

Препарат мышам вводили в 2% растворе крахмала ежедневно в течение 20 суток, перорально при помощи шприца и иглы, на конце которой имелось булавовидное утолщение, в следующих дозах: 1 группе – 1/5 от ЛД₅₀ (6926 мг/кг массы животного); 2 группе – 1/10 от ЛД₅₀ (3463 мг/кг массы животного); 3 группе – 1/20 от ЛД₅₀ (1731 мг/кг массы животного); 4 группе (контрольная) – ПЭГ-300.

Наблюдение за клиническим состоянием мышей вели на протяжении 31 суток от начала опыта. Определение массы тела животных проводили до начала введения препарата и на 7, 14, 21 и 31 сутки опыта. Павших животных подвергали патологоанатомическому вскрытию. В процессе опыта учитывали количество погибших животных в зависимости от дозы, рассчитывали ЛД₅₀ при многократном введении и определяли коэффициент кумуляции, как отношение средних эффектов подострого и острого действий препарата (Lim и др., 1961).

Для выявления возможного гепатотоксического действия препарата на 21 и 31 сутки от начала введения на 10 мышах каждой группы проводили определение детоксицирующей функции печени с помощью гексеналовой пробы. Гексенал белым мышам вводили внутрибрюшинно в форме 0,2% раствора в дозе 60 мг/кг массы тела. 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 компенсаторно-приспособительные способности организма с помощью функциональной пробы плаванием и определяли относительную массу (коэффициенты) внутренних органов: печени, почек, сердца, легких, селезенки, учитывая, что изменение массы органа, как правило, связано с изменением его функциональных способностей (В.Н. Гацура, 1976).

Субхроническую токсичность антибактериального препарата изучали на 60 цыплятах массой 450-500 г, разделенных по принципу аналогов на 4 группы по 15 птиц в каждой.

Антибактериальный препарат выпаивали разведенным в воде в течение 20 суток в следующих дозах: 1 группа – 100 мг/кг массы тела (пятикратная терапевтическая доза); 2 группа – 40 мг/кг массы тела (двукратная терапевтическая доза); 3 группа – 20 мг/кг массы тела (терапевтическая доза); 4 группа – вода без препарата (контроль). Вода с растворенным в ней антибактериальным препаратом являлась единственным источником питья для птиц опытных групп.

Наблюдение за клиническим состоянием цыплят вели на протяжении 31 суток от начала опыта. Определение массы тела цыплят проводили до начала применения препарата и на 7, 14, 21 и 31 сутки опыта. На 21 и 31 сутки от начала введения препарата проводили клиническое и биохимическое исследование крови цыплят и определяли относительную массу (весовые коэффициенты) внутренних органов птицы – печени, легких, почек, сердца, селезенки. О функциональном состоянии печени судили по результатам определения активности гепатоспецифических ферментов (аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ)), почек – по содержанию креатинина и мочевины в сыворотке крови.

Фармакокинетику флорфеникола после однократного перорального введения антибактериального препарата изучали на 65 цыплятах массой 800-900 г, которых по принципу аналогов разделили на 2 группы: контрольную (5 голов) и опытную (60 голов). Все цыплята находились в одинаковых условиях содержания. До и во время опыта цыплята не получали никаких лекарственных препаратов. За 2 ч до начала эксперимента птица не получала корм и воду. Сразу после введения препарата цыплята имели свободный доступ к воде и корму.

Антибактериальный препарат птице вводили разведенным в воде через зонд в зоб в дозе 20 мг/кг массы тела. Через 20; 40 минут, 1; 2; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21 и 24 часа после введения препарата убивали по 5 цыплят и брали у них кровь для исследования. У цыплят, убитых через 20 минут, 1; 3; 6; 12; 18 и 24 часа после введения, дополнительно отбирали образцы скелетной и сердечной мускулатуры, печени, почек, легких, содержимого мышечного желудка, тонкого и толстого кишечника.

Определение содержания флорфеникола в образцах сыворотки крови и органов цыплят проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Предел количественного определения составил 0,1 мкг/мл (г).

Концентрацию флорфеникола в содержимом мышечного желудка, тонкого и толстого отделов кишечника определяли микробиологическим методом

диффузии в агар с тест-культурой *Bacillus subtilis* var. L₂ (В.Ф. Ковалев и др., 1988). Предел количественного определения составил 2,5 мкг/мл (г).

