

УДК [619:615.33]:618.14-002

РАЗРАБОТКА И СВОЙСТВА АНТИБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ГИСТЕРОСАН МК-2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОРОВ С МЕТРИТОМ И ЭНДОМЕТРИТОМ

Г. Ф. МЕДВЕДЕВ, О. Т. ЭКХОРУТОМВЕН

*УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407*

Н. И. ГАВРИЧЕНКО, П. А. КРАСОЧКА

*УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026*

В. Н. БЕЛЯВСКИЙ

*УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь, 230008*

(Поступила в редакцию 01.03.2019)

Данная работа посвящена решению важной задачи современной ветеринарной медицины – изысканию и совершенствованию способов лечения и предупреждения воспалительных процессов репродуктивных органов коров. Одним из путей решения этой задачи является разработка новых лекарственных средств.

*Разработан препарат (Гистеросан МК-2) для лечения коров с эндометритом. По острой токсичности он относится к веществам малоопасным (IV классу) с отсутствием раздражающих свойств. При анализе чувствительности микроорганизмов содержимого матки коров к АДВ препарата (гентамицин, стрептомицин и тилозин) установлено, что все идентифицированные микроорганизмы и анаэробные формы смешанных проб проявляли к ним различную степень чувствительность. При переменном воздействии АДВ препарата на *E. coli* и *Staph. aureus* формирование механизмов резистентности происходит к третьему пассажу, а культура *Salmonella enterica* не развивает резистентность в течение пяти пассажей. Для определения антибиотиков в препарате предложена методика с использованием жидкостного хромато-масс-спектрометра. При проверке и уточнении методом ВЭЖХ подтверждена пригодность ее для производственного применения. В опытах в 3 хозяйствах получены данные о высокой терапевтической эффективности препарата при заболеваниях эндометритом различной тяжести. В исследованных пробах молока от коров с заболеваниями, для лечения которых использовался препарат, после внутриматочного введения одной дозы, антибиотические вещества в молоке выявлялись в течение 10 ч. Через 24 ч тесты показывали отрицательный результат.*

Ключевые слова: коровы, ветеринарный препарат, эндометрит, противомикробное действие, терапевтическая эффективность.

This work is devoted to solving the important task of modern veterinary medicine – the search for and improvement of methods for treating and preventing the inflammatory processes of the reproductive organs of cows. One of the ways to solve this problem is the development of new drugs.

*A drug (Gisterosan MK-2) has been developed for the treatment of cows with endometritis. According to acute toxicity, it refers to substances of low hazard (class IV) with no irritant properties. When analyzing the sensitivity of microorganisms in the contents of the uterus of cows to the active agent of the preparation (gentamicin, streptomycin and tylosin), it was found that all identified microorganisms and anaerobic forms of mixed samples showed varying degrees of sensitivity to them. With the variable effect of the active agent of the preparation on *E. coli* and *Staph. Aureus*, the formation of resistance mechanisms occurs by the third passage, and the culture of *Salmonella enterica* does not develop resistance for five passages. For the determination of antibiotics in the preparation, we have proposed a method using a liquid chromatography mass spectrometer. When checked and refined by HPLC, its suitability for industrial use was confirmed. In experiments in 3 farms, data on the high therapeutic efficacy of the drug for endometritis of varying severity were obtained. In the studied milk samples from cows with diseases for which the drug was used, after intrauterine administration of a single dose, antibiotic substances in milk were detected within 10 hours. After 24 hours, the tests showed a negative result.*

Key words: cows, veterinary drug, endometritis, antimicrobial action, therapeutic efficacy.

Введение

В последние годы в ряде стран, в т. ч. и Беларуси, ведутся интенсивные работы по созданию новых ветеринарных препаратов антибиотического и противовоспалительного действия, доступных к использованию в условиях современных животноводческих ферм и молочных комплексов для лечения коров, больных эндометритом [1, 2, 3]. Однако их

эффективность не всегда достаточно высокая, а большинство препаратов имеют длительный период выведения из организма, в т. ч. и с молоком [4, 5].

