

УДК 632.951

DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-1-81-97

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНСЕКТИЦИДОВ, АКАРИЦИДОВ, РЕГУЛЯТОРОВ РАЗВИТИЯ И РЕПЕЛЛЕНТОВ ПРИ ЭКТОПАРАЗИТОЗАХ ПЛОТЯЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ АРИСОВ, ИВАН АЛЕКСЕЕВИЧ АРХИПОВ

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К. И. Скрыбина, 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28; e-mail: arisov@vniigis.ru

Поступила в редакцию: 07.02.2018; принята в печать 15.02.2018

(Рассмотрены и одобрены на секции Методической комиссии
«Инвазионные болезни животных» 21 сентября 2017 г., протокол № 2)

Аннотация

Цель исследований: дать характеристику современным методам определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов при эктопаразитозах плотоядных животных.

Материалы и методы. Проведен анализ литературы и результатов собственных исследований по оценке эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов при эктопаразитозах плотоядных животных.

Результаты и обсуждение. Подробно описаны новые методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов при эктопаразитозах плотоядных животных, а также в условиях *in vitro*. Представлены методы определения инсектицидных и акарицидных свойств действующих веществ (субстанций) путем принудительного контакта насекомых и клещей с обработанными поверхностями, топикального нанесения акарицидов на клещей, определения скорости наступления состояния нокдауна и высоты подъема клещей по обработанной ткани, учета скорости присасывания клещей, контактировавших с исследуемыми веществами. Репеллентную активность веществ по отношению к иксодовым клещам изучают методом отсекающей концентрации, методом градиента концентраций и т. д.

Ключевые слова: эктопаразиты, оценка эффективности, инсектицидные свойства, акарицидные свойства, репеллентная активность, плотоядные животные.

Для цитирования: Арисов М. В., Архипов И. А. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов при эктопаразитозах плотоядных животных // Российский паразитологический журнал. 2018. Т. 12. № 1. С. 81–97. DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-1-81-97

© Арисов М. В., Архипов И. А.

METHODS OF EVALUATION OF EFFICACY OF INSECTICIDES, ACARICIDES, REGULATORS OF DEVELOPMENT AND REPELLENTS AGAINST ECTOPARASITES OF CARNIVORES

MIKHAIL V. ARISOV, IVAN A. ARKHIPOV

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K. I. Skryabin, 117218, Russia, 28 B. Cheremushkinskaya Str.; e-mail: arisov@vniigis.ru

Submitted 29.01.2018; accepted for printing 15.02.2018

(Considered and approved at the section of the Methodological Commission «Infective Animal Diseases» on September 21, 2017, Protocol No 2)

Abstract

The purpose of the research: to characterize the modern methods of determining the effectiveness of insecticides, acaricides, regulators of development and repellents against ectoparasites of carnivores.

Materials and methods. The analysis of the literature data and the results of our research to evaluate the effectiveness of insecticides, acaricides, regulators of development and repellents against ectoparasites of carnivores.

Results and discussion. Details describes modern methods for determining the effectiveness of insecticides, acaricides, repellents and regulators of development against ectoparasites of carnivores as well as in conditions *in vitro*. The methods of determining the insecticidal and acaricidal properties of the active compounds (substances) by forced contact of insects and mites with surface treated topically applying acaricides, rate determination occurrence state knockdown and lift height of mites on treated material, accounting sucking ticks velocity contacted with test substances. The repellent activity of substances with respect to ixodid mites is studied by the method of cut off concentration, the concentration gradient method, etc.

Keywords: ectoparasites, efficacy assessment, insecticidal properties, acaricidal properties, repellent activity, carnivores.

For citation: Arisov M. V., Arkhipov I. A. Methods of evaluation of efficacy of insecticides, acaricides, regulators of development and repellents against ectoparasites of carnivores. *Russian Journal of Parasitology*. 2018; 12(1):81–97. DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-1-81-97

1. Область применения

Методические указания предназначены для специалистов организаций, занимающихся тестированием и исследованием инсектоакарицидной, рострегулирующей и репеллентной активности различных веществ и эффективности препаративных форм на их основе, рекомендуемых для лечения эктопаразитозов плотоядных животных.

2. Общие положения

Вновь синтезированные вещества проходят скрининг (отбор). Вещества, поступающие на скрининг, должны быть снабжены паспортом, в котором указаны химическая формула, молекулярная масса (для жидкостей плотность), степень чистоты соедине-

ния, основные физико-химические параметры, организация, в которой синтезировано соединение.

При изучении препаративных форм новых инсектоакарицидных средств должна быть представлена рецептура, в которой указаны все компоненты и их процентное содержание.

Новые синтезированные вещества и лекарственные препараты для ветеринарного применения с новыми ДВ или комбинациями, которые ранее не были изучены, проходят оценку инсектоакарицидных свойств *in vitro*. Исследования *in vitro* носят ориентировочный характер и не дают точной, полной оценки эффективности вещества (или препарата), т. к. тест-членистоногие, используемые в опытах, находятся не в естественных условиях.

2.1. Оценка эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов *in vitro*

Оценка инсектоакарицидности вещества (или препарата) для членистоногих и определение летальной концентрации или дозы $СД_{50}$ (или $СД_{95}$, $СД_{99}$), $СК_{50}$ (или $СД_{95}$, $СД_{99}$).

Если инсектоакарицидность веществ для членистоногих неизвестна, исследования проводят в два этапа, если же имеются ориентировочные сведения об уровне инсектоакарицидности, исследования начинают сразу со второго этапа [1, 3, 4].

На первом этапе для испытания готовят серию из 4–5 последовательных 10-кратных разведений испытуемого вещества.

Вначале готовят исходный раствор с концентрацией вещества, необходимой для получения исследуемых концентраций ДВ.

Концентрацию ДВ исходного раствора ($C_{исх}$) (эмульсии, суспензии) рассчитывают по формуле (1):

$$C_{исх} = \frac{A \times B}{C}, \quad (1)$$

где A – необходимая концентрация ДВ; B – необходимый объем раствора; C – концентрация ДВ в веществе.

Пример 1. Из вещества, содержащего 99% ДВ, необходимо приготовить 100 мл раствора с концентрацией ДВ 1,5%.

$C_{исх} = 1,5 \times 100 : 99 = 1,515$, т.е. к 1,515 мг или мл испытуемого вещества необходимо добавить до 100 мл растворителя.

Концентрацию ДВ заданного объема исходного раствора ($C_{исх}$) и заданной дозировки испытуемого вещества (или препарата) для обработки определенной площади рассчитывают по формуле (2):

$$C_{исх} = \frac{D \times S}{C \times V} \times 100\%, \quad (2)$$

где C – концентрация ДВ в препарате; D – заданная дозировка; S – площадь обрабатываемой поверхности; V – необходимый объем раствора для обработки этой поверхности.

Пример 2. Нужно получить дозировку (D) величиной 1,5 г/м² при обработке диска из фильтровальной бумаги площадью (S) 10 см² (0,001 м²) раствором объемом (V) 1 мл. Концентрация ДВ в препарате (C) – 10% (0,1). Все

показатели используют в одной размерности: граммы и квадратные метры или килограммы и гектары. Проценты обозначают десятичной дробью (10% = 0,1).

Расчет: $C_{исх} = (1,5 \times 0,001) : (0,1 \times 1) \times 100\% = 1,5\%$, т.е. для получения заданной дозировки (1,5 г/м²) нужно приготовить 1 мл 1,5%-ного раствора из испытуемого вещества (или препарата), используя формулу (1).