Изучение фармакокинетики флорфеникола в сыворотке крови птиц при постоянном поступлении препарата с водой проводили на 25 цыплятах массой 800-900 г. В течение 5 дней в качестве единственного источника питья все цыплята получали воду, содержащую антибактериальный препарат в количестве 2 мл/л, что соответствовало суточной терапевтической дозе 20 мг/кг массы тела. Через 1, 2, 4 и 5 суток от начала применения препарата, после утреннего кормления отбирали кровь у 5 цыплят. В образцах сыворотки крови определяли содержание флорфеникола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определение сроков выведения остаточных количеств флорфеникола из организма птиц после применения антибактериального препарата проводили на 25 цыплятах массой 700-800 г, которым ежедневно в течение 5 суток давали питьевую воду с разведенным в ней препаратом в концентрации 2 мл/л, что соответствовало суточной терапевтической дозе 20 мг/кг массы тела. Через 1, 2, 3, 4 и 5 суток после окончания применения препарата убивали по 5 цыплят и определяли содержание флорфеникола в сыворотке крови, печени, почках, мышцах, сердце, легких, коже и жире методом ВЭЖХ. Предел количественного определения составил 0,1 мкг/г.

Терапевтическую эффективность антибактериального препарата на основе флорфеникола при сальмонеллезе, колибактериозе, в том числе, осложненных стрептококкозом и стафилококкозом, изучали на 306480 цыплятах-бройлерах в хозяйствах Тюменской, Нижегородской, Свердловской областей и Краснодарского края.

Диагноз заболевания ставили комплексно, с учетом эпизоотической ситуации в хозяйстве, клинической картины заболевания, результатов патологоанатомического и бактериологического исследований.

Для определения наиболее эффективной дозы антибактериальный препарат применяли при колибактериозе цыплят-бройлеров, разделенных на три равные группы, состоящие из птиц одного возраста, массы тела, тяжести течения заболевания, с питьевой водой в суточных дозах: 1,5; 2,0 и 2,5 мл на 1 л, что составляло, соответственно, 15, 20 и 25 мг/кг массы тела по действующему веществу. Дальнейшие исследования продолжили с наиболее эффективной дозой.

Эффективность антибактериального препарата на основе флорфеникола при колибактериозе и сальмонеллезе цыплят изучали в сравнении с наиболее эффективными препаратами аналогичного назначения на основе доксицилина (доксивит 100 SP, польодоксин) и энрофлоксацина (энрофлон 10%, энрофлокс 10% и киноэкс), применяемыми в соответствии с инструкциями, утвержденными Россельхознадзором.

Для оценки эффективности антибактериального препарата учитывали: сохранность птиц, гибель цыплят, продолжительность курса лечения, кратность применения антибактериального препарата, среднесуточные привесы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики, используя руководство Ю.С.Малеты и В.В.Тарасова (1982).

Результаты исследований

В результате изучения антибактериальной активности флорфеникола и хлорамфеникола в опытах in vitro установлено (таблица 1), что большинство изученных микроорганизмов оказались более чувствительными к флорфениколу.

Табл. 1. Чувствительность микроорганизмов к флорфениколу и хлорамфениколу

Род микроорганизмов	Флорфеникол		Хлорамфеникол	
	МПК ₅₀	МПК ₉₀	МПК ₅₀	МПК ₉₀
Эшерихии (n=23)	1,55	6,25	12,5	> 100
Сальмонеллы (n=16)	1,55	3,12	3,12	6,25
Пастереллы (n=8)	1,55	1,55	6,25	12,5
Стафилококки (n=23)	1,55	3,12	3,12	6,25
Стрептококки (n=3)	1,55	1,55	6,25	12,5

Минимальная подавляющая концентрация, действующая на 50% микроорганизмов, для флорфеникола составила 1,55 мкг/мл, что в зависимости от вида в 2-8 раз ниже МПК₅₀ хлорамфеникола (3,12-12,5 мкг/мл). Минимальная подавляющая концентрация флорфеникола, действующая на 90% микроорганизмов составила 1,55-6,25 мкг/мл, что также в 2-16 раз ниже, чем МПК₉₀ хлорамфеникола (6,25-100 мкг/мл) в отношении большинства изученных бактерий.

Следует отметить, что 52% эшерихий и 12,5% сальмонелл, устойчивых к хлорамфениколу, сохраняли при этом чувствительность к флорфениколу.

Высокая антимикробная активность флорфеникола в отношении большинства возбудителей бактериальных инфекций птиц, в том числе резистентных к хлорамфениколу, позволила нам выбрать его в качестве действующего вещества при создании лекарственной формы.

При разработке лекарственной формы учитывали, что добавление лекарственных средств в воду дает возможность одновременного их применения большому поголовью птицы, повышает точность дозирования. В крови у птицы достигается необходимый уровень действующих веществ, который затем легко поддерживается постоянным потреблением воды с растворенным в ней препаратом в течение требуемого времени. Наконец, заболевшая птица часто отказывается от корма, но продолжает пить воду, обеспечивая поступление лекарственного средства в организм.

Поэтому препарат предложен в форме раствора для орального применения, который добавляют в воду и выпаивают птице, что облегчает введение лекарства большому поголовью в условиях птицефабрики.