В связи с этим поиск новых средств терапии коров, больных эндометритом, которые бы в меньшей мере влияли на качество молока и имели высокую терапевтическую эффективность, является актуальным.

При разработке ветеринарных препаратов для лечения воспалительных процессов в репродуктивной системе животных особое внимание обращают на чувствительность наиболее часто выделяемых штаммов микроорганизмов из матки к действующим веществам лекарственного средства [6, 7]. Нередко патогенные типы микроорганизмов проникают через эпителий эндометрия максимально на глубину спонгиозного слоя и могут быть недоступны антибиотическим средствам. А в исследуемых пробах их присутствие вообще может не регистрироваться.

Цель работы – разработка ветеринарного препарата с высокой терапевтической эффективностью и коротким сроком ограничения использования молока в период и после лечения коров с клиническим и субклиническим эндометритом.

Основная часть

При разработке состава препарата были приняты во внимание многообразие и патогенность микроорганизмов, могущих вызвать воспалительные процессы в половых путях коров после родов, а также их чувствительность к различным группам антибиотических веществ. В состав препарата были включены 3 антибиотика – тилазин, стрептомицин и гентамицин.

Тилозина тартрат – антибиотик ветеринарного назначения, в виде пыли, относится к группе макролидов. Попадая в глаза и носовую полость, может вызвать раздражение. Обладает бактериостатическим действием, которое обусловлено подавлением синтеза белка микробной клеткой путём блокирования активности транслоказы, и хорошими лечебно-профилактическими свойствами при различных заболеваниях. Имеет широкий спектр антимикробного действия в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий: *Proteus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium spp.*, *Erysipelothrix suis*, *Clostridium spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *E. coli*, *Bacillus anthracis*, *Leptospira spp.* Хорошо всасывается, проникает в органы, ткани и жидкости тела. Из организма выводится в основном с фекалиями и в меньшей степени с мочой, у лактирующих животных с молоком [8].

Гентамицин – из группы аминогликозидов, белый порошок или пористая масса с кремоватым оттенком, гигроскопичен. Легко растворим в воде, практически не растворим в спирте. При попадании на кожу или слизистые оболочки обладает раздражающим действием. По механизму действия и спектру активности является типичным аминогликозидом. Проникая через клеточную мембрану бактерий, он связывается с 30S субъединицей бактериальных рибосом и угнетает синтез белка возбудителя. К нему высокочувствительны аэробные грамотрицательные (различные типы *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Serratia spp.*, *Acinetobacter spp.*) и некоторые штаммы грамположительных аэробов (*Staphylococcus spp.*, включая штаммы, устойчивые к пенициллину и метициллину). В отношении стрептококков у гентамицина активность слабее, а на аэробные бактерии, грибы и вирусы он не действует [9].

Стрептомицина сульфат также из группы аминогликозидов, является солью органического основания, продуцируемого лучистым грибом *Streptomyces globisporus*. Представляет собой мелкокристаллический порошок белого цвета, без запаха, горьковатого вкуса, гигроскопичен, легко растворим в воде. Устойчив в слабокислой среде. При нагревании разрушается в растворах крепких кислот и щелочей. К стрептомицину сульфату чувствительны микобактерии туберкулеза, большинство грамотрицательных (*E. coli* и др.), и некоторых грамположительных (*Staphylococcus spp.* и др.) микроорганизмов. Менее активен в отношении стрептококков и не действует на анаэробы [10]. Механизм действия заключается в ингибировании синтеза белка на уровне рибосом в клетке и размножение возбудителей, находящихся вне клетки. Но он малоактивен по отношению к находящимся микроорганизмам внутри клетки. Выводится из организма в основном с мочой.

После изготовления в лабораторных условиях первой серии препарата был проведен ряд лабораторных исследований.

