



Окончание. Начало в № 6 «Ветеринарный Доктор», июнь 2007 г.

Способность фипронила предотвращать заражение собак боррелиозом

Richard JACOBSON, John MCCALL, James HUNTER, Roberto ALVA, Jennifer IRWIN, Andrew ESCHNER, Philippe JEANNIN, Albert BOECKH,

Колледж ветеринарной медицины Университета Джорджии, Колледж ветеринарной медицины Университет Корнелла, США, подразделения компании «MERIAL» в США и Франции

Если на пятый день у собаки было недостаточно мест скопления прикрепленных клещей или их не было вообще, биопсию брали с места, аналогичного у контрольных животных. Один из взятых при биопсии участков кожи помещали в культуру, еще один участок исследовали с помощью ПЦР.

Участки кожи перед **пункционной биопсией** выщипывали, тщательно дезинфицировали хирургическим скрабом Betadine®, обрабатывали солевым раствором, 70° спиртом и высушивали с помощью стерильного хирургического газа. Образцы отбирали одноразовыми биопсийными иглами и щипцами и сразу помещали в стерильные криофлаконы по 2-4 мл. Последние хранили в холодильнике с пакетами льда до момента отправки в диагностическую лабораторию колледжа ветеринарной медицины Университета Корнелла (в те же сутки), где их немедленно обрабатывали и помещали в культуру или хранили при -70°С до проведения ПЦР.

Для выделения *V. burgdorferi* в культуре участки кожи, взятые при биопсии, гомогенизировали и помещали в разогретую среду, где выдерживали при 34°С, и еженедельно исследовали признаки роста *V. burgdorferi* с помощью темного поля и непрямой флуоресценции.

Для проведения ПЦР ДНК из образцов биопсии выделяли по стандартной методике с использованием

SL-праймера, созданного ДНК-синтезатором. Для предотвращения контаминации приготовление реактивов, выделение ДНК, амплификацию и определение ПЦР-продуктов проводили в разных комнатах. В ходе экспериментов использовали аэрозоль-устойчивые пипетки с фильтром. Геномную ДНК (1 нг) *V. burgdorferi* использовали в качестве положительного контроля, а образцы ДНК кожи от незараженных *V. burgdorferi* собак — отрицательного. Каждый из 40 циклов амплификации включал разогрев до 94°С в течение 1 мин. (денатурация ДНК), охлаждение до 69°С в течение 1 мин. (гибридизация праймера) и повторный разогрев до 72°С в течение 2 мин. (выделение праймера). Отрицательный контроль включали в каждый цикл ПЦР (образец ДНК от негативной собаки в смеси реактивов). Визуализация продуктов амплификации ПЦР проводилась с использованием электрофореза в 1,5% агар-геле.

Статистические методы

Количество клещей оценивали с помощью теста Фридмана. Число преобразовали в натуральный логарифм (число + 1) для расчета среднего геометрического в группе, где проводили обработку препаратом. Эффективность рассчитывали по модифицированной формуле Эббота (%):

$$\text{эффективность} = (m_c - m_t) \times 100 / m_c,$$

m_c — среднее количество клещей в контрольной группе;
 m_t — среднее количество клещей в группе обработки.

Точный критерий Фишера использовали для определения частоты позитивных серологических тестов при блоттинге KELA и по Вестерну, а также наличия в культуре *V. burgdorferi*.

При проведении любого вида анализа каждая группа собак, получавших обработку, сравнивалась с соответствующей группой контроля.

Эффективность фипронила против *I. scapularis*

Как показано в таблице 2, все контрольные собаки в обоих исследованиях были успешно подвергнуты клещевой инвазии (среднее геометрическое — 22,4 и 24,5 клещей на 1 собаке в исследованиях спреем и спот-он соответственно). У собак, обработанных за 7 дней до инвазии, обе исследуемые формы выпуска Фронтлайна® обладали

Таблица 2. Данные по эффективности Фронтлайна® против *I. scapularis* после обработки спреем (фипронил) и спот-он (фипронил + (S)-метопрен)

компоненты	день 7	день 28
фипронил	100%	99,6%
фипронил + (S)-метопрен	100%	97,6%



эффективностью 100%. У собак, инвазированных через 28 дней после обработки, эффективность составила 97,6% и 99,6% соответственно ($P < 0,005$).

На 28 день исследования у 7 собак, обработанных спреем фипронила, паразитов обнаружено не было, у одного животного обнаружен 1 клещ. После применения препарата спот-он клещи отсутствовали у 6 собак из 8, у двух животных было 3 и 8 клещей соответственно.