Из исходного раствора готовят серию 10-кратных разведений. Для этого к 1 мл исходного раствора добавляют 9 мл растворителя и в результате получают второе разведение; к 1 мл второго разведения добавляют 9 мл растворителя и получают третье разведение и т. д. В нашем примере получаем серию растворов, 1 мл которых на фильтрах стандартного размера обеспечивает дозировки 1,5; 0,15; 0,015 г/м² и т. д.

На втором этапе для исследования препаратов за исходный берут раствор с максимальным разведением, вызвавшим 100%-ную гибель особей в опытах первого этапа, и исследуют серию растворов с нисходящими 2-кратными разведениями.

Среднюю величину гибели насекомых вычисляют по формуле (3):

$$M = \frac{\sum V}{n}, \quad (3)$$

где V – процент гибели в каждом опыте; n – число повторностей; Σ – знак суммы.

Для определения $СД_{50}$ (или $СД_{95}$, $СД_{99}$), $СК_{50}$ (или $СД_{95}$, $СД_{99}$) используют графический способ вычисления этих показателей на пробит-логарифмической бумаге. На оси абсцисс откладывают дозы ДВ (г/м²) или концентрации (%) в последовательных разведениях, на оси ординат – процент гибели насекомых при этих дозах (концентрациях). Между полученными точками проводят линию регрессии. Для определения $СД_{50}$ ($СК_{50}$) проводят горизонтальную линию на уровне 50% до пересечения с линией графика. Опущенный из точки пересечения перпендикуляр на ось абсцисс покажет по шкале на этой оси искомое значение. Проводя горизонтальную прямую на других уровнях и опуская перпендикуляр, можно определить соответствующие другие значения $СД$ ($СК$), например, для определения $СД_{99}$ горизонтальную прямую до пересечения с линией графика проводят на уровне 99% и т. д.

2.2. Расчет активности веществ и препаративных форм

В зависимости от организации эксперимента возможны 3 варианта оценки активности веществ и препаративных форм (формулы 4–7).

В опыте, при котором членистоногое контактирует с испытуемым веществом, нанесенным на поверхность (или при топикальном нанесении вещества на тело), и в контроле – с растворителем или необработанной поверхностью инсектицидную активность вещества (Y) в каждой повторности оценивают по формуле:

$$Y = \frac{BO}{AO} \times \left(1 - \frac{BK}{AK}\right) \times 100\%, \quad (4)$$

где AO и AK – исходное число особей в опыте и в контроле; BO и BK – число погибших в опыте и в контроле.

Итоговая оценка представляет собой среднюю величину из всех повторностей (не менее трех) опыта. В случае гибели в контроле 5–20% особей к данным опытов вводят поправку по формуле Аббота:

$$C = \frac{A - B}{100 - B} \times 100\%, \quad (5)$$

где A – гибель насекомых в опыте, %; B – гибель насекомых в контроле, %.

Если гибель особей в контроле превышает 20%, то опыт бракуют. Для получения более надежных оценок препарата исследование следует повторить с более жизнеспособной культурой членистоногих или изменить условия опыта в сторону большей их комфортности для объекта как в контроле, так и в опыте.

Если по каким-то причинам постановка контроля невозможна и об инсектицидной активности приходится судить только по числу (численности) особей до и после применения вещества, формулу (5) упрощают (обозначения те же, что и в формуле 4):

$$Y = \frac{1 - BO}{AO} \times 100\%. \quad (6)$$

Коэффициент отпугивающего действия (КОД) для насекомых рассчитывают по формуле:

$$\text{КОД} = \frac{A - B}{A} \times 100\%, \quad (7)$$

где A – число насекомых на необработанной поверхности за определенный промежуток времени; B – число насекомых на обработанной репеллентом поверхности за такой же промежуток времени.

Коэффициент отпугивающего действия для клещей рассчитывают по формуле (7), где A – число клещей, взятых в опыт; B – число клещей, прошедших обработанную репеллентом зону.

Ошибку среднего значения инсектицидной активности препарата (и других средних величин) рассчитывают по критерию Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel. Из-за малого числа повторностей ошибка средней величины в энтомотоксикологических исследованиях может быть очень велика, особенно в диапазоне около 50%, но при приближении средней эффективности к 100% она снижается. Так, при эффективности препарата в трех повторностях 70, 80 и 90% ошибка составит 7,1%, а при значениях эффективности 85, 90 и 95% – 3,5%.

2.3. Организация экспериментов

На первом этапе на ограниченном числе видов насекомых устанавливают наличие (или отсутствие) у испытуемых веществ инсектоакарицидных, репеллентных или других свойств. Вещества, у которых такие свойства обнаружены, исследуют по полной схеме второго этапа, которая включает дополнительные методы и расширенный перечень видов членистоногих в зависимости от поставленных задач исследований. На втором этапе проводят более точное определение инсектоакарицидной (или другой) активности веществ. В обоих случаях используют одни и те же методы, описание которых приведено в соответствующих разделах.

Методы определения активности и эффективности средств при проведении исследований действующих веществ этих средств и препаративных форм при их разработке, изучении и регистрации включают в себя:

- определение специфической инсектоакарицидной, рострегулирующей, репеллентной и иных видов активности;
- оценку эффективности средств в различных препаративных формах.

2.4. Характеристика тест-членистоногих, используемых в опытах

В целях получения сравнимых данных при проведении экспериментов используют стандартные, чувствительные к инсектоакарицидам культуры членистоногих, выращенные в инсектарии или природные популяции членистоногих. Для опытов отбирают однородные партии членистоногих определенного возраста, пола.

При изучении активности используют, как правило, следующих членистоногих:

Крысиные блохи *Xenopsylla cheopis* Roth. Имаго – самки, самцы 5-дневного возраста, накормленные на белых мышах за 3 ч до опыта; личинки II и последнего возрастов.

Клещи:

- Иксодовые – таежный *Ixodes persulcatus* P. Sch, и лесной *I. ricinus* L. – активные голодные имаго и нимфы.
- Аргасовые – *Ornithodoros papillipes* (Bir.) – нимфы III и IV возрастов, голодавшие не более 5–7 мес. при комнатной температуре и влажности воздуха 90–100%; самки, самцы, голодавшие не более 1 года в тех же условиях (наиболее подходящими в качестве тест-объектов являются нимфы IV возраста).
- Гамазовые – крысиный клещ, имаго *Ornithonissus bacoti* (Hirst).
- Чесоточные – самки ушного кроличьего клеща *Psoroptes cuniculi* (Hering).

При проведении всех экспериментов ставят контрольный вариант (необработанные членистоногие) для оценки состояния биоматериала.

3. Методы оценки активности действующих веществ и препаратов форм

3.1. Методы определения инсектицидных свойств действующих веществ (субстанций)

3.1.1. Методы принудительного контакта насекомых с обработанными поверхностями

Поверхности разных типов – пластины размером 10×10 см из стекла, фанеры, неокрашенной или окрашенной масляной краской, линолеума и других материалов, обрабатывают раствором вещества или рабочими жид-

костями, изготовленными из препаративных форм (концентраты эмульсий, суспензий, смачивающиеся порошки, флоу, гели и др.). При этом используют градиент концентраций. Одновременно одной концентрацией вещества обрабатывают не менее трех пластин.

Для обработки поверхностей пластин, не впитывающих жидкость (стекло), используют 50 мл/м² рабочей жидкости, для обработки поверхностей, впитывающих жидкость (фанера), – 100 мл/м². Растворы наносят на поверхность путем распыления из распылителя. Контакт насекомых с обработанными пластинами проводят только после полного испарения растворителя с пластин – не ранее чем через 3 ч. При обработке порошками их равномерно распределяют по поверхности кисточкой при норме расхода 3–10 г/м². Количество ДВ, находящееся на пластинке, вычисляют путем взвешивания поверхности до обработки и после нее или методом расчета от наносимой дозы. Расчет ДВ проводят на 1 м².

