

### Изоксазолины и спиносины: перспективы их использования в медицинской дезинсекции

Еремина О. Ю., Ибрагимхалилова И. В., ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора

Проведены испытания приманок для тараканов на основе инсектицидов группы изоксазолинов (флураланер и афоксоланер) и спиносинов (спиносад). Установлено, что изоксазолины при кишечном поступлении высокотоксичны для рыжих тараканов. Эффективная доза афоксоланера составляет 0,21 и 1,20, флураланера – 1,40 и 5,90, спиносада – 26 и 180 мкг ДВ/особь для самцов и самок расы ШНИИД, соответственно. Рыжие тараканы субпопуляции RM1 реагировали на приманки на основе изоксазолинов и спиносина замедлением проявления симптомов отравления и снижением гибели в сравнении с чувствительной лабораторной расой ШНИИД. Толерантность к этим соединениям составила от 2,2× до 4,7×. Предполагается, что повышенный уровень монооксигеназ у резистентных тараканов может влиять на их толерантность к изоксазолинам и спиносинам.

#### Введение

В ветеринарии для уничтожения эктопаразитов мелких домашних животных применяют жевательные таблетки – «Capstar» (нитенпирам) [13], «Advantus» (имidakлоприд) [10], «Comfortis» (спиносад) [11; 18]. После перорального введения инсектицид всасывается в кровь животного и достигает максимальной концентрации в течение 1–3 часов. Главный недостаток неоникотиноидов состоит в быстром выведении из организма животного. Так, концентрация нитенпирама в плазме крови максимальна через 1 час после введения, а период полувыведения – 2 часа [8], концентрация имidakлоприда максимальна через 1,5 часа, период полувыведения – 4 часа, полностью он выводится из организма в течение 12 часов [10]. Спиносад применяется в ветеринарии для уничтожения блох кошек и собак (преимущественно *Ctenocephalides felis* и *C. canis*) в виде жевательных таблеток «Комфортис» с 2007 г. в США, а с 2015 г. в России. Механизм инсектицидного действия спиносада основан на активации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, вызывающих нервное перевозбуждение, развитие мышечных спазмов, тремор и паралич, что приводит к гибели насекомого. После перорального введения препарата спиносад быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте животного, проявляя инсектицидное действие уже через 30 минут. Максимальная концентрация спиносада в плазме крови достигается у собак через 2–4 часа, период полувыведения – 7–10 суток [4], инсектицидность сохраняется около месяца [14].

В последнее время появились жевательные таблетки на основе производных изоксазолина – «Бравекто» (флураланер) и «Фронтлайн Нексгард» (афоксоланер). Изоксазолины – новая группа инсектоакарицидов системного действия, появившаяся за рубежом в качестве лекарствен-

ных средств в 2013 г., а на российском рынке ветеринарных препаратов – в 2015 г. Механизм действия инсектицидов этой группы заключается в блокировании ГАМК-зависимых и глутамат-зависимых рецепторов хлорных каналов членистоногих, гипервозбуждении нейронов, нарушении передачи нервных импульсов, что приводит к параличу и гибели эктопаразитов.

Флураланер и афоксоланер имеют широкий спектр инсектицидной и акарицидной активности и эффективны против ряда эктопаразитов теплокровных животных, таких как блохи и клещи. Другие изоксазолины обладают антимикробной и противораковой активностью. Инсектоакарициды группы изоксазолина активны в отношении блох (*C. felis* и *C. canis*) [3, 14, 15], иксодовых клещей (*Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *I. scapularis*, *I. holocyclus*, *Derma-centor reticulatus*, *D. variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis longicornis*) [3, 6, 12, 16], а также аргасовых клещей *Ornithodoros moubata*, паразитирующих на собаках [17].

После перорального введения производные изоксазолина легко всасываются в желудочно-кишечном тракте теплокровного животного и достигают системного кровотока. Максимальная концентрация в плазме крови достигается в течение 2–4 часов. Они обладают кишечным действием на блох и клещей и вызывают гибель блох через 8 часов после начала кровососания, клещей – через 12 часов. Период полувыведения афоксоланера составляет около 15 суток, что обеспечивает инсектоакарицидность в течение 1 месяца [7]. Флураланер обладает высоким сродством к белкам плазмы крови теплокровных и сохраняется в крови животных в концентрации, вызывающей гибель блох и клещей, в течение 12 недель (84 суток), полностью он выводится из организма в течение 112 суток [5].