Учитывая, что флорфеникол практически не растворим в воде, при создании лекарственной формы вспомогательное вещество в препарате было подобрано с таким расчетом, чтобы оно, с одной стороны, обеспечивало хорошую растворимость действующего вещества, а с другой – стабильность лекарственного средства на протяжении всего срока хранения.

В качестве возможных вспомогательных компонентов препарата нами были выбраны три органических соединения: полиэтиленгликоль – 300, полиэтиленгликоль – 400 и пропиленгликоль, разрешенные к применению в качестве растворителей для изготовления лекарственных форм.

Опытным путем нами было установлено, что максимальная концентрация флорфеникола, полностью растворяющаяся в 100 мл полиэтиленгликолей – 300 и 400, составила 10 г. Флорфеникол практически не растворялся в пропиленгликоле, начиная выпадать в осадок уже после добавления его в концентрации 5%. В связи с этим дальнейшие исследования были продолжены с полиэтиленгликолями.

Установлено, что скорость растворения флорфеникола в полиэтиленгликоле – 300 была в 1,5 раза выше, чем в полиэтиленгликоле – 400, что связано с различием молекулярного веса соединений, с повышением которого увеличивается вязкость, что замедляет растворение действующего вещества.

Учитывая, что современная технология применения водорастворимых препаратов в птицеводстве предусматривает предварительное приготовление их концентрированных водных растворов, в ходе дальнейших опытов с лекарственными формами флорфеникола, изготовленными с использованием полиэтиленгликолей с различным молекулярным весом, было установлено, что препарат на основе полиэтиленгликоля – 300 растворяется в воде в 5% концентрации, а полиэтиленгликоля - 400 – только в 1% концентрации.

На основании полученных результатов разработана лекарственная форма для орального применения, содержащая 10% флорфеникола в полиэтиленгликоле – 300, который, с одной стороны, обеспечивал быстрое растворение действующего вещества в процессе изготовления опытных серий, что имеет значение при промышленном производстве лекарственного средства, а с другой стороны, позволял приготовить концентрированные водные растворы препарата в соответствии с требованиями современной технологии применения лекарственных средств в птицеводстве.

Для стандартизации и контроля качества антибактериального препарата, а также изучения его стабильности при хранении нами предложены качественные и количественные методы исследований в соответствии с требованиями, предъявляемыми к растворам для орального применения, включающие: определение внешнего вида и цвета, прозрачности, окраски, относительной плотности, подлинности и массовой доли действующего вещества.

Определение окраски, прозрачности и плотности антибактериального препарата проводили по методикам, изложенным в Государственной фармакопее XI. При определении окраски для сравнения был выбран эталон № 36. В качестве эталонного раствора для определения прозрачности нами был предложен полиэтиленгликоль – 300, являющийся основой препарата.

Для характеристики качества препарата, особенно в процессе его хранения, предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который позволяет определить не только содержание действующего вещества, но и обнаружить, в случае наличия, продукты его распада.

Для определения флорфеникола в препарате методом ВЭЖХ был подобран элюент: ацетонитрил / 0,01 М раствор ацетата натрия, взятые в соотношении 50 к 100, а также оптимальные условия хроматографирования на колонке Waters Spherisorb S50DS2 4.6 x 250 mm №95/316: температура процесса - $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, скорость протока - 700 $\mu\text{l}/\text{min}$, длина волны - 220 нм. Установлено, что в данных условиях время выхода пика флорфеникола составляет ~ 5 мин.

На основании проведенных исследований были установлены требования к качеству готовой лекарственной формы для орального применения на основе флорфеникола, которые вошли в проект технических условий (таблица 2)

Табл. 2. Требования к качеству антибактериального препарата

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Внешний вид	Раствор от бесцветного до светло – желтого цвета
Прозрачность раствора	Выдерживает сравнение с полиэтиленгликолем – 300
Окраска раствора	По интенсивности не превышает эталон № 36
Плотность, г/см ³	1,140 – 1,160
Подлинность флорфеникола	Время выхода пика образца препарата должно соответствовать времени выхода пика стандартного образца флорфеникола
Массовая доля флорфеникола, %	9,0 – 11,0

Предложенные качественные и количественные методы контроля антибактериального препарата позволяют обеспечить оптимальный уровень качества лекарственного средства в процессе его производства, хранения и применения.

При определении стабильности трех опытных серий препарата в процессе хранения оценку качества проводили по основным показателям: внешний вид, прозрачность, окраска, плотность и содержание действующего вещества. Установлено, что в течение срока наблюдения качественных и количественных изменений в составе лекарственного средства не происходит.

Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в процессе изучения стабильности позволило определить, что продуктов распада флорфеникола в период установленного срока годности не образуется.

Таким образом, минимальный срок годности антибактериального препарата на основе флорфеникола составляет 2 года, в течение которых он характеризуется заданными качественными и количественными параметрами.