Для контакта насекомых (блох) с обработанными пластинами используют стеклянные цилиндры (экспозиметры) высотой 8–15 см, диаметром 3–10 см. Время контакта в экспозиметрах от 5–60 мин. (крысиных блох – 5 мин.), в зависимости от размера цилиндра (экспозиметра). В процессе эксперимента экспозиметры накрывают влажной многослойной марлевой салфеткой.

Одновременно ставят контроль к биоматериалу. По результатам опытов высчитывают показатели CK_{50} (CD_{50}), CK_{95} (CD_{95}), CK_{99} (CD_{99}).

Блох после контакта с обработанными пластинами переносят в чистые пластиковые стаканы и регистрируют состояние (без внешних признаков паралича, парализованные, мертвые) в течение 24–48 ч.

Контакт насекомых с обработанной поверхностью проводят раз в 5–10 сут до тех пор, пока гибель насекомых составит менее 70%. Тогда поверхность считают утратившей инсектицидные свойства. Длительность остаточного действия выражают в сутках от даты обработки тест-поверхности.

3.1.2. Изучение овоцидного действия инсектицидов

На дно трехлитрового сосуда кладут листы черной бумаги так, чтобы она полностью покрывала дно сосуда, и помещают туда белую

мышь в сетчатой клетке. На зверька выпускают до 100 самок и до 25 самцов блох. Листы бумаги меняют ежедневно и подсчитывают число отложенных на них яиц. Из листа, на котором отложены яйца блох, вырезают листки размером 4×5 см и обрабатывают каждый 0,2 мл раствора (эмульсии) инсектицида. Опыты ставят в 5 концентрациях, в 3 повторностях каждая. В контрольном варианте лист бумаги обрабатывают растворителем.

Опыты с яйцекладками насекомых проводят при температуре воздуха в помещении 23–27 °С. Учет результатов проводят через 4–6 сут. Эффективность обработки определяют по соотношению числа вышедших личинок на обработанном и контрольном листах. Определяют дозу (концентрацию), обеспечивающую 50, 95 и 99% гибели яиц.

3.2. Методы изучения активности веществ по отношению к иксодовым и аргасовым клещам

Испытания на иксодовых клещах предпочтительно проводить в весенне-летний период и использовать самок природной популяции, собранных с растительности не более чем за сутки до проведения опытов и хранившихся в пробирках дифференцированной влажности или во влажных бинтах при температуре 12±2 °С. Возможно использование самок лабораторного разведения после проверки их двигательной активности и агрессивности. Самки таежного клеща при температуре 22±2 °С должны за 2 мин. проходить на контрольном тесте (ленте) путь 25–30 см, следуя за пальцем экспериментатора.

3.2.1. Методы топикального нанесения акарицидов на клещей

С помощью микродозатора 0,3 мкл раствора исследуемого вещества или препарата наносят на спинную поверхность клеща. Используют не менее четырех концентраций, в каждом варианте по 10 клещей. В контроле на клещей наносят растворитель в том же объеме.

Если токсичность препарата для клещей не известна хотя бы приблизительно, ставят ориентировочный опыт. Готовят пять 10-кратных разведений препарата и на каждое разведение используют по 10 клещей. Для более точного определения акарицидной активности берут то максимальное разведение (минимальную концентрацию), которое вызвало 100%-ную

гибель клещей в ориентировочном опыте, и из него готовят пять 2-кратных разведений. Каждое из 2-кратных разведений испытывают не менее чем на 10 клещах. В опыте используют клещей одного пола, желательнее самок. Если использованы клещи обоих полов, то оценку токсичности проводят для самцов и самок отдельно. После высыхания раствора иксодовых клещей помещают в пробирки дифференцированной влажности и содержат при комнатной температуре и естественном освещении, аргасовых клещей – в пробирки с полоской фильтровальной бумаги, сложенной гармошкой, и содержат в специальных шкафах, в которых для поддержания высокой влажности (около 90%) стоят стаканы с водой, или в коробках, прикрытых влажным полотенцем.

Учет результатов проводят на 5-е сутки для иксодовых клещей и через 5–15 сут – для аргасовых. При анализе результатов опытов методом пробит-анализа вычисляют показатели $СД_{50}$ и $СД_{99}$ в мкг на одну особь.

3.2.2. Методы принудительного контакта клещей с обработанной поверхностью

Контактирование иксодовых клещей с обработанными поверхностями проводят, используя фильтровальную бумагу. Бумагу в виде круга диаметром 10 см (на 1 см больше диаметра стандартной чашки Петри), площадью 78 см² размещают горизонтально на непитающей поверхности (стекло, керамическая плитка и т. д.) и с помощью пипетки или распылителя равномерно наносят на нее раствор изучаемого вещества в ацетоне (серия концентраций – не менее 5) из расчета 1 мл раствора на 100 см² или 0,78 мл на круг. В контрольном варианте на круги такой же бумаги наносят тем же способом растворитель. После испарения растворителя фильтры помещают на дно чашек Петри так, чтобы края слегка загибались на стенки чашки. Продолжительность контакта клещей с бумагой – 10 мин. Клещей, выползающих за пределы круга, кисточкой возвращают на бумагу. Поскольку клещи достаточно подвижны, одновременно в чашку Петри целесообразно помещать не более 2–3 особей. Контакт с каждой концентрацией проводят в трех повторностях по 10 клещей в каждой при комнатной температуре. В контроле, едином на весь опыт, также три повторности по 10 клещей. Все работы с контрольными клещами должны быть проведены

на отдельном столе с использованием незагрязненных инструментов (ножниц, кисточек и т. д.). Работы с разными концентрациями необходимо начинать с меньших. Сразу после контакта клещей кисточкой переносят в пробирки дифференцированной влажности (по 10 особей в пробирку), которые размещают горизонтально в условиях комнатной температуры и естественной освещенности. Учет результатов опыта проводят ежедневно в течение 5 сут. К живым относят особей, способных к передвижению, к категории «мертвые» – неподвижных клещей, не реагирующих на тепло руки и дыхание (обычно у мертвых клещей раздвинуты пальпы), а также слабоподвижных клещей с резкими нарушениями координации. Если смертность клещей в контроле составляет 5–20%, то в дальнейшие расчеты необходимо вводить поправку по формуле Аббота (формула 5). Полученные данные обрабатывают с помощью метода пробит-анализа.

Контактирование аргасовых клещей проводят по той же методике. Эти клещи плохо передвигаются по стеклянной вертикальной поверхности и крайне редко заползают на стенки, поэтому всех особей одной повторности запускают в чашку одновременно. Продолжительность контакта 30–60 мин. Для препаратов с низкой акарицидной активностью экспозицию увеличивают до 2–4 ч. Гибель клещей отмечают на 5 и 15-е сутки после контакта. Учет гибели – как у иксодовых клещей.

На основании результатов проверок высчитывают $СК_{50}$ и $СК_{99}$. Акарицидную активность препарата в каждом разведении определяют по формуле (6).

Для установления длительности остаточного действия препаратов используют впитывающую бумагу (фильтр), пропитанную (обработанную) в минимальной дозировке, вызвавшей 100%-ную гибель клещей в предыдущем опыте. Обработанную одновременно бумагу хранят при комнатной температуре так, чтобы они не соприкасались. Контакт клещей проводят впервые через неделю после пропитывания бумаги и далее еженедельно в течение месяца, а затем с месячными интервалами до тех пор, пока доля погибших клещей не достигнет 70% или менее. Для каждого контакта используют новый фильтр. Учет результатов проводят, как в основном опыте. Продолжительность остаточного действия

препарата выражают в сутках со дня обработки бумаги до времени регистрации 70%-ной смертности.