Профилактика инфекции *B. burgdorferi*

Все контрольные собаки (16 голов) в обоих исследованиях заразились *B. burgdorferi*. Это подтверждено результатами:

- сероконверсии у всех собак;
- роста в культурах при анализе биопсии (у всех, кроме 1 контрольной собаки, получившей фипронил и (S)-метопрен в форме спот-он);
- ПЦР при биопсии кожи (у всех, кроме 1 контрольной собаки, получившей фипронил и (S)-метопрен в форме спот-он).

Ни у одной из собак, обработанных спот-он и спреем и зараженных на 7 или 28 день после лечения, не было выявлено сероконверсии. Все серологические значения KEA во всех образцах были ниже в 100 раз, следовательно, эффективной передачи микроорганизма от зараженного клеща не произошло. На 77 день исследования все результаты анализа культуры образцов от этих собак были отрицательными (кроме 1 случая), что подтвердило важность проведения обработки для защиты от *I. scapularis* и *B. burgdorferi*. Также при ПЦР только один образец биопсии, взятый у собаки, зараженной на 7 день после обработки спот-он, оказался положительным при отрицательных результатах культурального и серологического исследований. Шесть из восьми собак, получавших спот-он за 28 дней до заражения, оставались серологически негативными на

протяжении всего исследования. В этой группе у двух собак, у которых клещи оставались прикрепленными через 48 часов после заражения, результаты анализа биопсии кожи были положительными и серологически обладали антителами к *B. burgdorferi*. ПЦР у двух данных животных выявил боррелии в 1 и 2 образцах соответственно.


Обсуждение

В обоих исследованиях проявление акарицидной эффективности фипронила было обусловлено предотвращением передачи собакам возбудителя *B. burgdorferi*, что демонстрировало развитие болезни Лайма у необработанных животных, зараженных клещами. Из-за возможности появления ложно-отрицательных результатов при анализе в культуре или ПЦР проводилось серологическое исследование. У всех 16 контрольных собак (по 8 в каждом исследовании) была выявлена сероконверсия, и у 15 животных результаты анализа в культуре и ПЦР оказались положительными. У одной собаки с отрицательными результатами ПЦР и культурального исследования была обнаружена сероконверсия с наличием высокого титра антител при анализе с ферментсвязывающим иммуносорбентом (ELISA), что подтвердил положительный результат блоттинга по Вестерну. Отрицательные результаты анализов в культуре и при проведении ПЦР можно объяснить неравномерным распространением микроорганизмов по организму собаки. Использование трех методов оценки для подтверждения инфекции увеличивает достоверность утверждения, что все собаки в исследовании были заражены *B. burgdorferi* при инвазии 75 клещами на каждое животное.

Период, в течение которого клещи погибают, является важным фактором при лечении животных акарицидными соединениями. В исследовании спрея фипронила один клещ был обнаружен через 48 часов после инвазии клещей на

одной собаке, обработанной за 28 дней. У этой собаки не развилась инфекция *B. burgdorferi*. В исследовании формы спот-он, содержащим комбинацию фипронила и (S)-метопрена, у двух собак, обработанных препаратом за 28 дней до инвазии, были обнаружены 3 и 8 клещей соответственно; паразиты остались прикрепленными через 48 часов после инвазии. Еще через 2 дня, т.е. почти через 96 часов после заражения, 3 клеща оставались прикрепленными у одной собаки. У этих животных не было сероконверсии, следовательно, успешная передача исследуемого инфекционного агента от прикрепившегося клеща происходит в 48-96 часов.

Степень инфицированности *B. burgdorferi* клещей в эндемичных районах составляет 30-70%. После применения фипронила риск заражения *B. burgdorferi* при укусе клеща снижается на 97,6-100% за счет сокращения количества прикрепляющихся клещей. Тем не менее даже если один постоянно прикрепленный клещ может передать инфекцию, профилактические мероприятия в отношении инвазии должны повторяться в течение всего сезона активности клещей.

Таким образом, фипронил как в виде спрея, так и в форме спот-он является высокоэффективным препаратом, предотвращающим передачу инфекции *B. burgdorferi* собакам от зараженных клещей в течение 30 дней. Выбор формы препарата, надлежащее применение и поддержание уровня защиты в течение 1 месяца в значительной степени зависит от осведомленности владельца животного, посещающего ветеринарную клинику. Если фипронил, применяющийся ежемесячно, использовать в сочетании с другими мерами профилактики (образовательными программами, уничтожением клещей), то риск заражения собак возбудителем болезни Лайма значительно снизится. 

*Материал предоставлен
компанией «MERIAL»*