В результате изучения острой токсичности препарата (таблица 3) на лабораторных животных и птице, установлено, что в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 лекарственное средство может быть отнесено к IV классу опасности – вещества малоопасные (LD_{50} для белых мышей при введении в желудок > 5000 мг/кг). По классификации Медведя (1964 г.) препарат можно отнести к малотоксичным соединениям ($LD_{50} > 1000$ мг/кг) как для мышей, так и для птиц.

Табл. 3. Параметры токсичности антибактериального препарата

Вид животных	Показатель (мг/кг)				
	Максимально переносимая доза	LD_{16}	LD_{50}	LD_{84}	Абсолютно-смертельная доза
Мыши	17255	27005	34628 (29851+4016)	42250	46000
Цыплята	14375	22000	25700 (22948+2878)	29500	35947

В процессе изучения субхронической токсичности препарата на лабораторных животных установлено, что длительное введение максимальной дозы препарата (1/5 от LD_{50}) вызвало гибель части мышей в группе что, позволило рассчитать коэффициент кумуляции как отношение LD_{50} при многократном введении (81870 мг/кг) к LD_{50} при однократном введении (34628 мг/кг) препарата.

Коэффициент кумуляции составил 2,36 и был >1 , что по классификации К. Лима (1961 г.) свидетельствует о развитии повышенной резистентности организма животных к препарату и отсутствию выраженных кумулятивных свойств. В остальных группах гибели мышей не было.

У мышей, длительно получавших препарат в дозе 1/5 от LD_{50} , отмечали достоверное ($p < 0,05$) снижение массы тела по сравнению с первоначальной и контролем, что, видимо, было связано, с одной стороны - с нарушением процессов всасывания из-за развития катарального воспаления желудочно-кишечного тракта, обнаруженного при вскрытии павших животных, а с другой стороны - с угнетением темпов анаболических процессов наивысшей дозой препарата.

Достоверное ($p < 0,05$) увеличение прироста живой массы мышей, получавших дозы 1/10 и 1/20 от LD_{50} по сравнению с контролем, вероятно, связано с характерным, как и для других антибактериальных соединений, ростостимулирующим действием флорфеникола.

При оценке детоксицирующей функции печени на 21 сутки после начала введения препарата было установлено (таблица 4) достоверное ($p < 0,05$) увеличение продолжительности гексеналового сна во всех опытных группах по сравнению с контрольной, что может свидетельствовать об ингибировании флорфе-

ником микросомальных ферментов гепатоцитов и замедлении метаболизма гексенала.

Результаты пробы плаванием свидетельствуют (таблица 4), что длительное применение лекарственного средства не влияет на компенсаторно-приспособительные способности организма. Продолжительность плавания мышей в опытных и контрольной группах достоверно не отличалась.

Табл. 4. Влияние антибактериального препарата на функциональное состояние организма мышей

Доза от ЛД ₅₀	Продолжительность сна (мин.)		Время плавания (мин.)	
	21 день	31 день	21 день	31 день
1/5	52,49±2,96*	-	-	-
1/10	44,51±3,46*	18,07±1,02	10,38±0,42	9,47±0,76
1/20	34,63±3,08*	18,77±1,88	10,06±0,59	9,31±0,38
Контроль	22,10±3,10	18,27±1,47	11,02±0,40	9,68±0,42

* $p < 0,05$

Достоверное ($p < 0,05$) увеличение весовых коэффициентов печени мышей после применения препарата в дозах 1/5 и 1/10 от ЛД₅₀ и почек у животных, получавших дозу 1/5 от ЛД₅₀, на 21 сутки опыта может свидетельствовать об участии данных органов в метаболизме и выведении флорфеникола из организма, что в дальнейшем было подтверждено при изучении фармакокинетики.

Следует отметить, что все функциональные изменения в организме мышей, установленные в процессе изучения субхронической токсичности, носили обратимый характер, восстанавливаясь через 10 суток после прекращения введения препарата.

В результате изучения субхронической токсичности антибактериального препарата в опытах на птице установлено, что его длительное применение не вызывало гибели и видимых клинических изменений в организме цыплят опытных групп.

Табл. 5. Динамика изменения массы цыплят в течение опыта

Доза препарата	Привес по отношению к начальной массе цыплят (в граммах) через			
	7 суток	14 суток	21 сутки	31 сутки
5 х терапевтическая	+59,8	+ 110,5	+ 197,3	+ 290,4
2 х терапевтическая	+55,3	+ 103,7	+ 196,6	+ 283,8
Терапевтическая	+ 119,5*	+ 147,5*	+ 229, 7*	+ 292,5
Контроль	+ 60,5	+ 99,8	+ 192,5	+ 289,7

* $p < 0,05$

Применение препарата в терапевтической дозе приводило к достоверному ($p < 0,05$) увеличению интенсивности прироста массы цыплят по сравнению с остальными опытными и контрольной группой (таблица 5), что свидетельству-

ет о возможном стимулирующем действии флорфеникола, как и других антибиотиков, на течение анаболических процессов у птиц в данной дозе. Однако уже через 10 суток после отмены лекарственного средства привес в этой группе достоверно не отличался от контроля.