3.2.3. Определение скорости наступления состояния нокдауна и высоты подъема клещей по обработанной ткани

Тест для опытов готовят следующим образом. На ленте из хлопчатобумажной бязи размером 10×70 см карандашом наносят отметки длины от 0 до 60 см, причем первая (нулевая) отметка делается на расстоянии 10 см от края. На участок ленты, размещенной горизонтально на непитьвающей поверхности (стекло, керамическая плитка и т. д.), начиная от отметки 0 до 10 (площадь обрабатываемого участка 100 см²), из пипетки или распылителя равномерно наносят 1 мл 1%-ного ацетонового раствора изучаемого вещества. Контрольный тест обрабатывают аналогично, используя ацетон. После испарения растворителя тесты развешивают в лаборатории в одинаковых контролируемых условиях температуры, влажности и освещенности. Опыты проводят в день обработки. Тесты закрепляют под углом 70 град. Клещей по одному помещают на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдают за их передвижением вверх по ткани, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от гипостома клеща, т.е. спереди. С помощью секундомера регистрируют время от момента пересечения клещом нижней черты обработанного участка до отпадения клеща с теста, что соответствует времени наступления состояния нокдауна ($ТН$, мин.). Отпавших клещей фиксируют в 70%-ном растворе этилового спирта или продолжают дальнейшее наблюдение за ними. Опыт проводят не менее чем с 10 самками. Рассчитывают среднее значение времени наступления состояния нокдауна $ТН_{ср.}$ в минутах и статистическую ошибку.

Одновременно с определением $ТН_{ср.}$ регистрируют максимальную высоту подъема клеща по тесту ($МВ$, см). Рассчитывают среднее значение показателя $МВ_{ср.}$ в сантиметрах и статистическую ошибку.

3.2.4. Определение скорости присасывания клещей, контактировавших с исследуемыми веществами

На тщательно выстриженную спину лабораторного кролика коллодием или другим не токсичным для кожи клеем приклеивают 4 стеклянных цилиндра (диаметр 3 см, высота 4 см) с отогнутыми краями. Один из них является контрольным, а три – опытными. Сначала в контрольный цилиндр запускают 5 самок, ползавших до этого в течение 2 мин. на необработанном (контрольном) тесте. Верхнее отверстие цилиндра затягивают мелкосетчатым материалом, закрепляя его резиновым кольцом. В каждый из опытных цилиндров запускают по 5 самок сразу после их контакта с обработанной поверхностью. Продолжительность контакта должна составлять половину TN_{cp} . Время от запуска до присасывания каждой самки к кролику регистрируют с помощью секундомера. Контроль и опыт повторяют трижды. Рассчитывают среднее значение времени присасывания самок в контроле, опыте и отношение этих показателей, которое называется индексом скорости присасывания (ИСП).

$$ИСП = \frac{V_k}{V_o},$$

где V_k – средняя скорость присасывания клещей в контроле, мин.; V_o – средняя скорость присасывания клещей в опыте, мин.

3.3. Методы изучения регуляторов развития насекомых

3.3.1. Общие сведения

Группа регуляторов развития насекомых (РРН) объединяет соединения, являющиеся по механизму действия аналогами природных гормонов насекомых: ювенильного (АЮГ или ювеноиды), личиночного (ЛГ или экдизоиды), нейrogормонов и ряда других. В эту группу входят также химические соединения, не являющиеся по структуре аналогами природных гормонов, но вызывающие у насекомых гормоноподобные эффекты. К ним относятся ингибиторы синтеза хитина (ИСХ): хлор- и фторпроизводные мочевины (дифлубензурон, тримфлумурон, гексафлумурон и др.). Из группы аналогов ювенильного гормона наиболее известны метопрен, гидропрен и пирипроксифен, из группы ИСХ – димилин.

Для характеристики активности АЮГ и ИСХ используют величины эффективных концентраций и доз, вызывающие морфогенетические или прочие изменения у 50, 95 или 99% членистоногих.

Механизм действия АЮГ заключается в том, что введение экзогенного аналога в тот период, когда титр истинного гормона в организме насекомого минимален («критический период»), вызывает эффекты, отсутствующие при нормальном прохождении метаморфоза. Поскольку эти соединения являются аналогами природных гормонов, организм реагирует на их появление (присутствие) образованием промежуточных особей, гигантских, сильно меланизированных личинок, недоразвитых куколок с развитой головой имаго и т. п.

Ингибиторы синтеза хитина – это соединения, которые ингибируют процесс образования глюкозы, необходимой для синтеза хитина. Из-за ее отсутствия ослабляется связь между эндо- и экзокутикулой и насекомое не может завершить процесс окукливания.

3.3.2. Проявление гормоноподобного действия

Проявлением гормоноподобного действия ИСХ является отсутствие куколок и различные нарушения линьки на протяжении всего цикла развития от яйца до начала окукливания. Появление куколок свидетельствует об окончании срока действия ИСХ.

При воздействии АЮГ отмечают нарушения морфогенеза на протяжении всего цикла развития, отсутствие вышлуда имаго, появление неполноценных имаго или особей с признаками предшествующей фазы развития – «адультидов».

Фаза яйца. Воздействие АЮГ на процессы эмбриогенеза заключается в ингибировании дифференциации клеток и тканей и может проявляться в гибели эмбрионов на разных стадиях развития внутри яйца или в отрождении уродливых нежизнеспособных личинок. Видимые нарушения эмбриогенеза могут быть вызваны как путем нанесения АЮГ непосредственно на яйцо, так и путем обработки самок в период, предшествующий яйцекладке. Воздействие препаратов на свежее отложенное яйцо (20–30 ч после откладки) препятствует нормальному развитию эмбриона, приводя его к гибели. В более поздние сроки после от-

кладки, когда процесс эмбриогенеза уже завершен и в яйце происходят процессы личиночной дифференциации, обработка уже не препятствует отрождению личинок. Однако личинки могут иметь нарушения линьки, образовывать промежуточные формы и погибать при линьке на имаго.

ИСХ в отличие от АЮГ не блокируют эмбриогенез: из яйца развивается личинка, которая погибает на стадии очередной линьки.

Фаза имаго. У блох наблюдается эффект стерилизации у самок при воздействии ИСХ и нарушения при формировании кокона при воздействии АЮГ.

Фаза личинки. В процессе онтогенеза насекомых периоды очень высокой чувствительности к АЮГ чередуются с периодами полной нечувствительности к его действию. Поэтому получить видимые эффекты от применения АЮГ возможно лишь в отдельные моменты развития, когда титр природного гормона в гемолимфе снижается до критического уровня или гормон отсутствует вообще. В это время организм наиболее чувствителен к АЮГ – это и есть «критический период», во время которого и следует проводить испытания АЮГ. Учитывая, что «критический период» у АЮГ – это личинка последнего возраста, для получения достоверных результатов необходим строго выровненный биологический материал, отличающийся по возрасту в пределах от нескольких часов до суток.

Фаза куколки. ИСХ и АЮГ слабо проникают через пупарий, поэтому воздействуют очень слабо.

3.3.3. Тест-объекты

и постановка экспериментов

3.3.3.1. Оценка эффективности АЮГ по отношению к крысиным блохам

В субстрат для развития личинок (тонкий слой песка, предварительно во избежание заплесневения прокаленный в течение 2 ч и смешанный с сухим стандартным альбумином и пивными дрожжами: 3 г альбумина на 10 г песка) вносят раствор АЮГ в ацетоне. После испарения растворителя по 30 личинок блох последнего возраста помещают в субстрат. Эффективность оценивают, подсчитывая ежедневно личинок с нарушением метаморфоза. Показатели эффективности: 1) нарушения в развитии личинок, 2) отсутствие нормально

сформированного кокона, 3) отсутствие выплода жизнеспособных имаго.

