

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 $C_{22}H_{17}Cl_2F_6N_3O_3$, 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

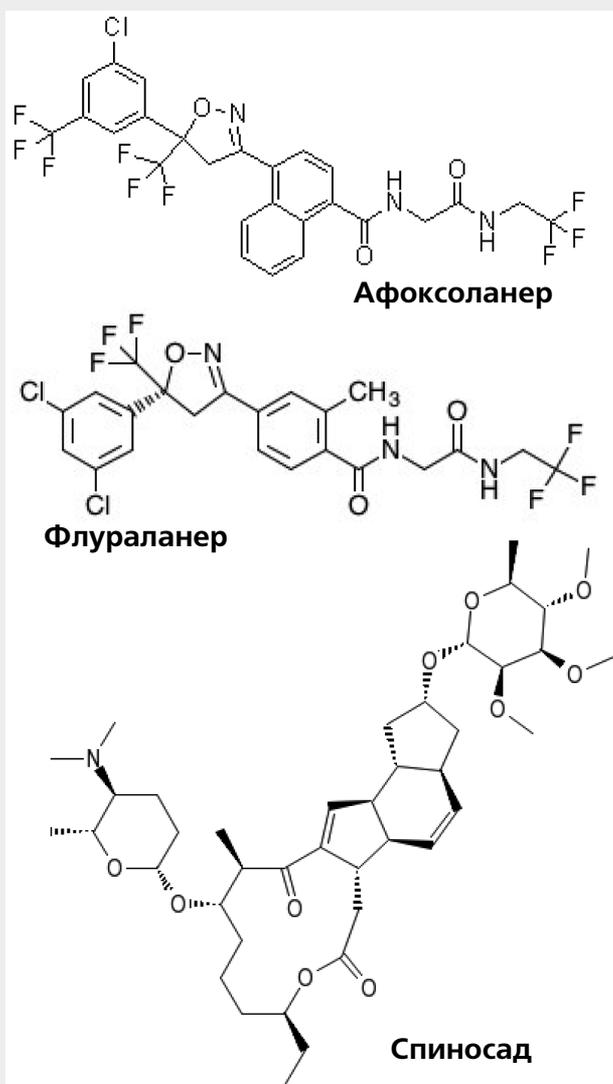


Рис. Структурные формулы изоксазолинов и спиносинов.

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.

Флулаланер («Бравекто»). Приманки на основе флулаланера 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 флулаланера 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 флулаланера 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 флулаланера 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
Афоксоланер							
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 _{M1}	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
Флураланер							
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 _{M1}	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
Спиносад							
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 _{M1}	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 выклада личинок не наблюдали.

Рыжие тараканы субпопуляции R_{M1} 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_{M1} 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 ЛД₅₀ >1000 мг/кг для афоксоланера и >2000 мг/кг для флураланера, при накожном нанесении >2000 мг/кг для обоих соединений. Токсичность спиносита также невелика – при пероральном введении ЛД₅₀ >2000 мг/кг (крыса), при накожном нанесении >5000 мг/кг (кролик), при ингаляции ЛК₅₀ >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. V.9, №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: 10.1186/s13071-014-0567-6.

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/s13071-014-0567-6.

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/s13071-014-0525-3.

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.