Табл. 6. Клинические показатели крови цыплят на 21 и 31 сутки опыта

Показатели/доза		5 x терапевтическая	2 x терапевтическая	Терапевтическая	Контроль
21 сутки					
Лейкоциты (тыс/мкл)		11,45±1,31*	11,14±0,62*	14,78±1,11*	16,74±3,01
Лейкограмма, %	Базофилы	1,50±0,36	1,20±0,20	1,25±0,27	1,33±0,39
	Эозинофилы	2,00±0,37	2,33±0,62	2,80±0,60	2,00±0,72
	Псевдоэозинофилы	50,17±2,66*	45,55±1,59*	52,85±1,94*	42,96±3,57
	Лимфоциты	45,00±2,13*	49,42±1,99*	41,43±2,44*	52,71±4,22
	Моноциты	1,33±0,39	1,50±0,54	1,67±0,77	1,00±0,58
31 сутки					
Лейкоциты (тыс/мкл)		10,10±0,72	10,80±1,02	11,52±0,70	11,34±0,73
Лейкограмма, %	Базофилы	1	1	1	1
	Эозинофилы	1,75±0,54	1,85±0,65	1,50±0,54	1,66±0,77
	Псевдоэозинофилы	45,98±1,47	45,37±1,89	43,12±0,74	44,33±2,61
	Лимфоциты	47,00±3,26	46,00±2,19	46,83±2,67	47,62±3,03
	Моноциты	1,21±0,13	1,02±0,55	1,38±0,73	1,28±0,72

* $p < 0,05$

Основные клинические показатели крови цыплят опытных групп (содержание эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина, гематокрит, цветной показатель и СОЭ) на 21 сутки после начала опыта достоверно ($p > 0,05$) не отличались от показателей контрольной группы. Однако при анализе лейкограммы (таблица б) после двадцатидневного применения препарата у цыплят опытных групп установлено возникновение относительного лейкоцитоза, сопровождающегося достоверным ($p < 0,05$) уменьшением общего количества лейкоцитов, на фоне которого происходило достоверное увеличение содержания нейтрофилов (псевдоэозинофилов) и снижение числа лимфоцитов по сравнению с контролем.

Уменьшение общего числа лейкоцитов за счет снижения количества лимфоцитов (агранулоцитов) может свидетельствовать об угнетающем действии препарата при длительном двадцатидневном применении в большей степени на лимфопоз, чем на костномозговое кроветворение.

Через 10 суток после отмены препарата (таблица 6) лейкограмма крови птиц опытных групп достоверно ($p > 0,05$) не отличалась от контроля, что свидетельствует об обратимом влиянии препарата на систему кроветворения.

По результатам биохимического анализа крови после двадцатидневного применения препарата у цыплят опытных групп наблюдали достоверное ($p < 0,05$) увеличение содержания АЛТ в сыворотке крови (таблица 7).

Табл. 7. Биохимические показатели крови цыплят на 21 сутки опыта

Доза препарата	АЛТ (мкмоль/л)	АСТ (мкмоль/л)	Мочевина (ммоль/л)	Креатинин (мкмоль/л)
5 х терапевтическая	28,50±2,07*	166,13±13,20	1,88±0,07*	42,12±3,14*
2 х терапевтическая	28,63±3,14*	164,38±8,54	1,75±0,10*	39,88±2,60*
Терапевтическая	30,37±1,59*	153,88±5,16	1,40±0,12	36,19±2,71
Контроль	26,63±1,44	149,88±11,07	1,21±0,11	32,50±2,60

* $p < 0,05$

Учитывая, что при нарушении функции печени, как правило, активность аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы изменяется одновременно, то полученные данные свидетельствуют только о возможной тенденции развития гепатотоксического действия при длительном применении флорфеникола.

Содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови цыплят, получавших дозы, превышающие терапевтическую в 2 и 5 раз, после двадцатидневного введения препарата были достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в контроле (таблица 7), и возрастали с увеличением дозы, что может свидетельствовать о возможном развитии дозозависимого нефротоксического эффекта при длительном применении препарата. Очевидно, это связано с участием почек в процессе выведения флорфеникола из организма.

Через 10 суток после отмены препарата достоверных различий в функции печени и почек у цыплят опытных и контрольной групп не наблюдалось, что говорит об обратимости изменений, происходящих в организме птиц под воздействием флорфеникола.