3.3.3.2. Оценка эффективности ИСХ по отношению к крысиным блохам

В субстрат для развития личинок (тонкий слой песка, предварительно во избежание заплесневения прокаленный в течение 2 ч и смешанный с сухим стандартным альбумином и пивными дрожжами: 3 г альбумина на 10 г песка) вносят раствор ИСХ в ацетоне. После испарения растворителя по 30 личинок блох II возраста помещают в субстрат. Эффективность оценивают, подсчитывая ежедневно личинок с нарушением метаморфоза.

3.4. Методы изучения репеллентной активности веществ

Отбор веществ, обладающих репеллентной активностью, проводят в два этапа: на первом этапе определяют уровень репеллентной активности в сравнении с эталоном, которым является диэтилтолуамид (ДЭТА) в аналогичных концентрациях, на втором этапе изучают спектр репеллентного действия веществ в разных концентрациях по отношению к различным видам насекомых [1, 3–5].

3.4.1. Определение репеллентной активности веществ по отношению к иксодовым клещам

3.4.1.1. Метод отсекающей концентрации

Для иксодовых клещей, обладающих свойством отрицательного геотаксиса, возможны два варианта опытов: по отсекающей концентрации и по градиенту концентраций. В первом, более простом варианте, используют тест из полоски хлопчатобумажной бязи размером 10×70 см. На нее карандашом наносят отметки длины от 0 до 60 см, причем первую (нулевую) отметку делают на расстоянии 10 см от края. На участок ленты, размещенной горизонтально на невпитывающей поверхности (стекло, керамическая плитка и т. д.), начиная от отметки 0 до 10 (площадь обрабатываемого участка 100 см²) из пипетки или распылителя равномерно наносят 1 мл 20%-ного раствора изучаемого вещества в этиловом спирте или препаративную форму. Эталонный тест обрабатывают аналогично опытному, используя раствор ДЭТА. Контрольный тест обрабатывают, используя только растворитель. После испарения растворителя все тесты развешивают в лаборатории в одинаковых контролируе-

мых условиях температуры, влажности, освещенности. опыты проводят в день обработки. Тесты закрепляют под углом 70 град. Клещей по одному помещают на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдают за их передвижением вверх по ткани, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держат на расстоянии 0,5 см от гипостома клеща. На контрольном тесте, как правило, все клещи проползают отмеченную зону. При испытаниях опытного и эталонного тестов регистрируют число клещей, проползших обработанную зону. После испытаний клещей фиксируют в 70%-ном растворе этилового спирта или продолжают дальнейшее наблюдение за ними. Опыт проводят не менее чем с 10 самками. Рассчитывают КОД, который в данном случае равен доле (в процентах) клещей, не проползших обработанную зону, от числа клещей в опытном варианте. Результаты опытов сопоставляют с результатами испытаний эталонного теста, который, как правило, обеспечивает для таежных клещей КОД 95–100%. Для определения длительности репеллентного действия (ДРД) испытания повторяют ежедневно до тех пор, пока КОД сохраняется равным или выше 90%.

3.4.1.2. Метод градиента концентраций

На ленте бязи (10×70 см) обрабатывают зоны по 5 см (площадь 50 см²) одним миллилитром 5–10–20–40%-ных растворов репеллента в этиловом спирте. Обработанные зоны чередуют с контрольными (необработанными) полосами по 10 см. Нижний край ленты на 10 см оставляют необработанным. Подготовленную к испытанию ленту просушивают в горизонтальном положении и закрепляют под углом 70 град.

Клещей по одному подсаживают на 5 см ниже первой обработанной полосы и наблюдают за их передвижением вверх. Стремление ползти вверх усиливают пальцем экспериментатора, перемещаемым на расстоянии 0,5 см от гипостома движущегося клеща. Отмечают поведение клещей при пересечении каждой из обработанных полос. Малоактивных клещей, не достигших нижней обработанной полосы, в опыте не учитывают. Определяют наименьшую концентрацию, отпугивающую клещей. Удовлетворительными репеллентными свойствами обладает та концентрация, при которой обработанное пространство пересекают не более 10% клещей от числа взятых в опыт.

3.4.2. Определение репеллентной активности веществ по отношению к природным популяциям кровососущих двукрылых

Полоски марли размером 20×50 см площадью 1000 см² пропитывают 10–20%-ными спиртовыми растворами репеллентов или препаративных форм из расчета 20 мл на 1 м² ткани. Обработанные полоски марли развешивают и подсушивают в течение суток.

Первое определение отпугивающего действия тестов проводят через сутки после обработки, последующие – один раз на 3, 5 и 7-е сутки. В промежутках между опытами тесты хранят в вертикальном положении на открытом воздухе под навесом в условиях, обеспечивающих свободное испарение вещества.

Испытания проводят в местах массового нападения кровососущих насекомых. До начала исследований и в период проведения опытов проводят учеты численности насекомых и их сбор (сачком или экстаустером) для определения доминирующих видов, регистрируют метеорологические факторы (температура и влажность воздуха, сила ветра, освещенность, давление). Интенсивность нападения кровососов на животного (собаку, кошку) определяют путем подсчета числа насекомых, севших на животное в течение 20 мин. (4 раза по 5 мин.) через каждый час в период суточной активности кровососущих насекомых. Данный эксперимент можно провести аналогично без животного, используя обнаженное предплечье (голень) испытателя.

Эффективность репеллента определяют в часы максимальной активности доминирующих видов при интенсивности их нападения на животное или обнаженное предплечье (голень) испытателя не менее 25–30 особей за 5 мин. Испытания проводят не менее трех человек (один испытывает опытный образец, второй – эталон, третий – контроль). Испытатели с опытной и эталонной полосками ткани располагаются с подветренной стороны от контрольного на расстоянии не менее 5 м от него и друг от друга в условиях равномерного освещения. Полоски ткани размещают на животных или на обнаженном предплечье (голени) и подсчитывают число кровососов, садящихся на них в течение 15 мин. (три раза по 5 мин.).

Величину репеллентного действия препарата определяют по показателю КОД. Острое

репеллентное действие характеризует КОД, установленный в первые сутки после обработки тестов. В качестве эталона используют ДЭТА в аналогичной концентрации.

Определение длительности репеллентного действия обработанной ткани проводят периодически в течение сезона. Препарат считают неэффективным, когда его КОД опускается ниже 70%. Длительность репеллентного действия выражают в сутках.

4. Оценка эффективности инсектоакарицидных препаратов в клинических условиях

4.1. Общие требования к проведению испытаний в клинических условиях

По результатам изучения в лабораторных условиях инсектицидной, акарицидной, рогострегающей, репеллентной активности веществ и их препаративных форм определяют эффективные концентрации и нормы расхода по отношению к разным видам членистоногих, имеющим ветеринарное значение (спектр действия) и ориентировочную кратность обработок.

Надежная модель доклинических экспериментальных исследований *in vitro* для полной оценки инсектоакарицидной эффективности при эктопаразитах отсутствует, в связи с чем, проводят исследования на естественно или экспериментально зараженных животных.

Испытания препаратов в клинических условиях включают два этапа. Первый этап – ограниченные практические испытания (первичные эксперименты), второй – широкие практические испытания [1, 2].

На первом этапе определяют оптимальные условия применения исследуемого препарата, возможные побочные явления, которые могут возникнуть у животных и людей, контактировавших с препаратом (проводящих обработку). Эти испытания проводят на ограниченном числе животных.

Широкие практические испытания (второй этап) проводят совместно с силами практических организаций (ветеринарных клиник, ветеринарных станций, питомников и т. д.) в разных регионах, отличающихся климатическими и географическими условиями, видовым составом и сезонной динамикой численности членистоногих и др.