Токсикологические исследования выполнялись на кафедре фармакологии и физиологии УО «Гродненский государственный аграрный университет». Для определения острой оральной токсичности препарата было сформировано 5 групп белых мышей по 6 особей в каждой массой тела 18–20 г. Перед проведением опыта одну дозу (1,2 г) Гистеросана МК-2 растворяли в колбе в 50 мл стерильной воды. Мышкам 1, 2, 3 и 4-й опытной группы однократно при помощи зонда с оливой вводили в желудок водный раствор препарата в дозах 0,1, 0,2, 0,4 и 0,6 мл на мышку, что в пересчете по АДВ на 1 кг массы тела соответствует: 1200, 2400, 4800, 6000 мг. Мышки 5-й группы служили контролем – им аналогичным способом, однократно в дозе 0,6 мл вводилась вода для инъекций. Препарат вводили натощак, после суточной голодной диеты. После введения препарата корм животные получали спустя 3 ч.

За животными на протяжении 14 дней велось ежедневное наблюдение. В течение первых суток наблюдение осуществлялось в первый час каждые 10 минут, а затем каждые 2 ч.

Регистрировали: общее состояние, особенности поведения, наличие и характер нервных расстройств, координация движения, тактильная, болевая, звуковая и световая чувствительность, состояние волосяного и кожного покровов, окраска слизистых оболочек, положение хвоста, консистенция каловых масс, потребность в корме и воде. При вычислении летальных доз LD₅₀, LD₁₆ и LD₈₄ препарата применен метод наименьших квадратов, с использованием пробит анализа.

Для изучения подострой токсичности было сформировано 2 группы мышей массой 20–21 г по 10 особей в каждой. Мышам 2-й группы в течение 15 дней с кормом вводился препарат Гистеросан МК-2 в количестве ¼ % от максимальной дозы по АДВ (6000 мг/кг массы тела), испытанной при изучении острой токсичности. Первая группа служила контролем (препарата не получала).

В течение двух недель после последнего введения препарата животные находились под ежедневным клиническим наблюдением. Учитывали потребление корма, состояние волосяного покрова и слизистых оболочек, кожи, динамика массы тела, сохранность, поведенческие реакции. По окончании опыта 5 животных из каждой группы подвергались эвтаназии для оценки состояния внутренних органов. Дозы препарата рассчитывались по АДВ.

Изучение раздражающего действия препарата проведено методом конъюнктивальных проб на 3 самках кроликов в возрасте 6–7 месяцев живой массой 2,5–3 кг. Всем животным под верхнее веко правого глаза закапывали 1–2 капли рабочего раствора препарата. Для контроля этим же животным в левый глаз аналогичным способом на конъюнктиву наносили по 1–2 капли дистиллированной воды. Реакцию учитывали через 5 минут, 24 и 48 ч. Степень раздражающего действия оценивали по покраснению конъюнктивы, реакции склеры, наличию слезотечения, зуда, очагов воспаления.

Противомикробное действие препарата на полевые штаммы *микроорганизмов* проведено в диагностической ветеринарной лаборатории ЗАО Консул. На молочно-товарной ферме КХ М. Г.Шруба Житковичского района у 3 коров с эндометритом взято **содержимое матки** и отправлено в диагностическую лабораторию. Определена чувствительность выделенных идентифицированных форм и анаэробных форм микроорганизмов в объединенной пробе к действующим веществам препарата.

Оценка скорости формирования резистентности микроорганизмов к гистеросану МК-2 выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» с использованием тестовых культур *E. coli* (штамм ATCC 25922), *Salmonella enteric sub sp. enteric* (штамм NCTC 6017 (ATCC ВАА-2162)) и *Staphylococcus aureus* (штамм ATCC 6538). Выращивание культур проводилось на питательном агаре (HiMedia, Индия).