Таким образом, в ветеринарии применяются препараты группы изоксазолинов и спиносинов, однако в России в сфере медицинской дезинсекции средств на их основе пока нет. Известно, что токсичность флураланера при кишечном поступлении в организм членистоногого во много раз превышает таковую при контактном воздействии. Так, для нимф аргасового клеща *O. moubata* при контакте смертность около 80% обеспечивает концентрация флураланера 1000 мкг/мл тогда как при питании – всего 0,001 мкг/мл [17]. Цель данной работы – оценить перспективы введения изоксазолинов и спиносинов в пищевые приманки для рыжих тараканов.

### Материалы и методы

В качестве объекта исследования использован модельный объект медицинской дезинсекции рыжий таракан *Blattella germanica* L. (*Blattoptera: Blattellidae*) лабораторной чувствительной расы ШНИИД и резистентная к инсектицидам субпопуляция тараканов, собранная на объекте общественного питания в г. Москве ( $R_{M1}$ ).

Материалы исследования: производные изоксазолина флураланер – 4-[5-(3,5-дихлорфенил)-4,5-дигидро-5-(трифторметил)-3-изоксазолил]-2-метил-N-[2-оксо-2-[(2,2,2-трифторэтил)амино]этил] бензамид (CAS №864731-61-3, м.м. 556,29, брутто-формула  $C_{22}H_{17}C_{12}F_6N_3O_3$ , жевательные таблетки 13,7% ДВ «Бравекто» фирмы Merck, Германия); и афоксоланер – 4-[5-[3-хлор-5-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-5-(трифторметил)-3-изоксазолил]-N-[2-оксо-2-[(2,2,2-трифторэтил)амино]этил]-1-нафтаген карбоксимид (CAS №1093861-60-9, м.м. 625,87, брутто-формула  $C_{26}H_{17}ClF_9N_3O_3$ , жевательные таблетки 2,27% ДВ «НексГард» фирмы Merial, Франция); производное спиносинов – спиносид (CAS №168316-95-8 (131929-60-7 + 131929-63-0), брутто-формула  $C_{41}H_{65}NO_{10}$  (спиносин А) +  $C_{42}H_{67}NO_{10}$  (спиносин D), м.м. 739,0, жевательные таблетки 54% ДВ «Комфортис», фирмы Elanco Animal Health, США). Все таблетки приобретены в ветеринарной аптечной сети и использованы в экспериментах до истечения указанного срока годности.

Определение кишечного действия инсектицидов в отношении рыжих тараканов проводили в контейнерах размером 50×30×15 см. Края контейнеров смазывали вазелином для предотвращения разбегания насекомых, в их центр помещали убежище из картона и поилку с водой, выпускали 20 имаго тараканов (в соотношении самцы и самки 1:1) и выдерживали в течение 24 часов для привыкания насекомых к полигону. После этого в контейнер помещали приманку на подложке.

Пищевую основу приманок готовили из размолотого сухого корма для собак Royal Canin (1 часть) в которую добавляли растертую жевательную таблетку (1 часть) и желток куриного яйца (связующий компонент). Дальнейшего снижения концентраций действующих веществ (ДВ) в приманке достигали аналогично. Опыты вели в отсутствие альтернативной пищи, определяя показатель  $СК_{50(95)}$  (%) – концентрацию, обеспечивающую поражение 50% (95%) подопытных насекомых при учете через 4 суток. Учет пораженных и погибших насекомых проводили каждые 24 часа в течение 8 суток. Эксперименты проводили при температуре 22-25°C и относительной влажности воздуха 60-65%, повторность опытов трехкратная. Эффективную дозу инсектицидов рассчитывали путем оценки поедаемости приманок самцами и самками (мг/сутки/особь), содержания ДВ в приманке и расчета времени, необходимого для гибели всех особей в эксперименте. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью компьютерной программы SPSS Statistics и Minitab 16.

### Результаты исследований

**Афоксоланер («Нексгард»).** Приманки на основе афоксоланера и собачьего корма оказались привлекательными для рыжих тараканов, поедаемость их самцами составила 0,38 мг/особь/сутки, самками – 1,66 мг/особь/сутки.