Учет эффективности проводят по типу «контрольный тест». В случае невозможности формирования контрольных групп учет эффективности проводят по типу «критический тест».

Испытания средств осуществляют в соответствии с проектом инструкции по их применению специалистами (энтомологами, паразитологами, ветеринарными врачами, биологами). В проект инструкции должны быть включены общие сведения о средстве (состав полностью, класс опасности, показания); порядок применения; дозы; рабочие концентрации; учет эффективности обработок; меры предосторожности при работе со средством и меры первой помощи при случайном отравлении.

Обобщение и анализ материалов клинических испытаний проводит организация, ответственная за подготовку и проведение таких испытаний.

4.2. Критерии включения животных в опыт

Клинически здоровые (за исключением симптомов болезни отбора), носители живых возбудителей эктопаразитозов, возраст старше 6 месяцев, отсутствие клинически обнаруживаемой беременности или лактации, без предшествующей терапии другими инсектоакарицидами в течение 8 недель до дня 0 (день обработки) по сведениям от владельцев.

Животные могут содержаться в условиях приюта, ветеринарной клиники или проживать в обычных условиях у владельцев на всем протяжении опыта и получать привычный корм. Опытные препараты и препараты сравнения применяют в дозе в соответствии с массой (взвешивание животного в день 0) и вносят в таблицу расчета дозы в зависимости от массы по каждому тестируемому препарату, также записывают данные по используемой фасовке препарата (пипетки объем, раствор из флаконов и т. д.) и метод применения.

Для опытов отбирают животных из приютов или принадлежащих частным владельцам. В группе должно быть не менее 8 животных, которые должны завершить испытания (поэтому целесообразно подобрать по 10 животных), самок и самцов – без ограничений, у самок не должно быть выявлено беременности или лактации, каждое животное должно получить идентификационный номер (например, ошейник с кодом).

4.3. Общая схема ведения эксперимента

Для эксперимента подбирают животных, пораженных эктопаразитами, в условиях ветеринарных клиник или приюта. Животные могут содержаться в условиях приюта, ветеринарной клиники или проживать в обычных условиях у владельцев на всем протяжении опыта и получать привычный корм.

Всех исследуемых животных по принципу аналогов разделяют на 3 группы: две опытные и контрольную. Животным первой опытной группы применяют исследуемый препарат, второй группе – препарат сравнения (известный, зарегистрированный в установленном порядке), животным контрольной группы – плацебо.

Если по каким-то причинам постановка контроля невозможна и об эффективности приходится судить по результатам до и после применения препарата, тогда формируют 2 опытные группы: первой опытной группе применяют исследуемый препарат, второй – препарат сравнения.

Составляют таблицу, в которую вносят: массу тела животного, возраст, пол, породу, отмечают степень выраженности клинических проявлений эктопаразитозов, информацию о препаратах (торговое наименование, лекарственная форма, содержание ДВ, поставщик, производитель, условия хранения, серия, дата истечения срока годности, меры предосторожности при работе).

Также отмечают и вносят в таблицу все нежелательные явления, которые были выявлены в процессе эксперимента и в последующий период по группам (гибель, вторичные инфекции, шок, коллапс, судороги, слепота, глухота, перитонит, реакции на месте нанесения препарата и др.).

При сопутствующей терапии (антибиотики, витамины, седативные препараты) указывается полная информация об используемом препарате (регистрационный номер, серия, срок годности, дозы, порядок применения).

4.4. Методика исследования инсектицидной эффективности препаратов при энтомозах (афаниптероз, линогнатоз, триходектоз)

На спонтанно зараженных животных исследования проводят в параллельных группах:

1 группа – опыт (исследуемый препарат), 2 – препарат сравнения (известный препарат-аналог); 3 – группа контрольная (плацебо). Подсчет насекомых проводят в дни: -1/0, 2, 7, 14; фиксация (описание, измерение, фотографирование) мест поражения в дни: -1/0, 2, 7, 14.

В дни -1/0 животных взвешивают на калиброванных и поверенных электронных весах и проводят клинический осмотр самок на беременность с использованием УЗИ; в дни -1 или 0 и в дни 2, 7, 14 проводят осмотр кожного покрова на наличие живых насекомых. Число насекомых от каждого животного записывают отдельно. Клиническое проявление повреждений оценивают и регистрируют у каждого животного в дни осмотра. Для каждого животного оценивают (с правой и левой стороны) следующие параметры: участки тела с расчесами, участки тела с выпадением шерсти. На протяжении 5-минутного периода регистрируют наличие или отсутствие зуда. Для иллюстрации распространения поврежденной кожи и процесса восстановления делают цветные фотографии каждого животного до применения в дни -1/0 и в дни 14.

Оценку эффективности проводят по снижению числа насекомых, элиминации живых насекомых на основании их подсчета, а также исчезновения клинических признаков и симптомов.

Все наблюдения записывают и рассматривают в клиническом отчете, описание статистики массы животного приводят в виде таблицы.

Расчет эффективности. Результатом успешного лечения считают отсутствие живых насекомых. Также вычисляют снижение числа живых насекомых для животных всех групп в каждый день оценки в соответствии со стандартными формулами.

В отчете приводят расчеты процентного снижения с использованием среднего арифметического.

Процентное снижение числа живых насекомых

Процентное снижение = $100 \times (M_c - M_o) / M_c$,

где M_c – среднее число живых насекомых у животных контрольной группы (плацебо); M_o – среднее число живых насекомых у животных в опытных группах.

Ведут описательную статистику числа живых насекомых для различных дней оценки (среднее значение, ошибка среднего значения, достоверность).

Эффективность по результатам элиминации насекомых

Отсутствие живых насекомых у животного расценивают как успешное лечение. Долю от общего числа животных в каждой из трех групп (частота успешного лечения) вычисляют следующим образом:

$$\text{Частота успешного лечения (A)} = \frac{\text{Число животных без живых клещей}}{\text{Общее число животных}}$$

Эффективность в двух опытных группах вычисляют путем расчета частоты неэффективности терапии в каждой из трех терапевтических групп:

$$\text{Частота неэффективности (B)} = 1 - A.$$

$$\text{Эффективность (\%)} = (1 - BO / BC) \times 100,$$

где BO – частота неэффективности в каждой опытной группе; BC – частота неэффективности в контрольной группе.

Если постановка контроля невозможна, учет эффективности проводят по типу «критический тест» по формуле:

$$Y = \frac{B}{A} \times 100\%,$$

где A – среднее число живых насекомых до обработки; B – среднее число живых насекомых после обработки.

4.5. Методика исследования акарицидной эффективности препаратов при саркоптозах, демодекозе

На спонтанно зараженных животных исследования проводят в параллельных группах: 1 группа – опыт (исследуемый препарат), 2 – препарат сравнения (известный препарат-аналог); 3 – группа контрольная (плацебо). При невозможности формирования группы контроля (плацебо) формируют две опытные группы. Подсчет клещей проводят в дни: -1/0 и 28 (± 2 дня); фиксация (описание, измерение, фотографирование) мест поражения в дни -1/0 и 28 (± 2 дня).