Определение остаточных количеств антибиотиков в молоке. Так как в состав препарата включены две группы антибиотиков, при исследовании молока использовали два теста – TyloSensor и 4Amino Sensor. Учтено также, что при запуске коров в хозяйстве применяют защитный антибиотический препарат нафпензал, содержащий прокаина бензилпенициллин, дигидрострептомицин и нафциллин. В ряде случаев в секрете вымени в течение нескольких часов или дней после отела возможно наличие и этих антибиотиков. Поэтому дополнительно использовали TwinSensor тест, предназначенный для выявления тетрациклина и беталактамных антибиотиков.

Работа выполнялась в лаборатории МТК в дни проведения плановых диагностических исследований коров родильного отделения и терапевтических процедур для животных с клиническими признаками воспалительных процессов в репродуктивной системе с применением препарата Гистеросан МК-2. Использовано всего 8 коров разного возраста с признаками клинического эндометрита, не подвергавшихся ранее лечению. Корова с номером 88 включена в группу после аборта через несколько дней после запуска с использованием нафпензала. Интервал от отела (аборта) до начала исследований колебался от 10 до 16 дней. При доении от всех животных были взяты пробы молока. В молоко коровы 928 была добавлена капля растворенного препарата Гистеросан МК-2. После контрольного определения остаточных количеств антибиотиков в молоке, начинали лечение животных. Пробы молока брали затем при трех последовательных доениях после лечения.

Для контроля наличия остаточных количеств антибиотических веществ в сборном молоке в дни проведения плановых лечебных процедур были проведены дополнительные исследования. При лечении 20 коров с клиническим эндометритом, молоко от 17 животных поступало в сборное молоко. В конце доения в холодильнике было 8,5 тон молока. В этот же день было исследовано и молоко от всех 8 коров, выздоровевших после двух–трех введений препарата.

Определение антибиотиков в препарате. Учитывая многокомпонентность препарата, требовалось разработать специфическую методику определения подлинности и массовой концентрации всех антибиотических веществ, входящих в его состав, на протяжении срока хранения. В качестве средства измерения был выбран жидкостной хромато–масс–спектрометр с дегазатором, системой градиентного элюирования, устройством автоматического ввода пробы, термостатом колонок, термостатом образцов, диодно-матричным детектором, tandemным масс-спектрометром. Вспомогательные устройства – колонка хроматографическая ZORBAX SB-C18 2,1×30 мм, размером частиц 3,5 мкм производства «Agilent Technologies».

Был определен диапазон применения методики (МЕ/доза): для гентамицина 73750 – 221250, стрептомицина 126000 – 378000 и тилозина 240000 – 720000. Сырье, применяемое для изготовления препарата: гентамицина сульфат (Farmasino Pharmaceuticals (Jiangsu) Co., LTD); стрептомицина сульфат (Hebei Jianmin Starch Glucose Co., LTD) и тилозина тартрат (NINGXIA TAIKUI PHARMACEUTICALS Co., LTD).

Для приготовления элюента А муравьиную кислоту смешивали с водой для хроматографии в соотношении 5 : 995; в качестве элюента В использовали ацетонитрил для хроматографии.

Раствор сравнения готовили одновременно с испытуемыми растворами и поочередно подвергали 5-кратно хроматографии. Навеску гентамицина сульфата в количестве 147500 ± 1500 МЕ, стрептомицина сульфата 252000 ± 25000 МЕ и тилозина тартрата 480000 ± 48000 МЕ растворяли в 100 см^3 воды для хроматографии. Полученный раствор в объеме $0,1 \text{ см}^3$ помещали дозатором в мерную колбу на 10 см^3 и доводили объем до метки водой для хроматографии.

Для приготовления испытуемого раствора одну дозу препарата помещали в мерную колбу на 100 см^3 и растворяли в 70 см^3 воды для хроматографии, доводя до метки тем же растворителем; $0,1 \text{ см}^3$ полученного раствора разбавляли водой до 10 см^3 . Полученные растворы сравнения и испытуемый использовали сразу после приготовления.