Следует отметить, что изменения функции внутренних органов не сопровождались достоверными изменениями их весовых коэффициентов, что может свидетельствовать о начальной стадии развития токсического эффекта в организме цыплят.

Так как длительность применения препарата с лечебной целью не должна превышать 5 суток, то развитие вышеописанных побочных эффектов, возникающих при длительном применении, практически исключается. Тем не менее, выявленные токсикологические свойства были учтены при разработке инструкции по применению препарата.

Фармакокинетические исследования показали, что флорфеникол быстро всасывался из желудочно-кишечного тракта и попадал в кровь (график 1), где уже через 20 минут обнаруживался в концентрации, в 3-8 раз превышающей

МПК для большинства чувствительных микроорганизмов, и сохранялся на протяжении 9 часов, что может свидетельствовать о быстром поступлении антибиотика в экстравазкулярные ткани.

График 1. Фармакокинетика флорфеникола в сыворотке крови цыплят



Полученные средние значения концентраций флорфеникола в сыворотке крови цыплят подвергались фармакокинетической оценке в рамках двухкамерной модели с учетом всасывания, описываемые уравнением:

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} - (A+B)e^{-kt}, \text{ где}$$

C – концентрация флорфеникола в сыворотке;

A и B – величина отрезка на оси ординат при экстраполяции прямой к моменту времени $t=0$ в фазу распределения и элиминации, соответственно;

α , β , k , e – фармакокинетические константы.

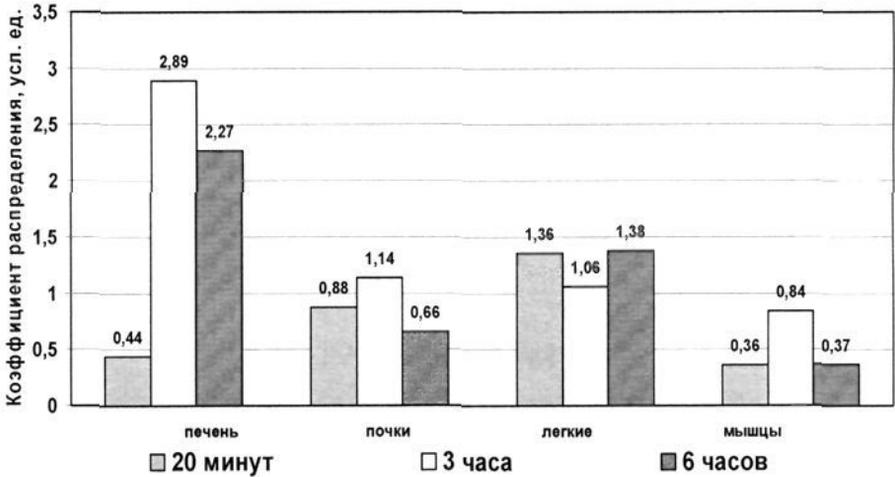
Основные фармакокинетические параметры флорфеникола характеризовались: высоким значением максимальной концентрации ($C_{\max}=14,1$ мкг/мл), быстрым временем ее достижения ($t_{\max}=40$ мин), слабой степенью связывания с белками сыворотки, о чем свидетельствует высокое значение кажущегося объема распределения препарата в центральной камере ($Vd_c=4930,3$ мл/кг), высоким объемом стационарного распределения препарата ($Vd_{ss}=18814,6$ мл/кг), что является показателем хорошего проникновения антибиотика в органы и ткани.

В почках, легких и сердце цыплят максимальные концентрации флорфеникола отмечали уже через 20 минут (соответственно 10,99, 16,95 и 10,17 мкг/г), а в скелетной мускулатуре и печени через 1 час после введения препарата (соответственно 6,75 и 8,43 мкг/г).

По результатам изучения содержания флорфеникола в органах и тканях цыплят, для печени, почек, легких и скелетной мускулатуры были рассчитаны

коэффициенты распределения (K_p), как отношение концентрации флорфеникола в органе к концентрации его в сыворотке крови (диаграмма 1), что характеризует степень проникновения антибиотика в ткани организма и способность последних к избирательному захвату фармакологических веществ из кровяного русла.

Диаграмма 1. Коэффициенты распределения флорфеникола в органах цыплят



Анализ коэффициентов свидетельствует о хорошем распределении флорфеникола в органах с интенсивным кровоснабжением (K_p для легких в среднем составил 1,42, для печени 1,87, для почек 0,90) и о более низкой степени проникновения антибиотика в умеренно васкуляризованную мышечную ткань (K_p в среднем составил 0,52). Высокие концентрации флорфеникола, обнаруженные в печени и почках цыплят, подтверждают участие этих органов в накоплении, метаболизме и выделении препарата.