В дни -1/0 животных взвешивают на калиброванных и поверенных электронных весах и проводят клинический осмотр самок на беременность с использованием УЗИ; в дни -2/-1 или 0 и в дни 27/28 делают соскобы кожи (± 4 см² до появления капельки крови) с 5 различных участков (место регистрируют у каждого животного), подозрительных на саркоптозное или демодекозное поражение. Из соскобов готовят маркированные (индивидуальный номер животного и область тела) пробы (слайды) с минеральным маслом и просматривают под микроскопом для обнаружения живых клещей. Число клещей в каждом соскобе записывают отдельно. Клиническое проявление и распространенность чесоточных повреждений оценивают и регистрируют у каждого животного в дни отбора соскобов по стандартной схеме. Для каждого животного оценивают (с правой и левой стороны) следующие параметры: участки тела с эритематозными папулами; участки тела с фолликулярными слепками, корочками и чешуйками (к – корочки, с – слепки, ч – чешуйки); участки тела с выпадением шерсти (1 – небольшое разрежение шерсти, 2 – выраженная потеря шерсти, 3 – отсутствие шерсти). На протяжении 5-минутного периода регистрируют наличие или отсутствие зуда. Для иллюстрации распространения повреждений кожи и процесса восстановления делают цветные фотографии каждого животного до применения в дни -1/0 и в дни 27/29.

Оценку эффективности проводят по снижению числа живых клещей, элиминации живых клещей на основании их подсчета, а также исчезновения клинических признаков и симптомов.

Все наблюдения записывают и рассматривают в клиническом отчете, описание статистики массы животного приводят в виде таблицы.

Расчет эффективности. Результатом успешного лечения считают отсутствие живых клещей. Также вычисляют снижение числа живых клещей для животных всех групп в каждый день оценки в соответствие со стандартными формулами. Учитывают факт возможного присутствия небольшого и даже нулевого числа клещей, в этом случае для расчета процентного снижения используют среднее геометрическое значение. Расчеты основаны на средних геометрических значениях (число клещей +1). Цифру

1 вычитают из конечного результата для получения значимого среднего геометрического для каждой группы. В отчете также приводят расчеты процентного снижения с использованием среднего арифметического.

Процентное снижение числа живых насекомых

Процентное снижение = $100 \times (M_c - M_o) / M_c$,

где M_c – среднее число живых клещей у животных контрольной группы (плацебо) на заданной точке; M_o – среднее число живых клещей у животных в опытных группах.

Ведут описательную статистику числа живых клещей для различных дней оценки (среднее значение, ошибка среднего значения, достоверность).

Эффективность по результатам элиминации насекомых

Отсутствие живых клещей у животного расценивают как успешное лечение. Долю от общего числа животных в каждой из трех групп (частота успешного лечения) вычисляют следующим образом:

$$\begin{aligned} \text{Частота успешного лечения (A)} &= \\ &= \frac{\text{Число животных без живых клещей}}{\text{Общее число животных}} \end{aligned}$$

Эффективность в двух опытных группах вычисляют путем расчета частоты неэффективности терапии в каждой из трех терапевтических групп:

$$\text{Частота неэффективности (B)} = 1 - A.$$

$$\text{Эффективность (\%)} = (1 - BO / BC) \times 100,$$

где BO – частота неэффективности в каждой опытной группе; BC – частота неэффективности в контрольной группе.

Если постановка контроля невозможна учет эффективности проводят по типу «критический тест» по формуле:

$$Y = \frac{B}{A} \times 100\%,$$

где A – среднее число живых клещей до обработки; B – среднее число живых клещей после обработки.

Устранение клинических симптомов

Данные о наличии зуда, эритематозных папул, слепков, корочек, чешуек и областей тела с потерей шерсти, записанные при осмотре, должны быть сведены в таблицы для каждого животного. Общие изменения во внешнем виде каждого животного проиллюстрированы в этих таблицах цифровыми фотографиями до и после лечения. Таблицы показывают общую распространенность и устранение симптомов. Для расчета частоты успешного лечения на основании клинических симптомов и признаков используют ту же процедуру; аналогичным образом вычисляют эффективность для каждой опытной группы.

Кроме того, выполняют полуколичественную оценку возобновления роста шерсти и каждому животному на различных днях оценки после лечения присваивают определенный балл. Группы сравнивают при помощи описательных методов с использованием частот и процентов: 1 балл – восстановление шерстного покрова на 0–50% участков повреждений кожи, отмеченных во время оценки до лечения; 2 балла – восстановление шерстного покрова на >50% – ≤90% участков повреждений кожи, отмеченных во время оценки до лечения; 3 балла – восстановление шерстного покрова на >90% участков повреждений кожи, отмеченных во время оценки до лечения.

Статистика

Даже при тщательно отработанной технике метод соскобов несовершенен, т. к. в образец отбирается только небольшой процент волосяных фолликулов животного, поэтому для увеличения достоверности результатов объем выборки не должен быть меньше 8 особей на группу. Единица статистики – отдельное животное.

Статистическую обработку полученных данных проводят с помощью критерия Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel. Уровень значимости $P < 0,05; 0,01; 0,001$.

Подтверждение эффективности. Препарат считают эффективным, если в день заключительной оценки (28-е сутки) зарегистрировано 100%-ное снижение числа живых клещей.

Нежелательные явления, зафиксированные в процессе опыта. Отмечают и вносят в

таблицу все нежелательные явления, которые были выявлены в процессе опыта и в последующий период по группам (гибель, вторичные инфекции, шок, коллапс, судороги, слепота, глухота, перитонит, реакции на месте нанесения препарата и др.).

Изменения к протоколу (отражается, были ли изменения в программе исследований). Вносимые поправки фиксируются. Например, соскобы сделали не на -1/0 день, а на день -2. Влияние на исследование – отсутствует. В каждую группу следовало включить по 10 животных с тем, чтобы завершили – 8 собак, а в 1 группу включили 9 собак.

4.6. Методика исследования акарицидной эффективности препаратов при отодектозе

Исследования проводят на спонтанно зараженных животных в параллельных группах: 1 группа – опыт (исследуемый препарат), 2 – препарат сравнения (зарегистрированный препарат); 3 группа – контрольная (плацебо). При невозможности формирования группы контроля (плацебо), формируют две опытные группы.

Исследование состоит из: отоскопическая (микроскопическая) оценка в дни -2, 14 и 28; очередность распределения по группам (опыт, контроль, препарат сравнение) - день -2; применение препаратов в день начала эксперимента (0).

Клинический осмотр всех животных проводят в дни: -2, 14 и 28. В течение 4 ч после обработки животных осматривают каждый час (обнаружение возможных нежелательных явлений), осмотр и отоскопию (микроскопию) для подтверждения диагноза и учета эффективности проводят в дни -2, 14 и 28. Все наблюдения записывают и рассматривают в клиническом отчете, описание статистики массы животного приводят в виде таблицы.

Отоскопия (микроскопия) носит качественный характер и наличие или отсутствие живых ушных клещей (взрослых или незрелых) регистрируют по следующей схеме: 0 = 0 живых клещей; 1 = 1–4 живых клеща; 2 = 5–10 живых клещей; 3 = более 10 клещей.

Также оценивают наличие или отсутствие крошковых корок/серы в ушной раковине и при наличии выполняют оценку по следующей схеме: 0 = крошковые корки/

сеера отсутствуют; 1 = небольшое число крошковых корок/серы; 2 = умеренное число крошковых корок/серы; 3 = большое число крошковых корок/серы.

Разрешена сопутствующая терапия (антибиотики, витамины, седативные препараты). Во время процедуры промывания ушных раковин возможна седация, во время плановых процедур (клинические исследования, отоскопия, обработка тестируемыми препаратами) животных удерживают. Во время промывания ушных раковин на 28-е сутки все животные получают седативное средство (указывают регистрационный номер, серию, срок годности).

Акарицидные препараты и плацебо применяют в дозе в соответствии с массой животного (взвешивание в день 0) и вносят в таблицу расчета дозы в зависимости от массы по каждому тестируемому препарату, также записывают данные по используемой фасовке препаратов (пипетки объем, раствор из флаконов), число мест нанесения препаратов крупным животным.