Подготовка приборов к работе, их включение и выведение на рабочий режим осуществлялась в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Условия анализа: жидкостной хроматограф, мобильная фаза – элюент А и элюент В, объем инъекции $5 \mu\text{L}$, температура в термостате образцов $10 \text{ }^\circ\text{C}$, поток $0,4 \text{ мл/минуту}$ с градиентом при 0 минут – 95 и 5 %, 10 – 40 и 60 %, 11 – 95 и 5 % и 15 минут – 95 и 5 % соответственно для элюента А и элюента В.

Аналитические сигналы регистрировали масс спектрометром (табл. 1) с источником ионизации электроспрей (ESI) в режиме SIM при температуре осушающего газа $300 \text{ }^\circ\text{C}$ потоком 6 л/минуту , распылитель 30 psig , напряжение капилляра $+ 2000 \text{ V}$, время задержки 100 микросекунд .

Таблица 1. Масса регистрируемых ионов

Компонент	Полярность	Фрагментор (V)	Регистрируемый ион	Ион, m/z
Гентамицин	Положит.	125	$[\text{M}+\text{H}]^+$	464,3
Стрептомицин	Положит.	167	$[\text{M}+\text{H}_3\text{O}]^+$	600,3
Тилозин	Положит.	165	$[\text{M}+\text{H}]^+$	916,5

Интегрирование площадей пиков на ионных хроматограммах выполняли при помощи компьютерной программы «WorkStation». При неудовлетворительных результатах проводили повторные испытания.

Подлинность гентамицина, стрептомицина, тилозина подтверждали сравнением масс-спектров субстанций, входящих в состав препарата с рабочими стандартными образцами. Раствор сравнения и испытуемый раствор анализировали в условиях количественного определения в режиме MRM (табл. 2).

Таблица 2. Настройки масс-спектрометра, родительские и дочерние ионы

Компонент	Формула	Масса	Родитель-ский ион, m/z	Дочерний ион, m/z	Относ. отклик*	Фрагментор, V	Ячейка, V
Гентамицин	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	463,3	464,3 [M+H] ⁺	322,1	100	125	2
				112,0	14,1		38
				160,0	58,7		18
Стрептомицин	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	581,27	600,3 [M+H ₃ O] ⁺	582,2	100	167	14
				246,1	5,2		46
				204,0	3,1		58
Тилозин	C ₄₆ H ₇₇ N ₁₀ O ₁₇	915,5	916,5 [M+H] ⁺	174,0	100	165	38
				101,0	26,3		50
				132,0	11,2		42

* – величина отклика может изменяться в пределах 20 %.

Клинические испытания препарата. Опыты по изучению терапевтической эффективности Гистеросана МК-2 и последующей репродуктивной способности подопытных животных, проведены в трех хозяйствах. Определена оптимальная кратность введения препарата коровам с клиническим эндометритом различной тяжести и его терапевтическая эффективность в комплексе с другими препаратами при патологических или трудных родах, выяснено влияние на репродуктивную способность животных с субклиническим (хроническим) эндометритом.

Опытные партии «Гистеросан МК-2» изготовлены УП «Могилевский завод ветеринарных препаратов». Препарат представляет собой порошок белого или слегка кремового цвета со специфическим запахом, расфасован во флаконы массой 1,2 г (одна доза). Перед применением коровам препарат растворяют в воде для инъекций из расчета 1 доза на 50 мл.

Противомикробное действие препарата. При бактериологическом исследовании содержимого матки одной коровы выявлены *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.* и *Gardnerella spp.*, другой – *Streptococcus spp.*, *Gardnerella spp.* Кроме того, в обеих пробах выделены анаэробные формы микроорганизмов. При исследовании проб с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в содержимом матки второй коровы выявлен генотип, идентифицирован как *Leptospira spp.*

При анализе чувствительности идентифицированных микроорганизмов к компонентам препарата установлено, что гентамицин высокоэффективно действовал на микроорганизмы содержимого матки первой коровы и на анаэробные формы смешанной пробы. Неомицин и тилозин проявляли хорошее и удовлетворительное действие на микрофлору содержимого матки другой коровы и анаэробы смешанной пробы.

