



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56173

(13) C2

(51) 7 A61K31/22

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ВЕТЕРИНАРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

2

(21) 99010014

(22) 03 07 1997

(24) 15 05 2003

(86) PCT/EP97/03518, 03 07 1997

(31) 9614012 4

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614013 2

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614014 0

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614015 7

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614016 5

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614017 3

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614018 1

(32) 04 07 1996

(33) GB

(31) 9614019 9

(32) 04 07 1996

(33) GB

(46) 15 05 2003, Бюл. № 5, 2003 р

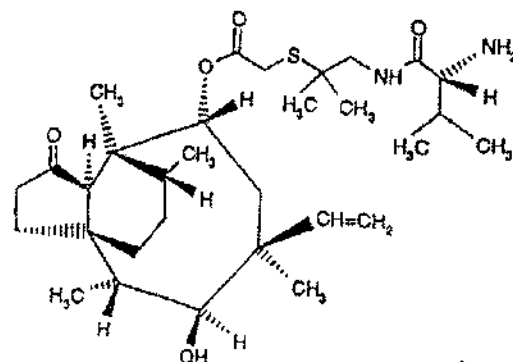
(72) Бьорч Девід Джордж, GB, Ріплі Пол Говард,
GB, Цейсл Ерік, AT

(73) БІОХЕМІ ГЕЗЕЛЬШАФТ М Б Х, AT

(56) US 4675330, 23 06 1987

US 5164526, 17 11 1992

(57) 1 Спосіб лікування ветеринарних захворювань у тварин, включаючи вторинні інфекції, викликані зростанням щільності популяції худоби, причому вказане ветеринарне захворювання пов'язане з інфекцією, викликану бактерією, вибраною з групи, яка включає *Serpulina pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* та їх суміші, який відрізняється тим, що вказаний спосіб включає введення тварині терапевтично ефективної кількості сполуку формули I



(I)

у формі вільної основи або ветеринарно прийнятної солі

2 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I вводять свиням, які потребують такого лікування

3 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I вводять разом з принаймні одним ветеринарно прийнятним носієм чи розчинником

4 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I у формі вільної основи або у ветеринарно прийнятній формі вводять свиням для лікування свиного коліту, пов'язаного з інфекцією *Serpulina pilosicoli*

5 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I у формі вільної основи або у ветеринарно прийнятній формі вводять свиням для лікування ілеїту, пов'язаного з інфекцією *Lawsonia intracellularis*

6 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I у формі вільної основи або у ветеринарно прийнятній формі вводять свиням для лікування ветеринарного захворювання, пов'язаного з інфекцією *Pasteurella multocida*

7 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I у формі вільної основи або у ветеринарно прийнятній формі вводять ягнятам, вівцям або великій рогатій худобі для лікування пневмонії, пов'язаною з інфекцією *Pasteurella haemolytica*

8 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що сполуку формули I вводять у формі солі, утвореної додаванням соляної кислоти

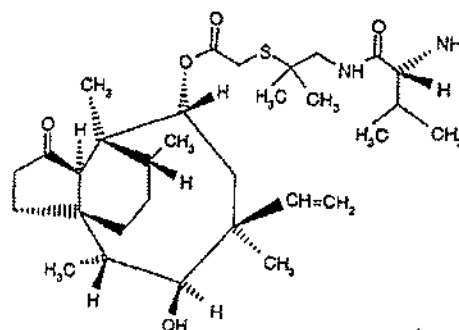
9 Спосіб одержання лікарського засобу для ліку-

(13) C2

(11) 56173

(19) UA

вання ветеринарних захворювань у тварин, включаючи вторинні інфекції, викликані зростанням щільності популяції худоби, причому вказане ветеринарне захворювання пов'язане з інфекцією, викликану бактерією, вибраною з групи, яка включає *Serpulina pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* та їх суміші, який відрізняється тим, що вказаний спосіб включає сполучення терапевтично ефективною кількості сполуки формули I



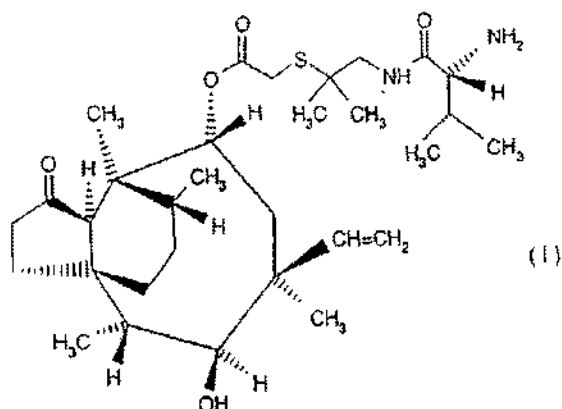
(I),

у формі вільної основи або у ветеринарно прийнятній формі з принаймні одним ветеринарно прийнятним носієм або розчинником

10 Спосіб за п 9, який відрізняється тим, що захворюванням є свиний коліт

11 Спосіб за п 9, який відрізняється тим, що захворюванням є ілеїт у свиней

Даний винахід стосується до похідних плевромутіліну. Він стосується способу використання у ветеринарії сполуки формули I



(I)

а саме, 14-O-[1-((R)-2-аміно-3-метилбутириламіно)-2-метилпропан-2-іл]пропіоацетил]мутіліну в формі вільної основи або придатної для ветеринарії солі, в терапії ветеринарних захворювань, прояв яких посилюється при зростанні щільності популяції худоби, який тут і надалі називають "використання винаходу"

Сполуку формули I у формі вільної основи або придатної у ветеринарії солі (Econog[®]) тут і надалі коротко називають "сполукою винаходу". Вона переважно знаходиться у формі солі, головним чином, гідрохлориду. У цій формі вона відома під родовою назвою гідрохлорид вальнемутіліну.

Під терміном "терапія" слід розуміти використання як з профілактичною, так і лікувальною метою.

Сполука формули I у формі вільної основи або у формі хемотерапевтичної чи придатної у ветеринарії солі відома, наприклад, з Європейського, Патенту 153 277 та його аналогів, наприклад, патенту США 4 675 330, особливо приклад 12.

З цих патентів відомо, що цій сполуці прита-

манна

- інгібіторна активність по відношенню до різноманітних бактерій в концентраціях приблизно від 0,008 до 25 мг/мл,

- інгібіторна активність in vitro по відношенню до всіх мікоплазм та хламідій в концентраціях приблизно від 0,008 до 0,5 мг/мл,

- інгібіторна активність in vivo у мишей при використанні різноманітних бактеріальних штамів, та у курей при використанні штамів мікоплазм в концентраціях приблизно від 12 до 50 мг/кг ваги тіла,

- антипаразитарна активність, особливо in vivo, проти кокцидій у домашньої птиці в концентраціях 20 - 150 мг/кг їжі, та

- стимулююча ріст активність у курей та свиней in vivo в дозах 10 - 50 мг/кг корму, що, таким чином, робить дану сполуку корисною як активний бактеріальний антибіотик взагалі та, як ветеринарний засіб, особливо для хемотерапевтичного лікування кокцидіозів у домашньої птиці, а також як стимулятора росту курей та свиней.

Несподівано було виявлено, що сполука винаходу є особливо ефективною при терапії ветеринарних захворювань, прояв яких посилюється при зростанні щільності популяції худоби, таких як ензоотична пневмонія свиней, що викликана інфекцією *Mycoplasma hyorhynchopneumoniae*, дизентерія свиней, що викликана інфекцією *Serpulina* (раніше - *Treronepma*) *hyodysenteriae*, коліт свиней (запалення ободової кишки), пов'язаний з інфекцією *Serpulina pilosicoli*, ілеїт свиней (свинна проліферативна ентеропатія, кишковий аденоматоз свиней), пов'язаний з інфікуванням *Lawsonia intracellularis*, хронічне респіраторне захворювання та артрит домашньої птиці, пов'язані з інфікуванням *Mycoplasma gallisepticum*, вторинна пневмонія у свиней, пов'язана з інфікуванням *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* та/або *Haemophilus parasuis*, пневмонія ягнят, овець та корів (овецька лихоманка, транзитна лихоманка, телячий респіраторний комплекс, бичачий ревматоїдний пастерельоз), пов'язані з інфі-

куванням *Pasteurella haemolytica*, та поліартрит у свиней, пов'язаний з інфікуванням *Mycoplasma hyosynoviae*

Надалі, несподівано було виявлено, що індукція резистентності до цих ліків дуже мала

Таким чином, даний винахід стосується використання у ветеринарії, як це означено вище

Він також стосується використання сполуки винаходу для виробництва медикаментів для використання при терапії ветеринарних захворювань, прояв яких посилюється при зростанні щільності популяції худоби. Він надалі стосується способу лікування ветеринарних захворювань, прояв яких посилюється при зростанні щільності популяції худоби, який включає введення терапевтичне ефективної кількості сполуки винаходу тварині, яка потребує лікування. Він надалі торкається ветеринарної сполуки для використання в терапії ветеринарних захворювань, прояв яких посилюється при зростанні щільності популяції худоби, включаючи сполуку формули I у формі вільної основи або у формі прийнятної для ветеринарії солі разом з, принаймні, одним придатним для ветеринарії носієм або розчинником

Він надалі стосується способу одержання медикаментів для використання, описаного вище, яке включає змішування сполуки винаходу з, принаймні, одним придатним для ветеринарії носієм або розчинником

Тварину, що страждає на ветеринарні захворювання, прояв яких посилюється при зростанні щільності популяції худоби, можливо, наприклад, ще не лікували антибактеріальне сполукою винаходу або їй ще не вводили сполуку винаходу для стимуляції росту

А) інфекція *Mycoplasma hyorheumoniae*

Інфекцію *Mycoplasma hyorheumoniae* можна діагностувати традиційним способом, як, наприклад, описано у ветеринарних довідниках, наприклад, Taylor D J, в *Pig diseases*, 6th Ed (1995), Publ D J Taylor, Glasgow, UK на стор 164 - 165. Цілющу активність агенту винаходу досліджують, наприклад, як описано нижче

1. Активність in vitro

В дослід включали десять польових ізолятів із спалахів ензоотичної пневмонії в різних стадах та типовий штам "J". Проби клонували на фільтри, ідентифікували дисковим тестом інгібуння росту та використовували з 7-го по 10-ий переноси. Тест по визначенню мінімальної інгібуючої концентрації (MIK) проводили в рідкому середовищі (Friss, N F et al, *Acta Vet Scand* 32 [1991] 425 - 429) в пробірках 1,8мл, які містили 2-кратну концентрацію вальнемуніну та гідрофумарату тіамуніну. Мікоплазми інкулювали у 10-кратних розведеннях, та проглядали культури візуально на ріст, використовуючи пробірки з 10^2 - 10^4 одиницями утворення забарвлення. Початкову реєстрацію аналізу робили через 2 - 4 дні, а кінцеву - через 10 - 14 днів, коли вже не відбувалась зміна кольору. MIK визначали як найнижчу концентрацію тестової сполуки, яка показувала інгібуння росту порівняно з контролем (Friss, N F and Szancer J, *Acta Vet Scand* 35 [1994] 389 - 394)