Критерии эффективности. Первичной конечной точкой эффективности является число живых клещей в группах, получавших опытные препараты, на 28-е сутки по сравнению с числом в контрольной группе, получавшей плацебо.

Методы расчета эффективности препарата. Эффективность вычисляют для каждой группы животных. Для расчета в случае, если регистрируют небольшое или нулевое число клещей, необходимо использовать среднее геометрическое, а не среднее арифметическое значение. Расчеты основаны на среднегеометрических значениях (число клещей + 1). Цифру 1 вычитают из конечного результата для получения значимого среднего геометрического для каждой группы.

$$\text{Эффективность (\%)} = 100 \times (G_c - G_o) / G_c,$$

где G_c – среднее арифметическое или геометрическое число живых клещей у животных в группе отрицательного контроля (группа 1 – плацебо); G_o – среднее арифметическое или геометрическое число живых клещей у животных в опытной группе.

Если постановка контроля невозможна, учет эффективности проводят по типу «критический тест» по формуле:

$$Y = \frac{B}{A} \times 100\%,$$

где A – среднее число живых клещей до обработки; B – среднее число живых клещей после обработки.

Ведут описательную статистику числа живых клещей для различных дней оценки (среднее значение, ошибка среднего значения, достоверность).

4.7. Методика исследования акарицидной эффективности препаратов при иксодидозах

Острую акарицидную эффективность изучают на спонтанно зараженных животных. Исследования проводят в параллельных группах: 1 группа – опыт (исследуемый препарат), 2 – препарат сравнения (зарегистрированный препарат). В первый день фиксируют наличие клещей, вид, пол, отмечают место прикрепления, состояние, фотофиксируют. После применения препаратов в течение 24 ч животных осматривают каждый час и отмечают состояние клещей, отпадение, время отпадения от начала применения препарата, гибель. Все наблюдения записывают в клиническом отчете, описание статистики времени отпадения и гибель клещей приводят в виде таблицы. Острую акарицидную активность препарата (Y) оценивают по формуле:

$$Y = \frac{B}{A} \times 100\%,$$

где A – исходное число клещей до обработки; B – число отпавших (погибших) клещей после обработки.

Итоговая эффективность представляет среднюю величину от значений всех животных группы.

Для оценки остаточной акарицидной эффективности исследуемых препаратов проводят наблюдения за животными в течение 1–2 мес. с проведением осмотров кожного покрова через 5 сут после обработки до фиксации на животных присосавшихся иксодовых клещей. Все наблюдения записывают в клиническом отчете, описание статистики времени присасывания клещей приводят в виде таблицы. Длительность акарицидного действия (ДД, сут.) определяют со дня обработки и до ми-

нимального срока фиксации присосавшегося клеща на животном в опытной группе.

При наличии опытных целевых животных или согласия владельцев, профилактическую эффективность можно исследовать методом подсадки клещей рода *Ixodes*. Для этого формируют две опытные группы (по 3–6 животных): 1 группа – исследуемый препарат, 2 группа – препарат сравнения (препарат-аналог). После применения препаратов в опытных группах согласно инструкциям, проводят подсадку клещей через каждые 5 сут до момента присасывания клеща. Длительность акарицидного действия (ДД, сут) определяют со дня обработки и до минимального срока фиксации присосавшегося клеща на животном в опытной группе.

Термины и символы

Акарицид – вещество или препаративная форма, предназначенная для уничтожения клещей.

АЮГ – аналог ювенильного гормона.

ДВ – действующее вещество – активный ингредиент, обладающий инсектицидной, акарицидной и другими типами активности.

ДД – длительность действия.

Доза – количество ДВ, нанесенное на членистоногое или введенное в его организм; выражают в мг (мкг) на особь или единицу массы (мкг/г).

ДРД – длительность репеллентного действия.

Инсектицид – вещество или препаративная форма, предназначенная для уничтожения насекомых.

Инсектоакарицидная активность – способность вещества обеспечить гибель членистоногого в результате попадания на его тело, в дыхательную систему или в пищеварительный тракт.

ИСП – индекс скорости присасывания клещей.

ИСХ – ингибитор синтеза хитина.

КОД – коэффициент отпугивающего действия.

Концентрация – величина, характеризующая содержание вещества в препаративной форме, рабочих растворах, смесях, различных средах (жидкость, воздух и др.); выражают в %, весовых или объемных единицах (г/м³, мг/л).

(ТН) – время наступления нокдауна у членистоногих после воздействия инсектоакарицида.

МВ_{ср} – среднее значение максимальной высоты подъема клещей по обработанной ткани (см).

Препарат, средство, препаративная форма – поступающий в продажу инсектоакарицид, репеллент, регулятор развития, содержащий ДВ и функциональные составляющие.

Репеллент (инсекторепеллент, акарорепеллент) – вещество или средство, предназначенное для отпугивания насекомых (клещей).

РРН – регулятор развития насекомых.

$СД_{50(95,99)}$ ($ЛД_{50(95,99)}$) – доза инсектицида, вызывающая гибель 50 (95, 99)% членистоногих в эксперименте.

$СК_{50(95,99)}$ ($ЛК_{50(95,99)}$) – концентрация инсектицида, вызывающая гибель 50 (95, 99)% членистоногих в эксперименте.

Тест-членистоногое (биообъект) – вид насекомого (клеща), используемый в эксперименте.

Тест-поверхность – поверхность, обрабатываемая инсектоакарицидом (репеллентом, регулятором развития насекомых), используемая в эксперименте.

$ТН_{cp}$ – среднее время наступления состояния нокдауна у членистоногих (мин.).

Литература

1. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов, используемых в медицинской дезинсекции. Методические указания. МУ 3.5.2.1759-03 / утв. главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003.
2. Непоклонов А. А., Таланов Г. А. О методах учета эффективности применения инсектицидов для борьбы с подкожными оводами // Ветеринария. 1966. № 3. С. 58–60.
3. Непоклонов А. А., Таланов Г. А. Методические указания по испытанию инсектицидов, предназначенных для борьбы с эктопаразитами животных. М.: ВАСХНИЛ, 1973. 48 с.
4. Павлов С. Д. Методические рекомендации по изучению эффективности репеллентов и инсектицидов в ветеринарии. М.: ВАСХНИЛ, 1982. 13 с.
5. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit // Guideline on good clinical practices. CVMP/VICH/595/98-FINAL London, 4 July 2000.

References

1. Metody opredeleniya effektivnosti insektitsidov, akaritsidov, regulyatorov razvitiya i repellentov, ispol'zuyemykh v meditsinskoj dezinseksii [Methods for determining the efficacy of insecticides, acaricides, development regulators and repellents used in medical pest control]. Metodicheskiye ukazaniya. MU 3.5.2.1759-03 / utv. glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 28.09.2003. (In Russ.).
2. Nepoklonov A. A., Talanov G. A. On methods of accounting for the efficacy of insecticides for the control of hypodermic gadflies. *Veterinariya = Veterinary*. 1966; (3):58–60 (In Russ.).
3. Nepoklonov A. A., Talanov G. A. Metodicheskiye ukazaniya po ispytaniyu insektitsidov, prednaznachennykh dlya bor'by s ektoparazitami zhivotnykh [Methodical guidelines for testing insecticides intended for controlling ectoparasites of animals]. M.: VASKHNIL, 1973. 48 p. (In Russ.).
4. Pavlov S. D. Metodicheskiye rekomendatsii po izucheniyu effektivnosti repellentov i insektitsidov v veterinarii [Methodical recommendations for studying the efficacy of insecticides and repellents in veterinary medicine]. M.: VASKHNIL, 1982. 13 p. (In Russ.).
5. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit // Guideline on good clinical practices. CVMP/VICH/595/98-FINAL London, 4 July 2000.