При оценке скорости формирования резистентности микроорганизмов к препарату установлено, что вероятность развития резистентности у использованных для изучения штаммов в процессе постоянного воздействия терапевтической концентрации крайне низка и практически отсутствует у *E.coli*. При переменном воздействии действующих веществ препарата на культуры *E.coli* и *Staph. aureus* формирование механизмов резистентности происходит к третьему пассажу, а культура *Salmonella enterica* не развивает резистентность в течение пяти пассажей.

Эти данные позволяют считать, что Гистеросан МК-2 можно применять для лечения и профилактики эндометрита и пиометры бактериальной этиологии у коров при условии соблюдения сроков применения препарата и отсутствия резистентности у микроорганизмов, вызывающих болезнь, к действующим веществам препарата.

Острая токсичность и раздражающее действие препарата. Внутривенное однократное введение препарата «Гистеросан МК-2» в дозах 1200, 2400, 4800 и 6000 мг/кг по АДВ не вызвало летального исхода у мышек ни в одной из опытных групп. В группе контроля все мыши хорошо перенесли зондирование и на протяжении опыта были живыми и активными. При ежедневном клиническом наблюдении за животными 1–4-й групп было установлено, что сразу после введения препарата у них возникало непродолжительное состояние повышенной возбудимости, которое постепенно сменялось угнетением. Животные длительное время могли находиться без движения, перемещались по клетке редко. Судорог, мышечной дрожи или других нарушений со стороны нервной системы не установлено, реакции на звуковые раздражители сохранялись. Состояние шерстного покрова, кожи и слизистых оболочек у мышей на протяжении всего периода наблюдений оставалось без

изменений. Животные принимали воду как обычно, а вот реакция на корм, который они получили через три часа после введения препарата, была вялой, у отдельных особей она отсутствовала. К концу первых суток наблюдений у большинства животных, особенно 1-й и 2-й групп, получавших меньшие дозы препарата, восстановился аппетит, и все поведенческие реакции пришли в норму. В 3 и 4-й группах снижение потребление корма и диспептические явления сохранялись у отдельных животных до 3-х суток. При вскрытии мышей, подвергнутых эвтаназии, выраженных патологоанатомических изменений во внутренних органах не выявлено.

Подострая токсичность препарата. При изучении подострой токсичности установлено, что многократное введение Гистеросана МК-2 с кормом течение 15 дней в количестве $\frac{1}{4}$ части от максимальной дозы (1500 мг/кг по АДВ), введённой внутривентрикулярно при определении острой токсичности препарата, не вызывает видимых системных нарушений жизнедеятельности организма и существенных изменений в клиническом состоянии животных. На 11–13-й день у отдельных особей была зафиксирована диарея, которая самопроизвольно проходила после отмены препарата.

Гибели мышей в подопытной группе в период скармливания препарата и в течение 14 дней наблюдений с момента последнего его введения не зафиксировано. В течение всего опыта мыши были подвижными, хорошо принимали корм и воду.

Интегральные показатели состояния животных за время опыта: окрас – яркий, шерстный покров без изменений, без аллопций, кожа чистая, эластичная, без наложений. Зуда, отека, механических повреждений не зафиксировано. В контроле и в группе мышей, получавших препарат, активность животных сохранялась нормальной на протяжении всего эксперимента. Они были подвижными (активные движения – перемещение и «изыскание лучшего места в группе»; «настороженно–ожидаемая» поза при незначительных болевых и тактильных раздражителях с избеганием, резкой голосовой и активно-оборонительными реакциями, царапающими и кусающими движениями), частые «моющие» движения лапками.

Наибольшие положительные изменения по массе наблюдались в опытной группе у самцов, где прирост массы тела за время опыта составил 23,4 %, наименьший – у самок этой же группы (19,9 %). Существенных различий по этому показателю между животными, получавшими препарат и не получавшими его, нет. Это говорит о хорошей переносимости препарата, быстром его выведении из организма и отсутствии кумуляции.

При вскрытии животных, подвергнутых эвтаназии в конце опыта, макроскопических изменений со стороны внутренних органов не обнаружено.

Раздражающее действие Гистеросан МК-2. Нанесение под верхнее веко правого глаза 1–2 капель раствора препарата не вызвало у животных беспокойства. После однократного нанесения препарата и последующего учета реакции через 5 минут, 24 и 48 ч, было установлено, что конъюнктивы правого и левого глаза оставались бледно-розового цвета, без изменений. Гиперемии, инъектирования сосудов, слезотечения и зуда не выявлено. Веки левого и правого глаза были идентичны, отека и повреждений зафиксировано не было. В первые и вторые сутки наблюдений, животные охотно поедали корм, и пили воду. Этологических нарушений не зафиксировано.

На основании приведенных данных установлено, что среднесмертельная доза (DL_{50}) препарата «Гистеросан МК-2» для белых лабораторных мышей при внутривентрикулярном введении составит более 6000 мг/кг по АДВ. Следовательно, по параметрам острой токсичности, согласно ГОСТ 12.01.007-76, препарат «Гистеросан МК-2» и применяемая его лекарственная форма, относятся к IV классу опасности – веществам малоопасным

Результаты применения разработанной методики определения антибиотиков в препарате. Применение описанной методики определения входящих в состав Гистеросана МК-2 антибиотиков при изучении стабильности препарата подтвердило ее точность. Нормативы внутреннего контроля, установленные при валидации МВИ, выдерживались.

Стабильность препарата подтверждена испытаниями образцов двух экспериментальных серий. Содержание действующих веществ не выходило за пределы, приводимые в технических условиях (таблица 3). Образцы выдерживали опытный срок хранения, что соответствует заявленному в ТУ сроку хранения 2 года.

Таблица 3. Результаты проведения испытаний ветеринарного препарата «Гистеросан МК-2»

Наименование показателя	Характеристика и норма	Результат испытаний
Содержание гентамицина в 1 дозе препарата, МЕ	147 500±29 500	153 613
Содержание стрептомицина в 1 дозе препарата, МЕ	252 000±50 400	282 655
Содержание тилозина в 1 дозе препарата, МЕ	480 000±96 000	531 493
Подлинность стрептомицина, гентамицина и тилозина	Должен выдерживать испытания	Выдерживает

Результаты исследований позволяют сделать заключение, что ветеринарный препарат Гистеросан МК-2 соответствует установленным требованиям по показателям количественного определения и подлинности.

Остаточные количества антибиотических веществ в молоке коров. В исследованных пробах молока от коров с заболеваниями метритного комплекса, для лечения которых использовался препарат Гистеросан МК-2, после внутриматочного введения одной дозы препарата, растворенной в соответствии с проектом инструкции по применению, антибиотические вещества в молоке выявлялись в течение 10 ч. Через 24 ч тесты показывали отрицательный результат.

Эти данные позволяют считать, что молоко можно использовать в пищу для человека от коров после лечения с применением препарата гистеросан МК-2 не ранее чем через 24 ч после последнего введения препарата.

Терапевтическая эффективность препарата и репродуктивная способность подопытных коров. Проведенные в трех хозяйствах клинические испытания Гистеросана МК-2 при заболевании коров эндометритом различной тяжести показали, что этот препарат является эффективным антибактериальным средством для лечения в течение 2–8-й недели после отела молочных коров с подострым метритом и клиническим эндометритом различной тяжести и хроническим течением. При использовании Гистеросан МК-2 для полного выздоровления животных с клиническим эндометритом требуется от 1 до 4 внутриматочных введений, в среднем от (2,5±0,3) до (3,4±0,2), продолжительность лечения составляет (5,0±0,2) – (11,8±0,3) дней, а у животных с субклиническим и хроническим эндометритом – (3,1 ± 0,1) и (9,7 ± 0,4) дней соответственно. В группе коров с патологией родов и задержанием последа при введении внутриматочно сначала суппозиториев (АДВ – энрофлоксацин) в среднем требовалось (2,2 ± 0,1) введений Гистеросана МК-2. Основные показатели репродуктивной способности коров после лечения во всех хозяйствах была близка оптимальной.