Результати наведені в Таблиці 1

MIK (мкг/мл)

Номер штаму	Вальнемунін (гх)		Тіамунін (гф)	
	Початковий	Кінцевий	Початковий	Кінцевий
1	0,0010	0,0025	0,025	0,050
1	0,0010	0,0025	0,025	0,100
3	0,0010	0,0025	0,050	0,100
5*	0,0025	0,0025	0,050	0,100
1	0,0025	0,0025	0,100	0,100

* - включаючи типовий штам, гх - гідрохлорид, гф - гідрофумарат

Всі штами *M. Hyorheumoniae*, що досліджувались, є високочутливими до дії вальнемуніну з величинами MIK в 10 - 40 разів меншими, ніж для тіамуніну, як при початкових, так і при кінцевих визначеннях, що робить цю сполуку особливо цікавою для використання при лікуванні клінічних випадків інфікованих стад

2. Активність in vitro

Проби тканин брали з легенів свиней з різних стад, уражених ензоотичною пневмонією свиней (EPP). Проби транспортували в сухому льоді для культивування. *M. hyorheumoniae* виділяли із свіжо-отриманої тканини легенів шляхом нанесення культури на агар для визначення мікоплазм (*Mycoplasma Experience agar*). Ця методика дозволяє розпізнати та швидко відділити від такої мікоплазми, як *Mycoplasma hyorhinis*, часто присутньої в пробах EPP легенів, яка росте більш швидко, характерні колонії *M. hyorheumoniae* шляхом клонування. Виділені мікроорганізми субклонували та ідентифікували по дисковому інгібунню росту, використовуючи специфічну антисироватку кролів, одержану до *M. hyorheumoniae* NCTC 10110

Культури для обробки антибіотиками готували в бульйоні *Mycoplasma Experience*, інкубували аеробно при 36°C

Для виділення *M. hyorheumoniae* з тканини легенів використовували доступне на ринку тверде середовище *Mycoplasma Experience Ltd*. Для дослідів по MIK використовували рідке середовище (*Mycoplasma Experience Ltd*), що містило феноловий червоний та глюкозу (pH 7,6)

Вихідні розчини сполук, що вивчали, готували в концентрації 1 мг/мл в деіонізованій воді, стерилізованій фільтрацією через мембранний фільтр з розміром пор 0,2мкм (Sartorius Minisart, N), та зберігали при -20°C. Для використання в досліді MIK вихідні розчини розводили в рідкому середовищі до подвійної кінцевої концентрації. Досліди MIK проводили згідно зі способом Tanner & Wu, *Avian Diseases* 36 (1992) 714-717. Дослідні культури, що активно ростуть, готували або з аликвот по 1мл культурального бульйону, який зберігають при -70°C, або з культур, що зберігаються в агарі при -70°C. Культури для дослідів розводили до одержання кінцевого титру 10^3 - 10^5 змінюючих забарвлення одиниць/мл. Аликвоти інкуляту по 0,1мл для досліду змішували з аликвотами розведеного антибіотика по 0,1мл в лунках для мікротитрації. Кожен планшет для мікротитрації містив неінфіковане середовище при pH 6,8 (*M. hyorheumoniae*) (контроль кінцевої точки) та інкульовані контроли

без антибіотиків. Всі планшети покривали липкою плівкою та інкубували аеробно при 36°C. МІК визначали, коли зміна кольору в контрольних пунктах відповідала рН контрольної кінцевої точки. МІК була найменшою концентрацією, що не змінювала колір.

Результати зведені в Таблиці 2 для вальнемупіну та двох еталонних сполук - тіамупіну та енрофлосаціну.

Таблиця 2

Чутливість 10 польових ізолятів *M. hyorheumoniae* in vitro

антибіотик	МІК (мкг/мл)			Типовий штам J
польові штами (n=10)				
	50%	90%	діапазон	(NCTC 10110)
вальнемупін	0,0005	0,001	0,0025 - 0,001	0,0025
тіамупін	0,025	0,05	0,01 - 0,05	0,01
енрофлосацін	0,025	0,01	0,0025 - 0,025	0,025

Було знайдено, що всі штами чутливі до вальнемупіну. Більшість із штамів показали дуже високу чутливість до енрофлосаціну, але що стосується окремих штамів, МІК вальнемупіну була принаймні у 5 разів нижчою, навіть з штамми, чутливими до 0,0025 мкг/мл енрофлосаціну. Ці результати підтверджують, що польові ізоляти є надзвичайно чутливими до вальнемупіну.

3. Розвиток резистентності

Контрольний штам *Mycoplasma hyorheumoniae* NCTC 10110 (одержаний з Національної колекції культур, Лондон, UK) та польовий ізолят (MEVT G23) вирощували аеробно при 36°C в бульйоні з глюкозою для мікоплазми, що містив феноловий червоний, до тих пір, поки внаслідок закислення не змінювався колір. Після додавання стерильного гліцерину (5% об/об) культури розділяли на аликвоти по 1 мл та заморожували при -70 °C. Ці культури використовували в майбутньому для ініціації бульйонних культур, які титрували, для одержання ряду змінюючих забарвлення одиниць (ззо) в планшетах для мікротитрації після інкубації (36°C). Повторне проведення експерименту дозволяє проводити тестування розведень антибіотиків заданою кількістю ззо в дослідках по визначенню мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) та в первинному пасивуванні в дослідках по звиканню.

Використовували доступне на ринку середовище (*Mycoplasma Experience Ltd*), яке містило глюкозу та феноловий червоний при рН 7,6.

Вихідні розчини сполук, що аналізували, готу-

вали в концентрації 1000 мкг/мл в деіонізованій воді. Після перемішування розчини стерилізували фільтрацією через мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм (*Sartorius Minisart, N*). Для використання в дослідках по МІК вихідні розчини розводили в бульйоні для мікоплазми до подвійної кінцевої концентрації. При вивченні звикання вихідні розчини розподіляли по 1 мл аликвотах та заморожували при -20°C їх розморожували та використовували з інтервалом 5 - 7 днів для створення грацій концентрацій препарату (в двох серіях) в MEGB, в 1,9 мл аликвотах, що охоплюють МІК проти обох ліній *M. hyorheumoniae*. Окситетрацикліну підхлорид готували свіжим кожного разу. Границі розведення поступово змінювались від пасивування до пасивування, роблячи поправку на розвиток резистентності мікоплазм.

Процедура тестування

Тести МІК проводили способом Tanner & Wu, *Avian Diseases* 36 (1992) 714 - 717 до проведення тесту по звиканню (нижче) та після 10-го пасивування 0,1 мл аликвоти розведеної сполуки змішували з 0,1 мл аликвотами дослідного інкуляту, що містив між 10³ та 10⁵ змінюючих забарвлення одиниць (ззо) в мл, в пунктах для мікротитрації. Кожний планшет для мікротитрації містив неінкульоване середовище, середовище при рН 6,8 (контроль кінцевої точки) та контроль дослідного інкуляту без сполуки. Всі планшети вкривали плівкою та інкубували аеробно при 36°C. МІК визначали тоді, коли зміна кольору в контрольних пунктах досягала значення контролю при рН 6,8 (оранжево-жовтий). МІК дорівнювала самій низькій концентрації, яка не давала зміни кольору.

Вивчення звикання. В досліді з первинним пасивуванням 1,9 мл розчину антибіотиків в концентраціях, охоплюючих МІК штаму *M. hyorheumoniae* в тесті, інкубували з 0,1 мл бульйонної культури, що містила між 10³ до 10⁵ ззо/мл. Контроль росту, що складався з бульйону без сполуки, інкульованого *M. hyorheumoniae*, та контроль з середовищем без інкуляту, включали в кожний експеримент по пасивуванню. Після 7 днів інкубації (36°C) дві найвищі концентрації бульйону зі сполукою, що показали кислотну зміну кольору, об'єднували та використовували для інкуляції свіжих серій розведень препаратів в мікоплазмозовому бульйоні (0,1 мл культури в 1,9 мл бульйону з препаратом). Цю процедуру повторювали кожні 5 - 7 днів до 10 пасивувань. Коли штами мікоплазми ставали резистентними до певних антибіотиків, або на 10-му пасивуванні, кожен штам вирощували ще раз на бульйоні з препаратом та визначали МІК.

Результати МІК штаму "J" *M. hyorheumoniae* та польових ізолятів до та після обробки антибіотиками показані в Табл. 3.

Таблиця 3

Розвиток резистентності *in vitro* у двох штамів *M hyorheumoniae*

Сполука	Штам	Препасивування МІК (мкг/мл)	Постпасивування МІК до Р10/Р11 ¹⁾ (мкг/мл)	Ріст резистентності (кратність)
Вальнемуплін (гх)	NCTC 10110	0,0025	0,005	2
	польовий ізолят	0,001	0,0025	2,5
Тілозину тартрат	NCTC 10110	0,25	>500 ²⁾	>2000
	польовий ізолят	0,125	62,5 ²⁾	500
Окситетрациклін	NCTC 10110	0,25	1,0	4
гідрохлорид	польовий ізолят	0,25	1,0	4

¹⁾ - рівень пасивування *in vitro*²⁾ - МІК після 8 пасивувань в мікоплазмовому бульйоні, який містив тілозин

Було знайдено, що перед експозицією обидва штама були дуже чутливими до вальнемупліну з МІК 0,0025мкг/мл для контрольного штаму та 0,001мкг/мл для польового ізоляту. Ці рівні активності були у 50 - 100 разів вищими, ніж для тілозину та окситетрацикліну. Ці результати МІК використовували для вибору діапазону розведень для препаратів в досліді по звиканню.

Після 10 циклів експозиції вальнемупліну розвиток резистентності був мінімальним в обох штамів *M hyorheumoniae*, причому МІК виростала з 0,0025мкг/мл до 0,005мкг/мл та від 0,001мкг/мл до 0,0025мкг/мл для, відповідно, контрольного штаму та польового ізоляту. При використанні тартрату тілозину та окситетрацикліну, навпаки, розвивалась значна резистентність в обох штамів *M hyorheumoniae*. У контрольного штама резистентність вперше спостерігали на 4-5 пасивуванні в бульйоні з тілозином та до 8 пасивування МІК досягала >500мкг/мл, відображаючи >2000 кратне зростання резистентності до даного антибіотика (Табл. 3). Значна резистентність до тілозину розвивалась у польового ізоляту протягом 8 пасивувань, причому МІК виростала в 500 разів до 62,5мкг/мл. Такий рівень резистентності зберігався після 10 - 11 пасивувань в бульйоні з тілозином. 4-кратне зростання резистентності до окситетрацикліну мало місце в обох штамів *M hyorheumoniae* протягом 10 циклів експозиції, причому МІК зростала від 0,25мкг/мл до 1мкг/мл.

Ці результати показують, що вальнемуплін є значно більш активним проти *M hyorheumoniae*, ніж тілозин та окситетрациклін, та що він не викликає значного звикання у штамів *M hyorheumoniae*.

4. Профілактика експериментально індукованої ензоотичної пневмонії *in vivo*

Застосовували експериментальну модель ензоотичної пневмонії, використовуючи пасований матеріал легенів, що спершу одержують інфікуванням гнотобіотичних свиней *M hyorheumoniae*, для оцінки здатності вальнемупліну запобігати цій інфекції. Проводили три експерименти. Тести 1 та 2 були дослідями по титруванню доз даної нової

сполуки, використовуючи стандартний контрольний штам *M hyorheumoniae*, а в Тесті 3 була досягнута ефективність даної сполуки при 200 чим (часток на млн) в іжі при зараженні другим штамом. Використовували хряків породи Великих Білих свиней Landrace, віком 6 - 7 тижнів, з стад, не заражених *M hyorheumoniae*. Матеріал для зараження - пневмонійні легені, які містили *M hyorheumoniae*, що вводили у вигляді гомогенату інтраназально протягом трьох днів. Мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК) вальнемупліну проти штаму, присутнього в даному матеріалі, що використовували в Тестах 1 та 2, була 0,016мкг/мл, та для штаму, виділеного з матеріалу, що використовували в Тесті 3, була 0,0078мкг/мл. Матеріал для уведення спершу одержували при інфікуванні гнотобіотичних свиней *M hyorheumoniae* та наступному пасивуванні в SPF (свині, що не містять специфічного патогену), та зберігали нижче -70°C.

Тест 1. Введення гідрохлориду вальнемупліну через зонд один раз на день в дозах 0 (контроль), 2,5, 5, 7,5 чи 10мг/кг ваги тіла на добу. Шість свиней в групі.

Тест 2. Введення гідрохлориду вальнемупліну з кормом в дозах 0, 100, 200, 300 або 400чм (еквівалент 0, 5, 10, 15 та 20мг/кг/добу). Шість свиней в групі.

Тест 3. Введення гідрохлориду вальнемупліну з кормом в дозах 0 та 200чм (еквівалент 0 та 10мг/кг/добу). Вісім свиней в кожній групі. Препарат давали з першого дня зараження до розтину приблизно через 3 тижні після зараження. Захворювання оцінювали шляхом визначення кількості уражень легенів (Система визначення кількості пошкоджень легенів Cambridge, (Goodwin, R F W, and Whittlestone P. J Hyg. 69 (1971) 391-397), в якій показник є приблизним відсотком легенів, пошкоджених пневмонією), шляхом встановлення співвідношення ваги легенів/тіла та виділенням *M hyorheumoniae* з легенів.

Результати показані в Табл. 4.

Таблиця 4

Тест 1 Уведення препарату через зонд, МІК 0,016мкг/мл ¹⁾		
Доза препарату	Показник пошкодження легенів	Співвідношення вага легенів/тіла
0	13,2	1,35
10мкг/кг/доба	U	1,08
7,5мкг/кг/доба	3,8	1,21
5мкг/кг/доба	11,1	1,31
2,5мкг/кг/доба	7,7	1,21
Тест 2 Уведення препарату з кормом, МІК 0,016мкг/мл ¹⁾		
Доза препарату	Показник пошкодження легенів	Співвідношення вага легенів/тіла
0	22,1	1,61
400чнм(20мг/кг) ²⁾	6,3	1,24
300чнм(15мг/кг)	12,7	1,27
200чнм(10мг/кг)	12	1,29
100чнм(5мг/кг)	25	1,53
Тест 3 Уведення препарату з кормом, МІК 0,0078мкг/мл		
Доза препарату	Показник пошкодження легенів	Співвідношення ваги легенів/тіла
0	10,8	1,32
200чнм (10мг/кг)	2,3	1,21

¹⁾ - МІК гідроклориду вальнемупіну в мкг/мл відносно *M. hyorheumoniae*, виділених з матеріалу для уведення

²⁾ Приблизна добова доза вальнемупіну гідроклориду на свиню

В Тесті 1 заражені свині, яким не вводили препарат, мали середній коефіцієнт пошкодження 13,2. Вальнемупін знизив пошкодження на 71% та 87% при дозах 7,5 та 10мг/кг, відповідно, в той час як в дозах 2,5 та 5мг/кг/доба він був дещо менш ефективним при зниженні ураження. *M. hyorheumoniae* виділяли повторно з меншої кількості свиней, яким вводили 10мг/кг, порівняно з свинями, яким вводили 2,5мг/кг (1 проти 4 свиней).

В Тесті 2 заражені свині, яким не вводили препарат, мали середній коефіцієнт пошкодження 22,1. Свині, яким вводили вальнемупін у дозі 200, 300 або 400чнм, показали зниження уражень на 46%, 43% та 71%, відповідно. Вага легенів, яка, можливо, відображає мікроскопічні, а також макроскопічні ураження, виявила більш значний ефект з суттєвим зменшенням при рівні 200чнм. Не спостерігали зниження уражень у свиней, яким вводили по 100чнм. *M. hyorheumoniae* повторно виділили з всіх свиней, яким не вводили препарат, при розтині, але не виділили з свиней, яким вводили 400чнм або 300чнм вальнемупіну. Мікроорганізми виділили з 3 та 4 свиней, яким вводили 200чнм та 100чнм, відповідно.

В Тесті 3 свині, яким не вводили препарат, мали середній коефіцієнт 10,8, введення препарату з вальнемупіном при 200чнм з іжею знижувало показник ураження на 79%. Не було розбіжностей в рівні *M. hyorheumoniae*, що спостерігали при розтині, між свинями з уведенням та без уведення.

Таким чином, показано, що вальнемупін є ефективним при профілактиці експериментальної викликані ензоотичної пневмонії свиней в окремих експериментах при використанні матеріалу для зараження, який містить два різних штама *M. hyorheumoniae*.

Таким чином, сполука винаходу є корисною в терапії ензоотичної пневмонії у свиней, викликані інфекцією *Mycoplasma hyorheumoniae*. Для цих цілей ефективна доза буде, звісно, змінюватись в

залежності від солі, яку застосовують, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, з профілактичними цілями відносно низькі дози вводяться протягом довгого часу. Однак, загалом задовільні результати одержують тоді, коли препарат вводять в добовій дозі від приблизно 5мг/кг до приблизно 15мг/кг ваги тіла тварини, яку зручно вводити порціями по два-чотири рази на добу, або у формі з пролонгованою дією. Для більшості тварин загальна добова доза складає приблизно від 100мг до приблизно 1000мг, переважно, від приблизно 100мг до приблизно 500мг, що дають один раз або двічі на добу. Препарат можна успішно застосовувати як монотерапію.

Переважними дозами у питній воді є від 0,01 до 0,05% ваг/об, особливо, від 0,01 до 0,025%, та у їжі від 100 до 400чнм (г/тона), особливо 100 - 200чнм (г/тона).

В) Інфекція *Serpulina hyodysenteriae*

Інфекцію *Serpulina hyodysenteriae* можна діагностувати традиційним способом, як, описано в довідниках по ветеринарії, наприклад, у Taylor D J, в *Pig Diseases*, 6th Ed (1995), Publ D J Taylor, Glasgow, U K pp 143 - 144. Цілющу активність сполуки винаходу в даному використанні досліджували наступним чином.

1. Визначення МІК

Використовували дев'ять польових ізолятів *S. hyodysenteriae* із спалахів свинної дизентерії та типові штами ATCC 31212 та ATCC 29796 (*Serpulina innocens*, група 3, Fellstrom, C, Res Vet Sci 52 (1995) 1 - 4). Ідентифікація була основана на пробах гемолізу на TSA (соевий агар *Trypticase*) з 5%-ою бичачою кров'ю, та на тесті по виробленню індоли та гідролізу ппурату (*Rosco Diagnostic Tables*, Taastrup, DK). Бактерії переносили з агарових чашок у 0,9% фізрозчин та доводили мутність до 1,0 по шкалі McFarland до того, як 10мкл кожного ізоляту наносили на агарові чашки з двократними

концентраціями вальнемупіну гідрохлориду, тіамуліну гідрофумарату, диметридазолу, лінкоміцину гідрохлориду та тілозину. Ріст та гемоліз реєстрували після 4 днів анаеробного росту, а МІК визна-

чали як найбільш низьку концентрацію антибіоти-ка, при якій не росли спірохети

Результати визначення МІК для *S. hyodysenteriae* показані в Табл. 5

Таблиця 5

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) для 10 штамів *S. hyodysenteriae*

Бактерицидний засіб					
МІК (мкг/мл)	Вальнемупін (гх)	Тіамулін (гф)	Диметридазол	Лінкоміцин	Тілозин
0,0156	2	-			
0,0312	4	-			
0,0625	3	-	-		
0,125		6	-		
0,250		1	-		
0,500		1	2	-	
1	1	2	2	-	
2			1		-
4					
8			1		-
16			1		
32				-	
64			3	1	
128				3	1
>128				6	9
гх - гідрохлорид		гф - гідрофумарат			

Всі штами *S. hyodysenteriae* були високо чутливими до вальнемупіну, показуючи значення МІК у 2 - 32 рази нижчі, ніж для тіамуліну. Висока ефективність вальнемупіну відносно *S. hyodysenteriae* робить цю сполуку цікавою для використання при лікуванні клінічних випадків в інфікованих стадах.

2. Визначення МІК

Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) визначали для 10 штамів *S. hyodysenteriae*, виділених з фекалій свиней, способом розведення на агарі. Штами NCTC (Національна колекція типових культур) або референтні штами використовували як контроль в усіх МІК тестах. Агарове середовище для *S. hyodysenteriae* складається з BAB2 (Unipath CM271), що містить цільну 7% дефібрильовану стерильну кров вівці. Всі антимікробні сполуки аналізували двохкратними розведеннями. Одержані розведення антибіотиків додавали до відповідного об'єму агара MH, завчасно охолодженого до 50°C, змішували та розливали по 20мл. Всі інкубації *S. hyodysenteriae* проводили в анаеробному інкубаторі при 37°C (+/-0,5°C) (Don Whitley Scientific), який був забезпечений стійкою анаеробною атмосферою, що включала 80% азоту, 10% водню та 10% диоксиду вуглецю. Всі інші інкубації проводили при 37°C. Всі штами інкубували в аеробній атмосфері при 37°C протягом 24 годин. Кількість організмів підводили до оптичної густини (ОГ), еквівалентної 1×10^8 колонія-утворюючих одиниць в мл, використовуючи бульйон MH як контроль. Чашки з антибіотиками заражали в двох паралелях, використовуючи багатоканальний інкулятор (Denley instruments), який подавав в чашку приблизно 1мкл інкуляту, що містив 10^4 - 10^5 колонія-утворюючих одиниць на пляму, для всіх штамів (Amon, J Antimicrob Chemother 21 [1988] 701 - 710, Ericsson et al, Acta Pathol Microbiol Et

Immunol Scand 217 [1971] (B) Suppl, 1 - 90). Контрольні чашки інкубували при тих самих умовах, що і дослідні. МІК визначали через 24 та 48 годин, при чому останнє вимірювання було визначальним. МІК розраховували як мінімальну концентрацію антибіотика, при якій не було росту, не звертаючи увагу на одиничну колонію та блідий туман, викликаний інкуляцією (National Committee for Clinical Laboratory Standards, [1989], Antimicrobial Susceptibility Testing, NCCLC Publications SC3, Villanova, PA, USA).

МІК (мкг/мл) по відношенню до *Serpulina hyodysenteriae* були для вальнемупіну (0,1), тіамуліну (0,3), лінкоміцину (50,0), тілозину (200,00) та диметридазолу (30,0). Всі штами *S. hyodysenteriae* були чутливими до вальнемупіну, який був активніше всіх інших препаратів у 3 - 600 разів.

3. Досліди по зараженню

Проводили два випробовування, в яких вальнемупін, яким в різних дозах годували тварин, порівнювали з тіамуліном для профілактики дизентерії у свиней. Важкість захворювання оцінювали за наявністю клінічного захворювання, що визначали по клінічній шкалі стану тіла, консистенції та складу фекалій. Визначали екскрецію *Serpulina hyodysenteriae* з фекаліями, ураження за даними розтину, швидкість росту та рівень перетравлювання їжі.

В першому досліді гідрохлорид вальнемупіну згодовували в кількості 20, 30 та 40чм в порівнянні з фумаратом тіамуліну (30чм) та контролем без антибіотика. Використовували п'ять груп по 9 (віком від 5 до 6 тижнів) традиційно утримуваних свиней в групі. Свиней годували кормом без препаратів протягом 14 днів, потім заражали стандартним штамом *S. hyodysenteriae* (P18A). Зараження проводили орально протягом двох послідовних

днів. Корм з препаратами давали наступного дня після другого зараження. В другому досліді дотримувались такої самої процедури, за виключенням того, що використовували 4 групи приблизно по 9 свиней. Тварин годували гідрохлоридом вальнемупіну при 5, 10 та 20 чнм та порівнювали з контролем без антибіотиків. В цьому експерименті використовували свиней із безстіловим утриманням, та заражали їх штамом *S. hyodysenteriae*, що виділяли з таких стад, який, як показано раніше, здатний викликати дизентерію свиней. В обох дослідіх наявність клінічного захворювання визначали кожного дня та визначали клінічний показник, двічі на тиждень робили ректальні змиви на *S. hyodysenteriae* та всіх свиней зважували через певні проміжки часу. Крім того реєстрували споживання корму. Через 21 день після зараження проводили розтин та вивчали товстий кишечник на наявність пошкоджень. Робили також зскрібки слизової з 4 відділів товстого кишечника та робили посів на *S. hyodysenteriae*.

В першому досліді клінічна дизентерія свиней спочатку була відмічена у контрольній групі без призначення через 8 днів після зараження, 8 з 9 свиней були уражені. Клінічне захворювання також спостерігали у 1 свині з групи, яку годували вальнемупіном в кількості 30 чнм та у 2 з 9 тварин в тіамуліновій групі. Наявність захворювання не відмічали в вальнемупінових групах при 20 та 40 чнм. Середній клінічний показник на свиню складав 36 для контрольної групи порівняно з показником 6 для тіамулінової групи. Різниця між показниками, відміченими для всіх дослідних груп, та контрольною групою була статистичне вірогідною ($p < 0,001$). *S. hyodysenteriae* виділяли з ректальних мазків, взятих у всіх контрольних тварин та у 2 уражених тварин в тіамуліновій групі. *S. hyodysenteriae* також виділяли з двох свиней, що одержали корм з 30 чнм вальнемупіну, що співпадає з клінічними симптомами дизентерії свиней, яку спостерігали після випадкової інфекції в цій групі. *Serpulina hyodysenteriae* не виділяли з груп з 20 та 40 чнм. Була незначна різниця в прирості ваги або перетворенні їжі між всіма дослідними групами. При розтині свиней з контрольної та тіамулінової групи, що мали клінічні симптоми захворювання, знайшли типові для свинної дизентерії ураження, що складалось з в'язкого слизу та некрозу слизової поверхні товстого кишечника. Ураження також спостерігали у однієї свині з тіамулінової групи та у контрольної тварини, у яких не спостерігали клінічних симптомів дизентерії свиней. *S. hyodysenteriae* виділяли з слизових зскребків, взятих у всіх цих уражених тварин. Одна свиня з вальнемупінової групи при введенні 30 чнм також мала ураження, характерні для дизентерії свиней, але *S. hyodysenteriae* не виділяли з слизових зскребків. Ураження не спостерігали в групах з введенням вальнемупіну в кількості 20 та 40 чнм при розтині.

В другому досліді клінічну свинну дизентерію спочатку спостерігали в контрольній групі через 5 днів після зараження, та поступово всі 9 свиней в групі були уражені, а 6 з них довелося забити внаслідок важкого протікання захворювання. В групі, що одержувала 5 чнм вальнемупіну, клінічні ознаки свинної дизентерії вперше спостерігали через 8

днів після зараження та поступово захворіли 5 тварин з 10. Однак, кількість хворих тварин в групі з вальнемупіном 5 чнм була значно меншою, ніж в контрольній групі ($p < 0,05$). Клінічних симптомів захворювання не було в групах з вальнемупіном 10 та 20 чнм. Середній клінічний показник 11 для дослідної групи з вальнемупіном 5 чнм був значно нижчим, ніж показник 77 в контролі ($p < 0,005$). *S. hyodysenteriae* виділяли з ректальних мазків всіх контрольних тварин протягом досліді. Однак, з 5 уражених тварин в групі з вальнемупіном 5 чнм *S. hyodysenteriae* виділяли тільки у 2 свиней. Свині, які одержували вальнемупін в усіх дозах, мали значно більшу вагу, ніж контрольні тварини в кінці досліді (5 чнм, $p < 0,05$, 10 та 20 чнм, $p < 0,05$, відповідно). Типове для дизентерії свиней ураження спостерігали при розтині в слизовій товстого кишечника у 3 контрольних свиней, що залишилися. В групі, що одержувала 5 чнм вальнемупіну, з 5 свиней, які спочатку виявляли симптоми захворювання тільки у 2 були визначені ураження при розтині, але у цих тварин *S. hyodysenteriae* не виділяли. Однак, *S. hyodysenteriae* виділяли із зскребків слизової, взятих у 2 інших тварин, що мали в цей час типові ураження, але не мали клінічних симптомів захворювання. Не спостерігали уражень та не виділяли *S. hyodysenteriae* у тварин, яким давали вальнемупін в дозі 10 або 20 чнм.

Таким чином, вальнемупін при введенні в кількості не менше 10 чнм являється ефективним в запобіганні появи клінічних симптомів дизентерії свиней, появи спирохет в фекаліях та наявності уражень при розтині. При 30 чнм кілька свиней виявляли клінічні симптоми дизентерії свиней, але це співпадає з випадковою інфекцією, що, можливо, впливала на всмоктування антибіотика. Раніше був показаний вплив паралельної інфекції на всмоктування антибіотика та частоту захворювання дизентерією свиней (Burch D G S, Vet Rec 110 (1982) 244 - 246). Дані по нарощуванню ваги тіла не показали розбіжностей між дослідними групами, що свідчить про те, що антибіотик не впливав на смак корму. В дозі 5 чнм вальнемупін не запобігав повністю клінічному захворюванню або появи спирохет, але відбувалось суттєве зниження в клінічних показниках та появи спирохет порівняно з контролем. В даному досліді тіамулін, що вводили з кормом в дозі 30 чнм, не запобігав дизентерії свиней, але знижував частоту захворювання порівняно з контрольною групою із зниженням клінічних показників. Однак, в даному досліді призначення з кормом вальнемупіну в кількості 10 чнм є чітко більш ефективним, ніж тіамулін в кількості 30 чнм, в запобіганні дизентерії свиней.

4. Додатковий дослід по зараженню

Групу з 60 (віком від 3,5 до 4 тижнів) традиційно утримуваних свиней годували кормом без препарату протягом 14 днів, потім заражали оральним шляхом стандартним штамом *S. hyodysenteriae* (P18A). Коли клінічні симптоми захворювання стали очевидними, свиней розбивали на шість дослідних груп по 8 свиней та годували кормом з антибіотиком протягом 10 днів, а потім кормом без препаратів протягом наступних 14 днів. Гідрохлорид вальнемупіну вводили в кількості 50, 75, 100 та 150 чнм та порівнювали з гідрофумаратом тіа-

муліну, який вводили в кількості 100 чнм, та контролю без препаратів. Свині з рядом клінічних симптомів захворювання входили в кожну дослідну групу. Після розподілу на дослідні групи наявність клінічних симптомів оцінювали кожного дня та визначали клінічний показник, ректальні мазки брали двічі на тиждень для виділення *S. hyodysenteriae* та зважували всіх свиней через певні інтервали часу. Також відмічали споживання корму. Розтин проводили через 24 дні після зараження та перевіряли товстий кишечник кожної тварини на наявність уражень. Також брали зскребки слизової з 4 відділів товстого кишечника та культивували на наявність *S. hyodysenteriae*.

Після зараження до розподілення клінічна свинна дизентерія спостерігалась через 7 днів після інфікування, а перші 2 дослідні групи (контрольна та тіамулінова) були сформовані через 8 днів після зараження. Інші групи формували через 12, 15, 20 та 28 днів після зараження в такому порядку: вальнемулін в кількості 75, 50, 100 та 150 чнм. Кожна група включала свиней, що містила кров та/або слиз в фекаліях, а також тварин, які мали лише помірні клінічні симптоми захворювання, наприклад, сухі фекалії. На 4 день досліді всі свині з контрольної групи без введення препарату показали важкі клінічні симптоми захворювання та були забиті. Протягом дослідного періоду в тіамуліновій групі померло або потребувало еutanазії 3 тварини внаслідок важкої свинної дизентерії. Всі свині, яким давали вальнемулін, залишились живими до кінця експерименту. В групах, які одержували вальнемулін в будь-якій кількості, клінічні симптоми захворювання швидко зникли, а захворювання не спостерігали з 5 днів експерименту. На 8 день це полегшення також було видно у тварин, що вижили, з тіамулінової групи. Середній клінічний показник для вальнемулінових груп сягав від 4 до 10 порівняно з середнім клінічним показником 30, одержаним для тіамулінової групи. Статистичний аналіз клінічних показників для днів 3 - 10 показав, що мала місце значна різниця між всіма групами, що одержували вальнемулін та тіамулін ($p < 0,001$). Всі групи, що одержували вальнемулін, продовжували нарощувати вагу протягом дослідного періоду і всі мали більший добовий приріст ваги тіла (DLWG), ніж тіамулінова група (діапазон 0,4 - 0,9 порівняно з 0,1). Рівень конверсії корму (FCR) був значно більшим в тіамуліновій групі (6,4) порівняно з вальнемуліновими групами (від 1,9 до 2,5) протягом дослідного періоду. *S. hyodysenteriae* виділяли з більшості свиней в кожній з груп після розподілення. Через 5 днів після розподілення *S. hyodysenteriae* не визначали в ректальних мазках, взятих у свиней з будь-якої експериментальної групи.

В період після уведення у однієї свині з групи, що одержувала вальнемулін при 50 чнм, спостерігали клінічні симптоми захворювання через 4 дні після відміни корму з препаратом, а одна свиня в тіамуліновій групі також хворіла на дизентерію свиней на останньому дні досліді. Однак, *S. hyodysenteriae* не виділяли з фекалій цих свиней. Протягом періоду після припинення введення препарату спостерігали невеликі розбіжності в DLWG та FCR між всіма дослідними групами. При розтині

наприкінці досліді не спостерігали уражень, характерних для дизентерії свиней, у жодної з свиней, яких годували вальнемуліном в кількості 75, 100 або 150 чнм. В групі, якій призначали вальнемулін при 50 чнм, 1 свиня мала клінічні прояви свинної дизентерії, та ще одна свиня з цієї групи мала деяке почервоніння товстої кишки в цей час. *S. hyodysenteriae* також висівали з зскребків слизової у цих двох свиней, та ще у 3 свиней в цій групі, що не мали уражень, характерних для свинної дизентерії. У однієї свині з групи, якій призначали вальнемулін в дозі 75 чнм, також висівали *S. hyodysenteriae* з зскребків слизової, хоча і не спостерігали клінічних симптомів свинної дизентерії.

Таким чином, вальнемулін в кількості 50, 75, 100 та 150 чнм сприяє зниженню кількості днів, що потрібні для одужання від клінічної свинної дизентерії, порівняно з тіамуліном. Також, тварини не умирали та не потребували еutanазії в цих вальнемулінових групах. Спостерігали значну різницю ($p < 0,001$) в клінічних показниках для вальнемулінових груп порівняно з тіамуліновою групою. Крім того, мало місце запобігання при всіх рівнях вальнемуліну виділення *S. hyodysenteriae* з фекаліями після припинення годування препаратом. Однак, *S. hyodysenteriae* виділяли зі зскребків слизової у свиней, які одержували вальнемулін при 50 та 75 чнм. Було показано, що тіамулін при 35 та 40 чнм усуває *S. hyodysenteriae* з фекалій, але не запобігає висіванню їх зі зскребків слизової (Tylor D J, Vet Rec 106 [1980] 526-528). Тіамулін при 100 чнм успішно використовували в умовах експерименту (Tylor D J, Proc 7th IPVS Congress Mexico [1982] 47) для лікування свинної дизентерії у тварин, що не були тяжко уражені, і хвороба протікала безсимптомно. В цьому досліді тіамулін при 100 чнм знижав смертність порівняно з контролем без призначення препарату, але не запобігав декільком смертям, що, можливо, було викликано важкістю захворювання, викликаного даним експериментальним зараженням.

В даному досліді вальнемулін в кормі в дозі 50, 75, 100 та 150 чнм, таким чином, успішно лікував експериментально викликану дизентерію свиней з запобіганням смертності та припиненням клінічних симптомів. Екскреція *S. hyodysenteriae* також припинялась протягом експерименту з відновленням після закінчення призначення у однієї тварини, якій вводили 50 чнм. Вальнемулін при 50 та 75 чнм не видаляв повністю *S. hyodysenteriae* з всіх свиней, але при 100 чнм був високо ефективним.

Сполука винаходу є, таким чином, корисною в терапії свинної дизентерії, викликаній інфекцією *S. hyodysenteriae*. Для цього ефективна доза, звісно, відрізняється залежно від солі, що використовується, способу уведення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу. Однак, загалом, задовільних результатів досягають, якщо препарат вводять в добовій дозі приблизно 1 мг/кг - 5 мг/кг ваги тіла тварини, що зручно вводити окремими дозами від двох до чотирьох раз на день, або ad libitum з кормом та водою, або у пролонгованій формі. Для більшості тварин загальна добова доза складає

від приблизно 10мг до приблизно 400мг, а саме від приблизно 10мг до приблизно 200мг для профілактики та приблизно від 20мг до приблизно 400мг для лікування, уведених *ad libitum* з кормом та водою раз чи двічі на день

Переважаючими дозами у питній воді є дози від 0,001 до 0,05% ваг/об, особливо від 0,001 до 0,005%, та у кормі від 20 до 100г/метрична тона, особливо від 20 до 75г/метрична тона

С Коліт свиней, пов'язаний з інфекцією *Serpulina pilosicoli*

Коліт можна діагностувати традиційним способом, так як описано в довідниках по ветеринарії, наприклад, у Taylor D J, in Pig Diseases, 6th Ed (1995), Publ D J Taylor, Glasgow, UK на стор 148-149 Цілющу активність сполуки винаходу в даному використанні досліджували, наприклад, так, як описано нижче

1 Величини МИК

Використовували дев'ять польових ізолятів WBHS з спалахів дизентерії свиней зі стад з діареєю та без неї, а також ATCC 29796 (*Serpulina innocens*, група 3) (Fellstrom, C, Res Vet Sci 53 [1995] 1 - 4) Ідентифікація базувалась на даних гемолізу на TSA (соевий агар Tryticase) з 5% кров'ю BPX та на тесті на вироблення індоли та гідролізі плурату (Rosco Diagnostic Tables, Taastrup, DK) З дев'яти

слабо бета-гемолітичних спірохет, одна була віднесена до групи 2, чотири до групи 3 та п'ять до групи 4 (Fellstrom, вищевказане посипання) Ці бактерії переносили з агарових чашок в 0,9% фізіологічний розчин, та перемішуванням довели до при 1,0 по шкалі МакФерланда перед тим, як 10мкл кожного ізоляту наносили на агарові чашки з двократними концентраціями слідуючих антимікробних речовин: гідрохлориду вальнемуліну, гідрофумарату тіамуліну, диметридазолу, гідрохлориду лінкоміцину та тілозину Ріст та гемоліз реєстрували через 4 дні анаеробного росту, а МИК визначали як мінімальну концентрацію антибіотиків, при якій не росли спірохети

Результати вимірювання МИК для WBHS показані в Табл 6 Загалом WBHS виявились чутливими до всіх п'яти антибіотиків Не було різниці в чутливості до будь-якого тестуємого антибіотика між трьома групами WBHS Одержані величини МИК для вальнемуліну були найменшими для 9 штамів з 10, в той час як вони були набагато вищими для значної більшості штамів з 4 контрольними речовинами

Висока ефективність вальнемуліну по відношенню до обох WBHS робить цю сполуку цікавою для використання при клінічних випадках в заражених стадах

Таблиця 6

Величини мінімальних інгібуючих концентрацій (МИК) для 10 слабких бета-гемолітичних спірохет

Бактерицидний засіб ¹⁾					Тілозин
МИК (мкг/мл)	Вальнемулін (гх)	Тіамулін (гф)	Диметридазол	Лінкоміцин	
0,0156	9	4			
0,0312		2			
0,0625	—	3	2		
0,125		-	4		
0,250		-	4		
0,500		-	-	4	
1	1	1	-	1	
2			-		2
4					
8			-		1
16			-		
32				1	
64			-	1	
128				3	
>128				-	7

¹⁾ Цифра є кількістю слабких бета-гемолітичних спірохет, визначених як тих, що мають дану МИК

гх - гідрохлорид

гф - гідрофумарат

Отже, сполука винаходу є корисною в терапії коліту свиней, пов'язаним з інфекцією *Serpulina pilosicoli* Для цього ефективна доза, звісно, буде різною залежно від солі, що використовується, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу Однак, загалом, задовільних результатів досягають, якщо препарат вводять в добовій дозі приблизно 1мг/кг - 5мг/кг ваги тіла тварини, що зручно вводити окремими дозами від двох до чотирьох раз на день, або *ad libitum* з кормом та водою, або у пролонгованій формі Для більшості тварин загальна добова доза складає

від приблизно 10мг до приблизно 400мг, наприклад, від приблизно 10мг до приблизно 200мг для запобігання та від 20мг до приблизно 400мг для лікування хвороби, уведених *ad libitum* з кормом або водою раз чи двічі на день

Переважаючими дозами у питній воді є від 0,001 до 0,05% ваг/об, особливо від 0,001 до 0,005%, та у кормі від 20 до 100г/метрична тона, особливо від 20 до 75г/метрична тона

Д Інєт свиней, пов'язаний з інфекцією *Lawsonia intracellularis*

Інфекцію *Lawsonia intracellularis* можна діагностувати традиційним способом, так як описано в довідниках по ветеринарії, наприклад, у Taylor

D J, in Pig Diseases, 6th Ed (1995), Publ D J Taylor, Glasgow, UK на стор 154 - 157 Цілющу активність сполуки винаходу в даному використанні досліджували так, наприклад, як описано нижче

1 Активність in vitro

В цілому дотримувались способу Lawson G N K et al J Clin Microbiol 31 (1993) 1136 - 1142 з деякими модифікаціями (стандартний диск-метод Kirby-Bauer не використовують для внутрішньоклітинних бактерій)

Клітини одержували моношари клітинних культур IEC-18 ентероцитів щурів (ATCC CRL 1589) та культивували їх стандартними для культур клітин способами. Моношари одноденних клітин, що діляться, (приблизно 30% зливання) готували на накрівному склі у маленьких культуральних флаконах (Ttacs) для інфекції на 0 день

Інокулят. Проби з трьох штамів *Lawsonia intracellularis* використовували як інокулят. Вони походили з свиней, що страждали на проліферативну ентеропатію форми проліферативної геморагічної ентеропатії (PHE) та свиноного кишкового аденоматозу (PIA), одержаних з кишечника свиней, та вирощуваних в культурі клітин так, як описано вище в способі за Lawson. Два штами PHE частково аналізували на патогенність на свинях так, як описано McOrst S et al, Infect Immun 61 (1993) 4286 - 4292. Серії інокулятів збирали після кількох клітинних пасивувань та зберігали в замороженому стані при -70°C в 1мл пробірках. Попередні випробування встановили підходящі розведення матеріалу з відтанувших пробірок, що призводять до клітинної інфекції, що добре розпізнається при 5-денному досліді

Антибіотики готували як 100-кратні вихідні розчини для кожного використання. Активність кожної серії антибіотиків підтверджували в стандартному дисковому способі Кірбі-Бауера з лабораторним штамом *Escherichia coli*

Інфікування для використання в чотирьох групах 1 - 4 на 0 день пробірку з кожним штамом заморожували, розводили 1/8 - 1/32 культуральним середовищем

Для груп 4 (подовжене випробування) даний інокулят спершу інкубували протягом 1 години при 37°C в культуральному середовищі, що містило антибіотик в різних концентраціях, перед додаванням до клітин

Для групи 3 (позаклітинна активність) цей інокулят готували в культуральному середовищі, яке

містило антибіотик в різних концентраціях, який додавали безпосередньо перед додаванням до клітин

Для групи 1 (контроль) та 2 (внутрішньоклітинна активність) інокулят готували в культуральному середовищі, вільному від антибіотиків, та додавали до клітин. Культуральні флакони (Ttacs) з клітинами, до яких додавали інокулят (+/- антибіотик) в загальному об'ємі 0,5мл середовища, вміщували в сталі посудини, в яких створювали 40% вакуум (8% O₂), залишали на 2хв, заповнювали воднем та, остаточно, 10% CO₂-Флакони потім виймали з посудин та вміщували в інкубатор, встановлений на забезпечення вологої атмосфери з 8% O₂, 8,8% CO₂ та решта азоту, при 37°C

На 1 та 2 день всі флакони виймали та заливали свіжим середовищем, що або містило антибіотики, групи 2 та 4, або не містило, групи 1 та 3, та знову вміщували в інкубатор. На 5 день видаляли усі накрівні скельця та проводили забарвлення на *Lawsonia intracellularis* непрямим імунопероксидазним способом, використовуючи специфічні моноклональні антитіла. Кількість клітин на кожному склі, інфікованому *Lawsonia intracellularis* з високою множиною (>30 на клітину, "тяжко заражена клітина"=ТЗК), використовували як основну міру інфекції. Також відмічали кількість фокусів ТЗК та загальне обстеження клітин ТЗК в контролі (група 1), досліді по внутрішньоклітинній дії антибіотика (група 2), досліді по зовнішньоклітинній дії антибіотика (група 3) та подовженому досліді (група 4) порівнювали в трьох паралелях для 3 штамів. Деякі досліді повторювали для інокулятів різної сили. Відсоткові величини підраховували після розрахунку середніх ТЗК контролів, що відповідають дослідній групі. Середнє значення контролю ТЗК є загальною кількістю ТЗК в контрольних флаконах, розділеною на кількість інфікованих контрольних флаконів. Потім розраховували відсоткове відношення дослідних флаконів шляхом розділення величини їх ТЗК на середній контрольний ТЗК, помножений на 100 для одержання значення у відсотках. Тобто, дослідні флакони, де антибіотики не мали впливу, мали б відсоткове відношення близько 100, а де антибіотики повністю інгібували ріст, відношення буде 0

Одержані результати для вальнемуніну підрохлориду є такими, як представлено в таблиці 7, яка показує відсоток клітин, які залишаються неінфікованими після зараження

Таблиця 7

Відсоткові відношення інфекції *Lawsonia intracellularis* в культурах клітин з додаванням вальнемуніну

Концентрація Вальнемуніну (гх) (мкг/мл)	група штамів			група штамів		
	2	3	4	2	3	4
8	0	0	0	0,86	0,2	0,5
	0	0	0	0	0	1,4

Таблиця 7 (продовження)

Концентрація Вальнемуніну (гх) (мкг/мл)	група штамів			група штамів		
	2	3	4	2	3	4
8	0	0	0	0	1,4	0,2
4				0	0	0,8

23	56173			24		
				0 1,7	0,83 1,7	2,5 2,5
2	0 0 0	0 0 -	0 0 28			
гх-гідрохлорид						

Ці дані свідчать, що мінімальна концентрація гідрохлориду вальнемуліну, що призводить до значного інгібування росту *Lawsonia intracellularis* (<1% росту) є <2мг/мл

2 Дослід по зараженню

Тридцять п'ять відлучених свиней зарахували в один день вірулентним інкулятом *Lawsonia intracellularis* (штам LR189/5/83), ізолятом збудника свинної проліферативної ентеропатії, одержаного культивуванням на лінії клітин ентероцитів щурів IEC-18 (ATCC CRL 1589), як описано у Lawson et al, J Clin Microbiol 31 (1993) 1136-1142. Семи контрольним свиням давали буферний розчин. Сім з 21 заражених свиней залишали без лікування. Ці сім свиней мали знижений приріст ваги та у всіх розвинулись ураження, характерні для проліферативної ентеропатії, що виявлялися на зрізах кишечника, що брали шляхом аутопсії через 3 тижні після зараження. Шість з цих 7 свиней мали значні візуальні ураження, три мали від м'якої до середньої діареї через два тижні після зараження. Для дослідження дозової стратегії "запобігання" дві інші групи заражених свиней одержували дозу гідрохлориду вальнемуліну орально по 25чм та 75чм, відповідно (тобто, 1,25мг/кг та 3,7мг/кг) з преміксом, що давали за два дні до зараження, та продовжували до евтаназії. Для дослідження стратегії "лікування" дві інші групи заражених свиней одержували орально вальнемулін по 25чм та 75чм з преміксом, що давали через 7 днів після зараження, та продовжували до евтаназії.

В зрізах кишечника, взятих аутопсією, у 3 з 7 свиней в групі з "запобіганням" та у 5 з 7 свиней в групі по "лікуванню" не спостерігали уражень проліферативною ентеропатією. Контрольні тварини залишались нормальними. Таким чином, вальнемулін запобігав або лікував дане захворювання у великій пропорції заражених свиней навіть в дійсно низьких призначених дозах.

Таким чином, сполука винаходу є корисною при терапії ілеїту у свиней, пов'язаного з інфекцією *Lawsonia intracellularis*. Для цього ефективна доза, звісно, відрізняється залежно від солі, що використовується, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу. Однак, загалом, задовільних результатів досягають, якщо препарат уводять в добовій дозі приблизно 1,5мг/кг - 6,5мг/кг ваги тіла тварини, що зручно вводити окремими дозами від двох до чотирьох раз на день, або *ad libitum* з кормом та водою, або у пропонгованій формі. Для більшості тварин загальна добова доза складає від приблизно 10мг до приблизно 1000мг, переважно від приблизно 15 до приблизно 500мг, що дають раз чи двічі на день.

Переважними дозами у питній воді є від 0,001 до 0,05%ваг/об, особливо від 0,001 до 0,005%, та у

кормі від 20 до 400г/метрична тона, особливо від 20 до 200г/метрична тона.

Е) Хронічне респіраторне захворювання та артрит у домашньої птиці, пов'язані з інфекцією *Mycoplasma gallisepticum*.

Інфекцію можна діагностувати традиційним шляхом, наприклад, для *Mycoplasma gallisepticum* так, як описано у ветеринарному довіднику *Diseases of Poultry*, 8th Ed (1984), Ed Hofstad et al, Iowa State University Press, на стор 196 - 198. Лікувальну дію сполуки винаходу в даному використанні досліджували так, як показано нижче.

1 Активність in vitro, MİK

Антимікробний ефект гідрохлориду вальнемуліну визначали з використанням стандартної методики серійних мікророзведень порівняно з тілозином (Тілан розчинний) та гідрофумаратом тімуліну.

12,8мг дослідної речовини розчиняли у 100мл дистильованої води для одержання вихідного розчину, який зберігали при -20°C до використання. Контрольні штами *Mycoplasma gallisepticum*, що використовували, були X95, S6 Holland, S6 Bench (Англія), MS-16 (Японія), MK-7 (Японія) та 1226, а також різні свіжі польові ізоляти.

Чутливість даних штамів до антибіотиків вивчали, використовуючи модифіковану процедуру з розведеннями мікробульйону (Spitcovits et al, Vet Microbiol 15 [1987] 65-70). Середовище, що тестували, додавали (100мкл) до всіх лунок планшетів для мікротитрації, використовуючи подвійні розведення антибіотиків. Інокуляти (100мкл) містив 10^5 к/о/мл. Планшети закривали плівкою та інкубували при 37°C протягом 3 днів. Найнижча концентрація антибіотика, що повністю запобігає зміні кольору середовища на третій день, є мінімальною інгібуючою концентрацією (MİK). Лунки без зміни забарвлення перевіряли на життєздатність мікоплазми шляхом висівання на агарі. Всі штами *Mycoplasma* розмножували в 10мл середовища В (Erno, H and Stipkovits, L, Acta Vet Scand 14 [1973] 436 - 449). Після інкубації при 37°C до ранньої лог-фази росту аліквоти культури по 1мл вносили в пробірки в якості посівної культури та зберігали при -20°C. Штами *Mycoplasma*, що ферментують глюкозу, аналізували в модифікованому середовищі Вg, до якого додавали 1% глюкозу (рН 7,8), штами, що гідролізують аргінін, в середовищі Ва (Erno, H and Stipkovits, L, вищевказане посилання, стор 450 - 463), яке містило 1% аргінін (рН 7,3), а глюкоза- та аргінін-негативні штами - в середовищі В, яке містило 1% хлорид трифенілтетразолу.

Розраховували усереднені величини MİK для різних груп штамів та антибіотиків з урахуванням розведень.

Величини MİK референтних штамів показані в таблиці 8, а ізоляти *Mycoplasma* - в таблиці 9.

Величини МІК референтних штамів *Mycoplasma gallisepticum* (мкг/мл)

Штам	Вальнемупін (гх)	Тіамупін (гф)	Тілозин
Bench	0,0312	0,0312	0,0312
Holland	0,0312	0,0312	0,0312
МК-7	0,0078	0,0312	0,0312
MS-16	0,0312	0,0312	0,0312
1226	0,0312	0,25	0,0312
гх-гідрохлорид	гф - гідрофумарат		

Таблиця 9

Величини МІК ізолятів *Mycoplasma* курячого походження (мкг/мл)

Штам	Вальнемупін (гх)	Тіамупін (гф)	Тілозин
20002	0,0625	0,25	0,25
20006	0,0625	0,0625	0,25
20008	0,0625	0,0625	0,0625
20174	0,0625	0,25	0,25
20175	0,0625	0,5	2,0
20176	0,0625	0,25	2,0
20177	0,0625	0,25	1,0
20178	0,0625	0,5	2,0
20224	0,0312	1,0	4,0
20312	0,0312	0,25	4,0
20321	0,0312	0,0312	0,5
20472	0,0312	1,0	16,0
20473	0,0312	0,5	32,0
20474	0,0312	1,0	16,0
20475	0,0312	0,5	32,0

Результати, одержані для референтних штамів *Mycoplasma*, показують, що три сполуки дають більш-менш однакову активність. Величини МІК пташиних польових ізолятів, однак, відображають явні розбіжності між дослідними сполуками в той час, як чутливість до вальнемупіну є стандартно високою (0,03 - 0,06 мкг/мл), чутливість до тіамупіну є дещо зниженою (0,06 - 1 мкг/мл), а щодо тілозину, то виявлені навіть резистентні штами з чіткою (0,06 - 32 мкг/мл).

2 Досліди по зараженню

2.1 Профілактика

Групи самців курчат-бройлерів інфікували вірулентними штамми *Mycoplasma gallisepticum* (MG), та кожній групі призначали, відповідно, один медикамент з наступних вальнемупін (концентрації 0,00312, 0,00625, 0,0125 та 0,025%), тіамупін (0,00625, 0,0125 та 0,025%) та тілозин (0,05%). Інфікування проводили на 2 день шляхом ін'єкції 0,1 мл культури *Mycoplasma gallisepticum*, що містила приблизно 10^6 кую живих організмів, в кожну з легенів (Jordan F.T.W. The Veterinary Record 127 [1990] 502), а препарати вводили в межах 1 часу після інфікування та продовжували протягом трьох наступних днів. Брали також інфіковану групу без призначень та неінфіковану групу.

Одержані результати показують, що запобігання клінічних симптомів та смертності були однаково задовільними для груп, яким призначали дві найбільш високі дози вальнемупіну (0,0125 та 0,025%), три дози тіамупіну та тілозин. Ураження спостерігали у декількох курчат, і вони були менш

тяжкими при використанні тілозину, за яким стоїть тіамупін, а потім дві високі дози вальнемупіну (0,0125 та 0,025%). Дві нижчі дози вальнемупіну були в цьому плані менш ефективними. Найбільш високі прирости ваги були в групах, яким призначали тілозин, потім, суттєво гіше ($p < 0,05$), була група інфікованих птахів, яким вводили тіамупін та вальнемупін в усіх, окрім нижчої, дозах. Найбільш низькі прирости ваги одержували в групах, яким призначали найнижчу дозу вальнемупіну, та в інфікованій групі без призначення, та вони не відрізнялись одна від одної. MG не знаходили протягом життя та під час аутопсії у неінфікованій групі, курчат з високими дозами тіамупіну та тілозином, та виділяли лише у одного птаха з групи, що одержувала найвищу дозу вальнемупіну. Більш високі пропорції виділення були у всіх інших інфікованих груп. Серологічні результати не повністю відображають це для тілозину, оскільки існувала відносно велика пропорція позитивних показників в цій групі.

Таким чином, було показано, що при запобіганні інфекції *Mycoplasma gallisepticum* у молодих курей дві найвищі дози вальнемупіну є такими ж активними, як і референтні сполуки.

2.2 Лікування

Групи самців курей-бройлерів інфікували вірулентним штамом *Mycoplasma gallisepticum* (MG) та кожній групі призначали відповідно, вальнемупін в концентраціях 0,0125%, 0,025%, 0,05%, тіамупін в такій самій концентрації, 0,05% тілозин та 0,083% комбінацію лінкоспектіну та спектіноміцину (Linco-

Spectin) Брали також інфіковану групу, яку залишали без лікування, та неінфіковану групу. Курчат заражували на другому дні життя шляхом ін'єкції $3,4 \times 10^5$ організмів в кожну з легенів. Препарат у питній воді призначали 24 годинами пізніше протягом трьох днів, крім Linco-Spectin, з яким лікування тривало 5 днів.

Одержані результати показують, що контроль смертності, не більший ніж 5%, був найкращим з всіма трьома концентраціями вальнемупіну та 0,05% тіамуліном. Ураження не спостерігали у курчат, яким призначали найвищу та найнижчу дози вальнемупіну, та лише у кількох курчат, які одержували тіамулін та тілозин. Прирости ваги для вальнемупіну в усіх концентраціях були більш високими, ніж в тіамулінових групах та рівними тілозиновій групі. Мікоплазму не виділяли після 23 днів експерименту, у 3 груп птахів, яким давали вальнемупін, та яким давали тілозин. Згідно з серологічними результатами в цей час відбувалися деякі позитивні зміни в усіх інфікованих групах.

З урахуванням смертності, приросту ваги, виділення MG та результатів тестів по аглютинації сироватки дві вищі дози (0,025% та 0,05%) вальнемупіну, що давали з питною водою, показали результати, принаймні, такі самі або навіть кращі, ніж 0,05% тіамуліну або 0,05% тілозину, та набагато кращі, ніж Linco-Spectin.

Сполука винаходу є, таким чином, корисною при терапії хронічного респіраторного захворювання та артриту птахів, пов'язаних з інфікуванням *Mycoplasma gallisepticum*. Для цього ефективна доза, звісно, відрізняється залежно від солі, що використовується, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу. Однак, загалом, задовільних результатів можна досягти, якщо дану сполуку вводити з питною водою в дозах від приблизно 0,005 до приблизно 0,05% ваг/об, особливо від 0,01 до 0,03%, та у кормі від 20 до 400г/метрична тона, особливо від 20 до 200г/метрична тона.

Г) Вторинна інфекція *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* та/або інфекція *Haemophilus parasuis*.

Вторинну інфекцію *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* та/або *Haemophilus parasuis* можна діагностувати традиційним способом, таким, як описано у ветеринарних довідниках, наприклад, Taylor D.J., in *Pigs Diseases*, 6th Ed (1995), Publ. D.J. Taylor, Glasgow, UK на стор 185 - 187, 188 - 194 та 194 - 197. Лікувальну активність сполуки винаходу в даному використанні досліджували так, наприклад, як описується нижче.

Вивчали мінімальну інгібуючу концентрацію (MIK) для гідрохлориду вальнемупіну проти свіжовиділених *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* та *Haemophilus parasuis*, що мають походження з матеріалу респі-

раторного тракту свині, та порівнювали з тіамуліном. Використовували культури бактеріальних ізолятів, що включали 10 *P. multocida*, 10 *H. pleuropneumoniae* та 3 *H. parasuis*, виділені на протязі останніх 5 років у хворих свиней, як показано при розтині. Три ізоляти *Pasteurella* були токсигенними штамми *Pasteurella multocida*. Для *H. pleuropneumoniae* та *H. parasuis* за день до тестування одичну петлю кожної з чистих культур вносили в 10мл бульйону Todd & Hewitt (Unipath CM190), який містив 1% сироватки теляти та 2мг/мл нікотинамідаденідинуклеотиду (НАД). Для *P. multocida* в день тестування одичну петлю кожної з чистих культур вносили в 10мл поживного бульйону №2 (Unipath CM67), що містив 1% сироватку бика. Кожну з одержаних бульйонних культур інкубували протягом 18 годин при 37°C в 10% CO₂. Після інкубації та в день тестування 23 бульйонні культури розводили до 10⁵ - 10⁶ організмів в мл в стерильному фізрозчині з препаратом для інкуляції культурального середовища MIK. Для кожної дослідної сполуки були також встановлені стандартні контролюні культури з Oxford Staphylococcus aureus NCCTC 6571 для перевірки результатів по тестам MIK. В кожному випадку бульйонні культури, одержані з контрольних організмів, були ідентичними дослідним організмам. Використовували гідрохлорид вальнемупіну, гідрофумарат тіамуліну. В день досліду готували вихідні розчини дослідних сполук, що містили 3,2мг/мл активного інгредієнту, в стерилізованій дистильованій воді. Надалі готували дев'ять двократних розведень в стерильній дистильованій воді, створюючи діапазон концентрацій антибіотика від 320мкг до 1,25мкг в мл для включення до середовища MIK. Готували чутливий агар (Oxoid CM4009), який містив лізовану кров коня (Oxoid SR50), відповідно до рекомендацій виробника, та підводили pH до 7,4 при потребі. В усі серії середовищ MIK, що готували для дослідів MIK для двох штамів *Haemophilus*, додавали 2мг на мл НАД для забезпечення необхідного фактору росту. 18мл плавленого агару (50°C) змішували з 2мл (розведення від 1 до 10) кожного з одержаних розведень дослідної сполуки в 90мм чашках Петрі. Готували чотири паралельні чашки з кожного розведення. Для кожного досліду MIK готували також 4 паралельні чашки, що містили 18мл агару та 2мл стерильної дистильованої води, які відігравали роль індикаторів росту.

На застиглих MIK чашки наносили 0,2мл підготовлених дослідних організмів, чашки з *P. multocida* інкубували на повітрі при 37°C протягом 18 годин, чашки з *H. pleuropneumoniae* та *H. parasuis* інкубували при 37°C протягом 18 годин в 10% CO₂. Після інкуляції ріст організмів перевіряли спершу на око, а потім мікроскопічне на стереоскануючому мікроскопі. Величини MIK брали як найнижчі концентрації дослідної сполуки, при якій не може бути визначений ріст в точці інкуляції на всіх 4 чашках при мікроскопічному дослідженні.

Одержані результати зведені в Табл. 10.

Таблиця 10

MIK (мкг/мл)

Патоген	Сполука	
	Вальнемупін (гх)	Тіамупін (гф)
<i>Pasteurella multocida</i>		
Діапазон	2,0 - 8,0	4,0 - 16
Середнє	3,8	9,2
<i>Haemophilus pleuropneumoniae</i>		
Діапазон	0,125 - 4,0	0,125 - 16
Середнє	0,85	4,5
<i>Haemophilus parasuis</i>		
Діапазон	0,25	0,5 - 1,0
Середнє	0,25	0,7
гх - хлорид	гф - гідрофумарат	

Звідси видно, що вальнемупін порівняно з тіамупіном мав середнє зростання у два з половиною рази по активності проти *P. multocida*, зростання у п'ять з половиною рази проти *H. pleuropneumoniae* та зростання у три рази проти *H. parasuis*.

Таким чином, сполука винаходу є корисною в терапії вторинної пневмонії у свиней, пов'язаної з інфекцією *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* та/або *Haemophilus parasuis*. Для цього ефективна доза, звично, відрізняється залежно від солі, що використовуються, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу. Однак, загалом, задовільних результатів досягають, якщо препарат вводять в добовій дозі від приблизно 5 мг/кг до приблизно 15 мг/кг ваги тіла тварини, що зручно вводити окремими дозами від двох до чотирьох раз на день, або ad libitum з кормом та водою, або у пролонгованій формі. Для більшості тварин загальна добова доза складає від приблизно 100 мг до приблизно 1000 мг, переважно від приблизно 100 до приблизно 500 мг, що дають раз чи двічі на день.

Його можна успішно вводити в якості монотерапії.

Переважаючими дозами у питній воді є від 0,01 до 0,05 ваг/об, особливо від 0,01 до 0,025%, та у кормі від 100 до 400 чнм (г/метрична тона), особливо від 100 до 200 чнм.

Г) Пневмонія у ягнят, овець та великої рогатої худоби, що пов'язана з інфекцією *Pasteurella haemolytica*.

Інфекцію *Pasteurella haemolytica* можна діагностувати традиційним способом, так, як описано в довідниках по ветеринарії, наприклад, *Veterinary Medicine*, 8th Ed (1994), Eds. Radostits, O M, Blood, D C, Gay, C, C, Publ. Bailliere Tindall, London, U K, pp 748 - 770. Лікувальну активність сполуки винаходу в даному використанні визначали *In vivo* сплідуючим чином.

Клінічну ефективність досліджували для двох препаратів вальнемупіну гідрохлориду при лікуванні пневмонії у телят завдяки контрольованій інфекції *Pasteurella haemolytica* A1.

На день -6 24 теляти, у яких в назальних мазках не виявляли *P. haemolytica* A1, зважували та розподіляли на 4 дослідні групи по 6 збалансованих за вагою та за статтю. Телят поміщали у індивідуальні відски в звичайному телятнику, де вони проходили акліматизацію протягом 33 днів до переселення. Проби крові брали двічі на етапі перед

дослідом для аналізу антитіл до лейкотоксину як можливого показника наявності *P. haemolytica* A1.

Обробку починали на день -1 приблизно за 27 годин до часу зараження.

Група 1 - Контроль,

Група 2 - гідрохлорид вальнемупіну 2,5%, ін'єкція (2,5 мг/кг двічі в день),

Група 3 - гідрохлорид вальнемупіну 10% премікс орально з замісником молока (5,0 мг/кг двічі в день),

Всіх телят заражали на 0 день шляхом ендобронхіального введення 30 мл бульйонної культури *P. haemolytica* A1 (M4/1/3, Moredun Research Institute - $1,25 \times 10^8$ КУО/мл) за допомогою фіброоптичного бронхоскопу. Клінічне спостереження проводили один раз на день на дні -3 та -2, та двічі на день на дні від -1 до 3. Клінічні показники зводили до чотирьох параметрів: ректальна температура, частота дихання, природа дихання та поведінка. Також обстежували місця ін'єкцій. Всіх телят, що лежали, та/або демонстрували депресію та/або симптоми респіраторного дистресу, або які мали клінічний показник більший за 5 при одиничному обстеженні на 0 - 3 дні, моментально гуманно вбивали евтаназією шляхом внутрішньовенного введення летальної дози Пентобарбітону Натрію BP (Pentobarbitone Sodium BP (Vet)) 20% ваг/об та проводили аутопсію протягом 24 годин. Телятам, що вижили на 4 день після зараження *P. haemolytica*, проводили евтаназію на 4 день, дотримуючись такої самої процедури, що і для телят на 0 - 3 день. З усіх телят видаляли легені та оцінювали візуально на консолидовані ураження та плевральні спайки. Проби тканини легенів брали з 8 стандартних місць та аналізували на присутність *P. haemolytica* для визначення величини індексу виділення. Мазки крові з серця брали у телят, які померли раптово, та аналізували їх на присутність *P. haemolytica*.

Були розраховані індивідуальні та загальні групові, групові середні величини та групові медіани для всіх параметрів: загальний клінічний показник, показник консолидованих уражень, індекс виділення, показник плевриту та загальний показник. Індивідуальні та загальні групові, групові середні величини та групові медіани розраховували для всіх категорій, що утворюють загальний клінічний показник: ректальна температура, частота дихання, природа дихання та поведінка. Основним аналізом був тест Kruskal-Wallis, що застосовували (Minitab 9) для визначення того, чи є різниця між будь-яким груповим показником для кожного з па-

раметрів загальний клінічний показник, показник консолідованого ураження, індекс виділення, показник плевриту та загальний показник. Значення тесту Kruskal-Wallis показує, що дані групи (але не всі) не є ідентичними повністю. Для визначення того, які групи відрізняються, групи досліджували попарно, використовуючи тест Mann-Whitney (Mini-tab 9).

Було спостережено, що порівняно з телятами без призначення (Група 1) загальні клінічні показники ($p=0,013$) є значно нижчими у телят, яким призначали 10% премікс вальнемоліну, 5,0 мг/кг/доза, двічі кожного дня орально з замінувачем молока протягом п'яти днів, починаючи з 27 годин до зараження *P. haemolytica* A1.

Загальні клінічні показники були також зниженими, але не так статистично суттєво, у телят, яким вводили внутрішньом'язово 2,5% вальнемоліну при 2,5 мг/кг/доза двічі на день протягом п'яти днів, починаючи з 27 годин до зараження *P. haemolytica* A1.

При порівнянні загальних клінічних показників не було значних розбіжностей між групами, які одержували лікування.

Таким чином, сполука винаходу є корисною в терапії пневмонії у ягнят, овець та корів, пов'язаної з інфекцією *Pasteurella haemolytica*. Для цього ефективна доза, звісно, відрізняється залежно від солі, що використовується, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу. Однак, загалом, задовільних результатів досягають, якщо препарат вводять в добовій дозі від приблизно 5 мг/кг до приблизно 15 мг/кг ваги тіла тварини, що зручно вводити окремими дозами від двох до чотирьох раз на день, або *ad libitum* з кормом та водою, або у пролонгованій формі. Для більшості тварин загальна добова доза складає від приблизно 250 мг до приблизно 3000 мг, переважно від приблизно 250 до приблизно 1000 мг, що дають раз чи двічі на день, або вводять *ad libitum* з кормом.

Н) Поліартрит у свиней, пов'язаний з інфекцією *Mycoplasma hyosynoviae*.

Інфекцію *Mycoplasma hyosynoviae* можна діагностувати традиційним способом так, як описано у ветеринарних довідниках, наприклад, у Taylor D J, in *Pig Diseases* 6th Ed (1995), Publ D J Taylor, Glasgow, UK на стор 172 - 173. Лікувальну активність сполуки винаходу в даному використанні досліджували так, наприклад, як описується нижче.

1 Активність в тканинних ізолятах *in vitro* (дослідження МІК).

Проби тканин одержували з легенів свиней з різних стад, уражених ензоотичною пневмонією свиней (ЕПС). Для культивування проби перевозили на сухому льоді. З чотирьох ізолятів із зразків легенів, з яких спершу виділяли *Mycoplasma hyopneumoniae*, повторно виділяли *Mycoplasma hyosynoviae*, після виявлення в представлених пробах (знову заморожених при -70°C) при культивуванні *M. hyopneumoniae* того, що деякі зразки дають прекрасний ріст колоній, що мають типову морфологію *Mycoplasma hyosynoviae*. Три додаткові ізоляти були виділені з інших зразків легенів. Всі ізоляти серологічно ідентифіковували по інгібуванню дискового росту з специфічною кроплячою антисироваткою, одержаною проти *Mycoplasma hyosynoviae*. Для виділення *M. hyosynoviae* з тканин легенів використовували комерційне доступне тверде середовище (*Mycoplasma Experience Ltd*). Для дослідження МІК використовували рідке середовище (*Mycoplasma Experience Ltd*), яке містило феноловий червоний та аргінін (pH 7,0).

Вихідні розчини сполук, що вивчали, готували в концентрації 1 мг/мл в деіонізованій воді, стерилізований фільтрацією через мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм (Sartorius Minisart, N) та зберігали при -20°C . Для використання в досліді МІК вихідні розчини розводили в рідкому середовищі до подвійної кінцевої концентрації. Досліди МІК проводили згідно зі способом Tanner & Wu, *Avian Diseases* 36 (1992) 714 - 717. Культури для дослідів, що ростуть активно, готували або з аліквот по 1 мл бульйонних культур, які зберігали при -70°C , або з культур, що зберігаються в агарі при -70°C . Культури для дослідів по зараженню розводили до одержання цільового титру 10^5 - 10^6 одиниць зміни забарвлення/мл. Аліквоти по 0,1 мл інкуляту для зараження змішували з аліквотами по 0,1 мл розведеного антибіотика в лунках для мікротитрації. Кожен планшет для мікротитрації містив незаражене середовище при pH 7,6 (контроль кінцевої точки) та заражені контролю без антибіотиків. Всі планшети покривали липкою плівкою та інкубували аеробно при 36°C . МІК досліджували, коли зміна кольору в контрольних лунках відповідала pH контролю кінцевої точки. МІК була найменшою концентрацією, що не змінювала колір.

Одержані результати зведені в Таблиці 11 для вальнемоліну гідрохлориду та двох порівняльних сполук - гідрофумарату тіамуліну та енрофлоксацину.

Таблиця 11

Чутливість 7 польових ізолятів *Mycoplasma hyosynoviae* in vitro

Сполука	діапазон МІК (мкг/мл)
Вальнемупіну гідрохлорид	0,0001 - 0,0005
Тіамуліну гідрофумарат	0,0025 - 0,025
Ентрофлосаксин	0,025 - 0,25

Чутливість семи польових ізолятів *Mycoplasma hyosynoviae* до вальнемупіну є значно більш високою, ніж до двох інших сполук, що свідчить про те, що дані польові ізоляти є надзвичайно чутливими до вальнемупіну.

Таким чином, сполука винаходу є корисною в терапії поліартриту у свиней, пов'язаного з інфекцією *Mycoplasma hyosynoviae*. Для цього ефективна доза, звісно, відрізняється залежно від солі, що використовується, способу введення, розміру та віку тварини та бажаного ефекту, наприклад, для профілактичних цілей можна вводити відносно низькі дози протягом довгого часу. Однак, загалом, задовільних результатів досягають, якщо препарат вводять в добовій дозі від приблизно 5мг/кг до приблизно 15мг/кг ваги тіла тварини, що зручно вводити окремими дозами від двох до чотирьох раз на день, або ad libitum з кормом та водою, або у пролонгованій формі. Для більшості тварин загальна добова доза складає від приблизно 100мг до приблизно 1000мг, переважно від приблизно 100 до приблизно 500мг, що дають раз чи двічі на день.

Його можна успішно вводити як монотерапевтичний препарат.

Переважними дозами у питній воді є від 0,01 до 0,05% ваг/об, особливо від 0,01 до 0,025%, та у кормі від 100 до 400чнм (г/метрична тона), особливо від 100 до 200чнм.

Для всіх цих цілей можна використовувати форму вільної основи або ветеринарно придатної солі, наприклад, четвертинної солі або, особливо, у формі солі, що утворилася при додаванні кислоти. Такі сольові форми демонструють такий самий порядок активності, ніж форма вільної основи. Прикладами зручних додаткових солей кислот є гідрофумарат, фумарат, нафталін-1,5-сульфонат та, особливо, гідрохлорид.

Сполуку винаходу можна вводити орально, місцево або парентерально та змішувати зі звичайними хемотерапевтично прийнятними розчинниками та носіями та, необов'язково, іншими наповнювачами, вводити в таких формах, як таблетки, капсули або препарати для ін'єкцій. Вона також утворює прекрасну добавку для харчових домішок (як премікс) або для питної води.

Кращі ветеринарно придатні носії включають,

наприклад, такі фармацевтичні складові, які широко використовуються, як цукор, кукурудзяний крохмаль, лактоза, целюлоза, а також зернові системи носіїв та зернові побічні продукти, такі як оболонка зерна рису, второсортна мука та соєва мука, більш того, такі тверді розчинники, як зерновий вапняк, сульфат натрію, карбонат кальцію та каолін, або такі рідкі субстанції, як ветеринарно прийнятна олія (рослинна або мінеральна олія), пропіленгліколь та поліетиленгліколь. Ці композиції зручно вводити тварини орально, краще як домішку до корму у формі лікувального продукту харчування або лікувальних гранул.

Для застосування у питній воді використовують розчини у воді з додаванням або без додавання таких сольовентів, як етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, затверджені рідкі сурфактанти та сорбітол.

Наприклад, для внутрішньом'язової ін'єкції композицію звичайно готують як розчин у воді, яка може містити такі сольовенти, як етанол або пропіленгліколь, або у ветеринарне прийнятній олії. Прикладами прийнятних олій є кунжутна олія, середньо ланцюгові тригліцериди (напр., Мігліол), ізопропілмірістат та етилолеат. Дана композиція може містити консерванти, буфери та інші звичайні наповнювачі.

Ветеринарні композиції для використання в данному винаході можна одержувати, змішуючи інгредієнти в потрібній пропорції. Композицію потім упаковують в придатну форму, готову для введення.

Наступний приклад ілюструє даний винахід.

Інгредієнт	Кількість (г/100мл)
гідрохлорид вальнемупіну	10,0
фенол	0,5
Мігліол 840	до 100мл

Сполука винаходу добре переноситься. Гостру токсичність сполуки формули I в формі гідрохлориду досліджували у щурів в одиничній дозі 1000мг/кг та 2000мг/кг при оральному введенні 5 самцям та 5 самицям щурів на кожну дозу. Смерть наступала на 1-8 день. Одержували величину $LD_{50} > 1000\text{мг/кг}$ перорально.