Следует отметить, что концентрация флорфеникола в органах превышала сывороточную ($K_p > 1$) и поддерживалась на высоком уровне в течение 18-24 часов, что обеспечивает лучший терапевтический эффект препарата, так как колибактериоз и сальмонеллез цыплят, как правило, характеризуются локализацией возбудителя в паренхиматозных органах.

Результаты изучения распределения флорфеникола в желудочно-кишечном тракте свидетельствуют о способности антибиотика быстро создавать в нем концентрации (348 мкг/г в желудке, 89 мкг/мл в тонком кишечнике, 16 мкг/г в толстом кишечнике), в несколько раз превосходящие антибактериальные (1,55 – 6,25 мкг/мл) для большинства чувствительных микроорганизмов, которые поддерживаются на протяжении 18-24 часов, что является особенно актуальным при лечении колибактериоза и сальмонеллеза, когда возбудитель локализуется в кишечнике.

В процессе изучения фармакокинетики флорфеникола в организме птиц при постоянном поступлении препарата установлено, что его антибактериальные концентрации в сыворотке крови (1,3 мкг/мл) поддерживались с незначительными колебаниями на протяжении 5 дней, что обеспечит достижение терапевтического уровня препарата в организме цыплят в производственных условиях на протяжении всего курса лечения.

При определении сроков выведения остаточных количеств флорфеникола установлено, что антибиотик не аккумулируется в органах и тканях и быстро выводится из организма. Через сутки после окончания применения препарата флорфеникол обнаруживался только в коже, жировой ткани, печени и легких в концентрации 0,2 – 0,3 мкг/г. На вторые сутки после последнего введения препарата антибиотик регистрировали в следовых количествах только в печени. На 3 сутки после окончания применения препарата содержание флорфеникола в органах было ниже предела количественного определения метода (0,1 мкг/г), что дает основание рекомендовать убой птиц на мясо по истечении этого срока.

Изучение терапевтической эффективности препарата в разных дозах показало (таблица 8), что при повышении дозы лекарственного средства с 2,0 до 2,5 мл/л воды (с 20 до 25 мг/кг массы тела) достоверных различий ($p > 0,05$) в показателях сохранности (96,71% и 96,75%, соответственно) и среднесуточных привесов цыплят (48,9 г и 48,8 г, соответственно) не наблюдалось. Применение антибактериального препарата в дозе 1,5 мл/л воды (15 мг/кг массы тела) было менее эффективным, так как обеспечивало сохранность лишь 91,19% цыплят.

Табл. 8. Эффективность антибактериального препарата в разных дозах

Показатели	Доза препарата по группам, мл/л воды		
	1,5	2,0	2,5
Кол-во цыплят в группе (голов)	21000	21000	21000
Возраст цыплят (дней)	2-6	2-6	2-6
Курс лечения (дней)	5	5	5
Среднесуточный привес (г)	44,5	48,9	48,8
Масса в конце откорма (г)	1895	1994	1987
Кол-во павших цыплят (голов)	1850	690	681
Сохранность (%)	91,19	96,71	96,75

Так как эффективность препарата в дозах 2,0 и 2,5 мл/л воды практически одинакова, то с экономической точки зрения более целесообразно применять лекарственное средство в суточной дозе 2,0 мл/л воды.

При сравнении эффективности лекарственных средств на основе доксициклина и энрофлоксацина и антибактериального препарата на основе флорфеникола при колибактериозе и сальмонеллезе цыплят установлено (таблица 9), что его применение обеспечило высокую сохранность птиц, которая на 2,5 - 4,5%, в зависимости от заболевания, превышала эффективность препаратов

сравнения, позволило сократить гибель цыплят в 1,5 - 3,5 раза и повысить среднесуточные привесы на 3 г, по сравнению с лекарственными средствами на основе доксициклина и энрофлоксацина.

Табл. 9. Эффективность антибактериального препарата на основе флорфеникола при бактериальных инфекциях цыплят-бройлеров

Показатели	Препарат на основе флорфеникола	Энрофлокс	Препарат на основе флорфеникола	Польодоксин, Кинозкс	Препарат на основе флорфеникола	Доксивит
	Колибактериоз		Колибактериоз, осложненный стрептококкозом и стафилококкозом		Сальмонеллез	
Количество цыплят (голов)	21600	28800	64180	62900	33000	33000
Пало цыплят (голов)	575	2071	3657	5815	1386	2211
Срок лечения (дней)	4	5	3	3	3	3
Количество курсов	1	2	2	3	3	3
Среднесуточный привес (г)	47,36	44,03	43,20	39,80	45,90	43,30
Сохранность (%)	97,13	92,52	94,45	91,24	95,80	93,30

Лекарственное средство хорошо переносилось птицей, в том числе и при назначении повторными курсами, не вызвало осложнений при применении в сочетании со средствами специфической профилактики.