В комплексе с препаратами на твердой основе Гистеросан МК-2 является эффективным лекарственным средством для профилактики и лечения воспалительных процессов в репродуктивной системе после патологических родов и задержания последа.

Заключение

По параметрам острой токсичности Гистеросан МК-2 относится к IV классу опасности – веществам малоопасным с отсутствием раздражающих свойств. Он является эффективным средством для лечения в течение 2–8-й недели после отела молочных коров с подострым метритом и эндометритом различной тяжести и хроническим течением. Эффективно действует на полевые и коллекционные штаммы микроорганизмов. При переменном воздействии АДВ препарата на *E. coli* и *Staph. aureus* формирование механизмов резистентности происходит к третьему пассажу, а культура *Salmonella enterica* не развивает резистентность в течение пяти пассажей. Для определения антибиотиков в препарате предложена методика с использованием жидкостного хромато-масс-спектрометра. В исследованных пробах молока от коров, для лечения которых использовался препарат, после внутриматочного введения одной дозы, антибиотические вещества в молоке выявлялись в течение 10 ч. Через 24 ч тесты показывали отрицательный результат. Делается заключение, что препарат можно применять для профилактики и лечения коров с эндометритом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Разработка и использование антибактериальных препаратов для повышения репродуктивной способности коров и свиноматок / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, А. Н. Кухтина [и др.]. – Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2015. – № 3. – С. 99–106.
2. Разработка, методы контроля и применение антибактериального препарата «Гистеросан МК» для лечения коров с метритом комплексом / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, И. А. Долин [и др.]. – Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сборник научных трудов. – Горки, 2015. – Вып. 18. – Ч. 2. – С. 73–82.

3. Терапевтические средства, способы лечения и профилактики заболеваний метритного комплекса и повышение репродуктивной способности коров / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, В. С. Бегунов [и др.]. – Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии: ежеквартальный информационно-аналитический журнал. – «Роспечать», 2014. – № 3. – С. 111–116.
4. Медведев, Г. Ф. Эффективность использования импортных и отечественных препаратов при лечении коров с заболеваниями метритного комплекса / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, О. Т. Экхорутмвен, Д. С. Ходькин // Животноводство и ветеринарная медицина. – Горки: БГСХА, №1 (12). – 2014. – С. 39–43.
5. Медведев, Г. Терапевтическая эффективность некоторых препаратов для лечения коров с заболеваниями метритного комплекса: эндометрит, пиометра / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, Отамере Экхорутмвен // Ветеринарное дело, 2017. – № 4. – С. 9–14; 2017. – № 5. – С. 14–16.
6. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows / S. J. LeBlanc, T. E. Duffield, K. E. Leslie [et al.]. – J. Dairy Science, 2002. – Vol. 85. – № 9. – P. 2223–2236.
7. Медведев, Г. Ф. Острый послеродовой метрит / Г. Ф. Медведев, Н. И. Гавриченко, Д. Ходькин // Ветеринарное дело, 2017. – № 3. – С. 3–5.
8. Тилозин: наставления (инструкция). VetLec / Наставления / Т / Тилозин. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.vetlek.ru/directions/?id=17>
9. Гентамицин – инструкция по применению. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: health.yandex.ru.
10. Крыжановский, С. А. Стрептомицина сульфат. В / С. А. Крыжановский, М. Б. Вититнова // Полный современный справочник лекарственных препаратов. 2-е издание, переработанное и дополненное. РИПОЛ классик. – М., 2004. – С. 934–36.