При концентрации в приманке 0,07% ДВ гибель самцов ШНИИД происходила на вторые сутки. Следует отметить, что эта приманка обеспечивала и гибель 100% самцов субпопуляции  $R_{M1}$ , высокорезистентной к пиретроидам. Снижение содержания ДВ в 2 раза (0,035%) также приводило к гибели насекомых на вторые сутки эксперимента. Резистентные тараканы были высокочувствительны к приманке (гибель 90%), однако проявление симптомов отравления было отсрочено и гибель 50% самцов наступала на вторые сутки, а 90% – на 4-е сутки. Гибель самок  $R_{M1}$  на 4-е сутки составила 80%.

Поедание приманок с еще вдвое сниженной концентрацией афоксоланера (0,0175%) приводило к гибели 70% самцов ШНИИД только на третьи сутки, гибель чувствительных самок также была отсрочена и достигла 90% только на 4-е сутки. Резистентные тараканы  $R_{M1}$  были малочувствительны к этой приманке: только 30% самцов и 50% самок погибали на 7-е сутки эксперимента. При дальнейшем снижении концентрации афоксоланера в приманке наблюдали те же закономерности – тараканы в течение 7 суток постепенно набирали эффективную дозу и приманка, содержащая 0,0044% ДВ, приводила к гибели 90%

## СРЕДСТВА И ТЕХНОЛОГИИ

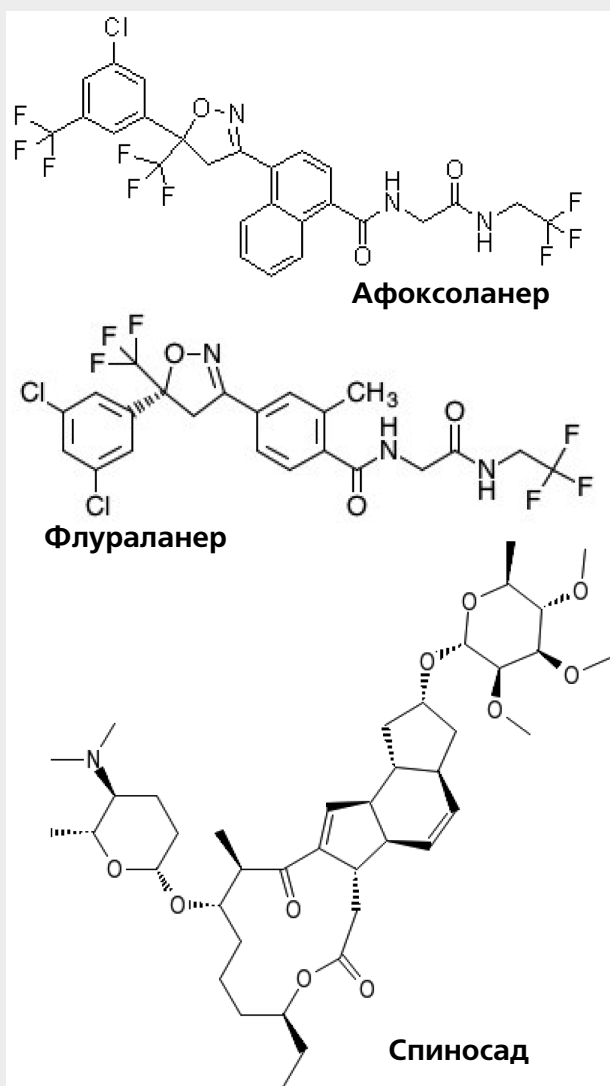


Рис. Структурные формулы изоксазолинов и спиносинов.

самцов и самок через 7 суток. Гибель резистентных тараканов  $R_{M1}$  в этом варианте опыта не наблюдали (табл.). Эффективная доза афоксоланера для тараканов ШНИИД составила 0,21 мкг ДВ / самец и 1,20 мкг ДВ / самка.

**Флураланер («Бравекто»).** Приманки на основе флураланера тараканы поедали более охотно: самцы – 1,33 мг/особь/сутки, самки – 5,67 мг/особь/сутки. Концентрации 0,10-0,20% приводили к гибели самцов и самок ШНИИД за одни сутки. Приманка обеспечивала гибель 100% самцов субпопуляции  $R_{M1}$  в течение 3 суток и гибель 90% самок в течение 4 суток. Снижение концентрации флураланера в приманке до 0,05% ДВ приводило к некоторому замедлению действия: полную гибель самцов ШНИИД наблюдали через двое суток, а самок – через 4 суток. Эффективная доза флураланера составила 1,34 мкг ДВ /особь для самцов

и 6,20 мкг ДВ/особь для самок. Следует отметить, что приманка в этой концентрации обеспечивала в течение 7 суток гибель 100% самцов и самок субпопуляции  $R_{M1}$ .

Приманка на основе флураланера оставалась эффективной для самцов ШНИИД даже при снижении концентрации ДВ до 0,002%, приводя к гибели 90-100% особей через 3-4 суток. Еще большее снижение концентрации ДВ до 0,001% привело к неэффективности приманки. Аналогичная закономерность выявлена для самок. При поедании приманок со сниженной концентрацией ДВ / (0,0075%) гибель тараканов субпопуляции  $R_{M1}$  была замедлена (гибель 50% самцов в течение 4 суток и 80% – в течение 7 суток). Следует отметить, что приманка была более токсична для самок тараканов  $R_{M1}$ , что можно связать со значимо большим поглощением пищи самками. Снижение концентрации ДВ до 0,0038% привело к неэффективности приманки в отношении и самцов и самок тараканов субпопуляции  $R_{M1}$ .

**Спиносад («Комфортикс»).** Приманки на основе средства «Комфортикс» в высоких концентрациях тараканы поедали плохо. Об этом свидетельствовало увеличение смертности насекомых при разбавлении жевательной таблетки молотым собачьим кормом и, соответственно, снижению концентрации ДВ. Поедаемость приманок при концентрации ниже 7% ДВ составляла для самцов 0,4 мг/особь/сутки, для самок – 1,5 мг/особь/сутки.

Полную гибель самцов тараканов расы ШНИИД фиксировали на 4-е сутки при поедании приманок в интервале концентраций (54,0%-0,84% ДВ), самки были более избирательными и не питались этими приманками. Полную гибель самок наблюдали только в наименьшей концентрации 0,84% ДВ. Смертность тараканов ШНИИД обоих полов была замедлена и ни в одном из опытов не наступала на первые–третьи сутки. Концентрация 0,42% ДВ обеспечивала полную гибель самцов только через 7 суток, но для самок оказалась уже малоэффективной (смертность около 20%). Эффективная доза при поедании приманки, содержащей спиносад, составила 26 мкг ДВ/особь для самцов и 180 мкг ДВ/особь для самок. Для тараканов резистентной субпопуляции  $R_{M1}$  гибели 100% самцов и самок в течение 4 суток удалось достигнуть только при концентрации 6,75% ДВ, а на 7-е сутки – для самцов при концентрации 0,84% ДВ, а для самок – более 4% ДВ.

### Заключение

Установлено, что изоксазолины при кишечном поступлении высокотоксичны для рыжих тараканов. Эффективная доза афоксоланера соста-

Таблица

## Инсектицидность приманок на основе изоксазолинов и спиносина для рыжих тараканов

Раса	N	Пол	СК50,%	СК95,%	Slope±SE	X2 (df)	ПР
<b>Афоксоланер</b>							
СНИИД	100	♂	0,0063 (0,0036-0,0102)	0,038 (0,017-0,057)	1,51±0,34	2,90 (2)	–
	100	♀	0,0060 (0,0040-0,0090)	0,026 (0,016-0,041)	2,13±0,42	4,36 (3)	–
R <sub>M1</sub>	100	♂	0,025 (0,017-0,038)	0,040 (0,021-0,061)	1,40±0,22	1,46 (2)	4,0
	100	♀	0,028 (0,018-0,047)	0,162 (0,088-0,441)	2,17±0,34	2,24 (2)	4,7
<b>Флураланер</b>							
СНИИД	100	♂	0,00170 (0,0016-0,0018)	0,00196 (0,0018-0,0021)	26,00	0,001 (1)	–
	100	♀	0,0017 (0,0016-0,0018)	0,0020 (0,0018-0,0021)	26,00	0,001 (1)	–
R <sub>M1</sub>	100	♂	0,0054 (0,0044-0,0065)	0,0118 (0,0093-0,0180)	4,85±0,84	5,64 (3)	3,2
	100	♀	0,0054 (0,0044-0,0065)	0,0120 (0,0093-0,0180)	4,85±0,84	5,64 (3)	2,2
<b>Спиносад</b>							
СНИИД	100	♂	0,69 (0,54-1,15)	2,36 (1,57-3,54)	5,92±1,26	0,61 (1)	–
	100	♀	0,74 (1,19-2,67)	2,09 (1,39-3,43)	2,29±0,41	0,54 (2)	–
R <sub>M1</sub>	100	♂	1,30 (0,87-1,95)	2,50 (1,67-3,75)	2,51±0,43	0,54 (2)	3,0
	100	♀	2,09 (1,38-3,57)	4,54 (3,00-6,75)	2,33±0,44	1,82 (1)	2,8

Примечание: учет на 4-е сутки после подсадки и начала питания отравленными приманками; доверительные пределы при 95%-м уровне вероятности.

вила 0,21 и 1,20 мг/особь для самцов и самок расы СНИИД, соответственно, тогда как токсичность флураланера оказалась ниже – 1,40 мг/самец и 5,90 мг/самка. Полученные значения сравнительной эффективности двух изоксазолинов не противоречат данным литературы об их инсектицидном действии – для уничтожения эктопаразитов мелких домашних животных минимальная рекомендованная доза афоксоланера составляет 2,5 мг/кг и флураланера – 25 мг/кг животного [3]. Эффективная доза при поедании приманки, содержащей спиносад, была значительно выше и составила 26 мг/особь для самцов и 180 мг/особь для самок. Следует отметить, что самки, питавшиеся приманками на основе изоксазолинов и спиносина, под влиянием химического стресса досрочно сбрасывали оотеки, из которых в дальнейшем выплывали личинок не наблюдали.

Рыжие тараканы субпопуляции R<sub>M1</sub> реагировали на приманки на основе изоксазолинов и спиносина замедлением проявления симптомов отравления и снижением гибели в сравнении с чувствительной лабораторной расой СНИИД. Показатель резистентности составил от 2,2× до 4,7×.

Поскольку препараты этих химических групп никогда не применялись в России, можно говорить о неспецифической толерантности изучаемых субпопуляций тараканов. Тараканы R<sub>M1</sub> высокорезистентны к пиретроидам, толерантны к фосфорорганическим соединениям и карбаматам, что может быть следствием повышения активности метаболических ферментов – монооксигеназ, неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз [1]. Поскольку известно, что основной метаболит, например, афоксоланера является продуктом окисления в плазме крови с помощью цитохром-P450-зависимых монооксигеназ [7], можно предположить, что повышенный уровень монооксигеназ у резистентных тараканов влияет на их толерантность к изоксазолинам. Показана невысокая токсичность изоксазолинов для теплокровных (крыса) при пероральном введении ЛД<sub>50</sub> >1000 мг/кг для афоксоланера и >2000 мг/кг для флураланера, при накожном нанесении >2000 мг/кг для обоих соединений. Токсичность спиносада также невелика – при пероральном введении ЛД<sub>50</sub> >2000 мг/кг (крыса), при накожном нанесении >5000 мг/кг (кролик), при ингаляции ЛК<sub>50</sub> >5,18 мг/л (крыса). [9, 12].

Таким образом, изоксазолины и спиносина об- ладают высоким коэффициентом избирательной токсичности и их применение в медицинской де- зинсекции перспективно в виде пищевых приманок для тараканов, в том числе и резистентных к основ- ным группам инсектицидов (пиретроиды, фосфо- рорганические соединения, карбаматы и др.).

### Список использованной литературы References

1. **Еремина О. Ю., Олифер В. В., Рославце- ва С. А., Бендрышева С. Н.** Исследование топи- кальным методом резистентности рыжих таракан- нов к инсектицидам из различных классов // Де- здело. 2015. №3. С. 40–45. / Yeremina O. YU., Oliner V. V., Roslavtseva S. A., Bendrysheva S. N. Research by topically cockroaches resistance to insecticides from different classes // Dez.delo. 2015. №3. S. 40–45 (in Russian).
2. **Beugnet F., Liebenberg J., Halos L.** Comparative efficacy of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner against *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *Dermacentor reticulatus* // *Vet. Parasitol.* 2015a. V. 209, №1,2. P. 142–145.
3. **Beugnet F., Liebenberg J., Halos L.** Comparative speed of efficacy against *Ctenocephalides felis* of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner // *Veterinary Parasitology.* 2015. V. 207, №3,4. P. 297–301.
4. **Holmstrom S. D., Totten M. L., Newhall K. B., Qiao M., Riggs K. L.** Pharmacokinetics of spinosad and milbemycin oxime administered in combination and separately per os to dogs // *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2012. V. 35. P. 351–364.
5. **Kilp S., Ramirez D., Allan M. J., Roepke R. KA, Nuernberger M. C.** Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration // *Parasites&Vectors.* 2014. V.7. №85. DOI: 10.1186/1756-3305-7-8.
6. **Kondo Y., Kinoshita G., Drag M., Chester T. S., Larsen D.** Evaluation of the efficacy of afoxolaner against *Haemaphysalis longicornis* on dogs // *Vet. Parasitol.* 2014. V 201, №3,4. P. 229–231.
7. **Letendre L., Huang R., Kvaternick V., Harriman J., Drag M., Soll M.** The intravenous and oral pharmacokinetics of afoxolaner used as a monthly chewable antiparasitic for dogs // *Vet. Parasitol.* 2014. V. 201, №3,4. P. 190–197.
8. **Maddison J. E., Page S. W., Church D. B.** *Small animal clinical pharmacology*, ed. Philadelphia Sanders 2 nd. 2008. 228 pp.
9. **Ozoe Y., Asahi M., Ozoe F., Nakahira K., Mita T.** The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 391, №1. P. 744–749.
10. **Qureshi T., Everett W. R., Palma K. G.** Development of advantus™ (imidacloprid) soft chewable tablets for the treatment of *Ctenocephalides felis* infestation on dogs // *Parasites&Vectors* 2015. V. 8. № 407. DOI 10.1186/s13071-015-1020-1
11. **Robertson-Plouch C., Baker K. A., Hozak R. R., Zimmermann A. G., Parks S. C., Herr C., Hart L. M., Jay J., Hutchens D. E., Snyder D. E.** Clinical field study of the safety and efficacy of spinosad chewable tablets for controlling fleas on dogs // *Vet. Ther.* 2008. V9, №1. P. 26-36.
12. **Rohdich N., Roepke R. KA, Zschiesche E. A.** Randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline™ (fipronil) in flea- and tick-infested dogs // *Parasites&Vectors.* 2014. V. 7, № 83. DOI: 10. 11. 1756-3305-7-8.
13. **Rust M. K., Waggoner M. M., Hinkle N. C., Stansfield D., Barnett S.** Efficacy and longevity of nitenpyram against adult cat fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*) // *J. Med. Entomol.* 2003. V. 40, №5. P. 678–681.
14. **Snyder D. E., Rumschlag A. J., Young L. M., Ryan W. G.** Speed of flea knockdown of spinosad compared to afoxolaner, and of spinosad through 28 days post-treatment in controlled laboratory studies // *Parasites&Vectors.* 2015. V.8. №578. DOI: 10.1186/s13071-015-1195-5.
15. **Taenzler J., Wengenmayer C., Williams H., Fourie J., Zschiesche E., Roepke R. KA, Heckerroth A. R.** Onset of activity of fluralaner (Bravecto™) against *Ctenocephalides felis* on dogs// *Parasites Vectors* 2014, V. 7, №567 DOI: 10.1186/s 13071-014-0567-6.
16. **Wengenmayer C., Williams H., Zschiesche E., Moritz A., Langenstein J., Roepke R. K. A., Heckerroth A. R.** The speed of kill of fluralaner (Bravecto™) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs//*Parasites&Vectors* 2014, V.7, №525 DOI: 10.1186/5 13071-014-0525-3.
17. **Williams H., Zoller H., Roepke R. K.A., Zschiesche E., Heckerroth A.R.** Fluralaner activity against life stages of ticks using *Rhipicephalus sanguineus* and *Ornithodoros moubata* in vitro contact and feeding assays // *Parasites Vectors* 2015, V. 8. №275. DOI: 10.1186/s13071-015-0704-x.
18. **Wolken S., Franc M., Bouhsira E., Wiseman S., Hayes B., Schnitzler B., Jacobs D. E.** <http://veterinaryrecord.bmj.com/site/about/unlocked.xhtml> Evaluation of spinosad for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe // *Vet. Record.* 2012. V.170, №4. P. 99. DOI: 10.1136/vr 100211.