Таким образом, результаты изучения эффективности в производственных условиях позволяют считать, что разработанный антибактериальный препарат на основе флорфеникола в суточной дозе 2 мл/л воды (20 мг/кг массы тела по действующему веществу) в течение 3-5 дней может быть использован в комплексе ветеринарных мероприятий при колибактериозе и сальмонеллезе цыплят.

Результаты проведенных исследований по разработке лекарственной формы, методов контроля качества, изучению фармако-токсикологических свойств и терапевтической эффективности были использованы при разработке технических условий и инструкции по применению антибактериального препарата на основе флорфеникола.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый антибактериальный препарат на основе флорфеникола в форме раствора для орального применения для лечения колибактериоза и сальмонеллеза цыплят. Установлено, что флорфеникол по антибактериальной активности в отношении эшерихий, сальмонелл, пастерелл, стафилококков и стрептококков в 2-16 раз превосходит хлорамфеникол. Флорфеникол активен в отношении микроорганизмов, устойчивых к хлорамфениколу.

2. Антибактериальный препарат на основе флорфеникола отвечает стандартным требованиям, предъявляемым к лекарственным формам для орального применения и стабилен в течение 2 лет хранения.

3. Антибактериальный препарат на основе флорфеникола по параметрам острой токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу опасности – вещества малоопасные (LD_{50} для белых мышей составляет 34628 мг/кг), не обладает кумулятивными свойствами ($K_{кум} - 2,36$) и имеет большую терапевтическую широту (терапевтический индекс равен 128,5).

4. Двухдневное применение антибактериального препарата белым мышам в дозах 1/5, 1/10 и 1/20 от LD_{50} не вызывает нарушения компенсаторно-приспособительных способностей, но приводит к обратимому нарушению детоксицирующей функции печени, восстанавливающейся до физиологической нормы через 10 дней после отмены препарата.

5. Длительное применение антибактериального препарата в дозах 20, 40 и 100 мг/кг может вызывать временные функциональные изменения в организме птиц со стороны системы кроветворения (лейкопения), печени (повышение активности АЛТ), а в дозах 40 и 100 мг/кг – почек (увеличение содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови), не сопровождающиеся достоверными изменениями весовых коэффициентов внутренних органов, и восстанавливающиеся до физиологической нормы через 10 дней после отмены препарата.

6. Фармакокинетика флорфеникола после однократного перорального введения птице в дозе 20 мг/кг массы тела характеризуется высоким значением максимальной концентрации антибиотика ($C_{max} = 14,10$ мкг/мл) и быстрым временем ее достижения ($t_{max} = 40$ мин), большим объемом стационарного распределения препарата ($Vd_{ss} = 18814,6$ мл/кг) и антибактериальными концентрациями в органах, тканях и желудочно-кишечном тракте, сохраняющимися на протяжении 18-24 часов.

7. Применение антибактериального препарата цыплятам с питьевой водой в дозе 20 мг/кг массы тела в течение 5 суток позволяет на протяжении всего курса лечения поддерживать антибактериальные концентрации флорфеникола в организме птиц.

8. Остаточные количества флорфеникола после пятидневного применения антибактериального препарата с водой в суточной дозе 20 мг/кг массы тела полностью выводятся из организма птиц через 3 суток.

9. Применение антибактериального препарата при колибактериозе и сальмонеллезе цыплят, в том числе осложненных стафилококкозом и стрепто-

коккозом, в суточной дозе 20 мг/кг массы тела в течение 3-5 дней обеспечивает сохранность поголовья птиц на уровне 92,1-97,1%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. В результате проведенных исследований разработано и предложено для использования в ветеринарной практике новое антибактериальное лекарственное средство на основе флорфеникола в форме раствора для орального применения для лечения колибактериоза и сальмонеллеза цыплят.

2. Результаты исследований нашли отражение в разработанной нормативной документации, которая передана для регистрации лекарственного средства в Российской Федерации в Россельхознадзор:

- технических условиях ТУ 9348-053-47611900-2007 «Флорикол раствор для орального применения»;
- инструкции по применению Флорикола раствора для орального применения в ветеринарии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Виолин Б.В., Игнатова И.Д., Игнатова А.Д. Изучение токсичности лекарственной формы флорфеникола для перорального применения в опытах на лабораторных животных. // Сборник научных трудов ВГНКИ, 2006.–Т. 67. – С. 175-181.

2. Игнатова И.Д., Виолин Б.В. Изучение токсичности флорфеникола в опытах на цыплятах. // Аграрная наука. – 2006. - №5. – С.29-32.

3. Игнатова И.Д., Русаков С.В. Изучение фармакокинетики лекарственной формы флорфеникола в организме цыплят. // Аграрная наука. –2007.– №3. – С. 30 - 33.

Заказ № 97/02/07 Подписано в печать 19 02 2007 Тираж 100 экз Усл п л 1,25



ООО "Цифровичок", тел (495) 797-75-76, (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru