

Оценка эффективности препарата имидаклоприд 10 %/моксидектин 2,5 % для спот-он нанесения (Адвокат®) в отношении взрослых особей *Dirofilaria repens* у экспериментально зараженных собак

Габриэле Петри (Gabriele Petry)¹ ✉, Марко Генки (Marco Genchi)², Хольгер Шмидт (Holger Schmidt)³, Роланд Шапер (Roland Schaper)¹, Беттина Лоренц (Bettina Lawrenz)⁴, Клаудио Генки (Claudio Genchi)²

¹ Bayer Animal Health GmbH, 51381 г. Леверкузен, Германия

² Миланский университет, 20133 г. Милан, Италия

³ BioMedVet Research GmbH, 29664 г. Вальсроде, Германия

⁴ Bayer Pharma AG, 42096 г. Вупперталь, Германия

Автор, ответственный за корреспонденцию:

Габриэле Петри (Gabriele Petry)

✉ E-mail: gabriele.petry@bayer.com

Резюме

Целью данного слепого плацебо-контролируемого рандомизированного лабораторного исследования была оценка эффективности препарата имидаклоприд 10 %/моксидектин 2,5 % для спот-он нанесения (Адвокат®, «Байер») в отношении взрослых особей *Dirofilaria repens*. Каждая из 24 собак породы бигль была экспериментально заражена в день исследования (ДИ) 0 примерно 75 инфицирующими личинками *D. repens*. Лечение было начато на 228-й день исследования у 21 собаки после подтверждения патентного периода заболевания с использованием модифицированного теста Кнотта. 11 собак в течение 6 месяцев ежемесячно обрабатывали имидаклопридом и моксидектином в минимальной терапевтической дозе (10 мг/кг имидаклоприда и 2,5 мг/кг моксидектина), 12 контрольных собак получали плацебо.

Примерно через месяц после последней обработки всех собак проводили контрольную оценку с целью обнаружения гельминтов *D. repens*. У 11 контрольных собак обнаружены живые взрослые особи *D. repens* (диапазон — 2–11, геометрическое среднее значение — 5,44). У восьми из 11 собак, обработанных препаратом имидаклоприд и моксидектин, живые гельминты не обнаружены. Число живых гельминтов сократилось на 96,2 % (диапазон — 0–1, геометрическое среднее значение — 0,21). Большая часть погибших гельминтов была инкапсулирована и подверглась дегенерации. После первой обработки результаты теста Кнотта были отрицательными у всех собак, обработанных препаратом имидаклоприд и моксидектин; у десяти собак данный статус сохранялся до окончания исследования. У одной собаки в четырех исследованиях было обнаружено небольшое число микрофилярий (1 и 4/мл), однако перед контролем результат теста был отрицательным. Обработка препаратом хорошо переносилась всеми участво-

вавшими в исследовании животными. По результатам исследования был сделан вывод об эффективности и безопасности шестикратной ежемесячной обработки препаратом имидаклоприд/моксидектин для спот-он нанесения в отношении взрослых особей *D. repens*, которая представляет собой вариант профилактики дальнейшего зоонотического распространения этого паразита.

Введение

В последние годы дирофиляриоз человека рассматривается как быстро распространяющийся в Европе зооноз (Genchi и соавт. 2011). Большая часть случаев этого заболевания у человека вызываются *Dirofilaria repens*, переносимой комарами нематодой филярией, вызывающей подкожный дирофиляриоз у собак, кошек и диких представителей псовых (Simon и соавт. 2012). Показано не только увеличение частоты заболеваемости в хорошо известных эндемичных районах южной Европы, но и распространение болезни в направлении северных и восточных районов, где инфекция не встречалась ранее (Genchi и соавт. 2011, TasicOtasevic и соавт. 2015). Недавно Таппе (Tappe) и соавт. (2014) описали первый автохтонный случай заболевания человека в Германии после серии случаев у собак в предыдущие года, указывавших на присутствие в регионе *D. repens* (Hermosilla и соавт. 2006, Pantchev и соавт. 2009, Sassnau и соавт. 2009). Так как паразит поэтому был многократно обнаружен у местной популяции комаров в Германии, предполагается стабильная местная передача возбудителя (Czajka и соавт. 2014; Kronefeld и соавт. 2014).

Взрослые особи *D. repens* существуют и спариваются в основном в подкожной ткани и мышечных фасциях, и самки гельминтов выделяют потомство, микрофилярии (МФ), в кровь. Попадая при кормлении комаров кровью в их организм, микрофилярии развиваются до инвазионных личинок третьей стадии (L3) и затем передаются следующему хозяину во время следующего питания комаром кровью (Webber и Hawking 1955). Собаки представляют собой основной резервуар, и, следовательно, единственным эффективным способом защиты человека от заболевания является контроль инфекции у собак (Genchi и соавт. 2010). Сложности в воплощении этого подхода на практике возникают из-за того, что заболевание часто протекает у собак

бессимптомно или возникающие симптомы, такие как зуд, кожные отеки, гиперпигментация или образование подкожных узелков, интерпретируются неверно. Кроме того, варианты применения препаратов против *D. repens* у собак ограничены из-за отсутствия средств, воздействующих на взрослые особи паразитов.

Использование макроциклических лактонов, предотвращающих, в соответствии с инструкцией по применению, дирофиляриоз и применяемых в более высоких дозах для уничтожения микрофилярий *Dirofilaria immitis* у собак, дает различные результаты против *D. repens*. В полевых исследованиях ивермектин в рекомендованных для профилактики дирофиляриоза дозах эффективно предотвращал патентную инвазию *D. repens* при применении в течение 30 дней после начала сезона передачи возбудителя (Magconcini и соавт. 1993; Pollono и соавт. 1998). В некоторых странах Европы ивермектин зарегистрирован для применения по данному показанию. Однако в исследованиях с экспериментальным четырехкратным заражением собак с интервалом в 15 дней, обработанных препаратом через 30 и 60 дней после первого заражения, эффективность ивермектина была неполной. Четырехкратная рекомендуемая доза для профилактики дирофиляриоза снижала гельминтную нагрузку на 87,9 % (Cancrini и соавт. 1989). Ежемесячные дозы ивермектина 6 мкг/кг были не настолько эффективны против микрофилярий *D. repens*, как против микрофилярий *D. immitis* (Venco и соавт. 2004). Саснау (Sassnau) и соавт. (2009) успешно лечили инфицированных микрофиляриями собак, еженедельно применяя 50 мкг/кг ивермектина в комбинации с доксициклином в течение 6 недель. Аналогичные результаты были получены Джанелли (Gianelli) и соавт. (2013) при применении доксициклина в течение 30 дней и низких доз ивермектина (6 мкг/кг) два раза в месяц в течение 6 месяцев. Показано, что применение доксициклина ослабляет или даже уничтожает филярий, уничтожая их эндосимбионтов (*Wolbachia*). Несмотря на то что пока не ясно, существует ли синергизм или лишь аддитивный эффект, комбинация доксициклин/ивермектин обладает значительно более высокой эффективностью против *D. immitis*, чем только ивермектин (Kramer и Genchi 2014).

Эффективность селамектина в рекомендованных дозах для профилактики дирофиляриоза была продемонстрирована в полевом исследовании (Genchi и соавт. 2002). При возникновении инфекции у 41% контрольных со-

бак все обработанные препаратом животные не были инфицированы по истечении сезона передачи возбудителя. Джаско (Jasco) и соавт. (2010) оценивали эффективность препарата против микрофилярий, обрабатывая зараженных естественным путем собак ежемесячно или два раза в месяц в течение 6 или 9 месяцев. В целом 65% собак были избавлены от микрофилярий. Описан один случай уничтожения микрофилярий при применении 0,4 мг/кг дорамектина через 5 дней после лечения меларсомином (Baneth и соавт. 2002).

Способность применяемого перорально мильбемицина оксима предотвращать инфекцию *D. repens* была исследована в одном полевом исследовании. В крови ни одной из собак, ежемесячно обрабатываемых рекомендованными дозами препарата, не были обнаружены микрофилярии, в то время как у шести из 114 контрольных собак возникла инвазия. Все собаки с положительным результатом исследования на присутствие микрофилярий были успешно пролечены мильбемицина оксимом, однако протокол лечения не был описан (Di Cesare и соавт. 2014). В полевых исследованиях продемонстрирована профилактическая эффективность препаратов моксидектина для перорального применения и для инъекций против *D. repens* (Rossi и соавт. 2002, 2004), а эффективность раствора для инъекций с пролонгированным высвобождением была подтверждена у экспериментально зараженных собак (Genchi и соавт. 2010). В некоторых странах Европы препарат лицензирован для профилактики поражений кожи и дерматита, вызываемых *D. repens*. Профилактическая эффективность моксидектина, применяемого в составе препарата имидаклоприд/моксидектин для спот-он нанесения (Адвокат®/Адвантейдж® мульти, «Байер»), продемонстрирована в полевом исследовании (Traversa и соавт. 2013) и подтверждена результатами лабораторного исследования на собаках, зараженных экспериментально через 4 недели после однократной обработки при применении в минимальной терапевтической дозе. При контроле гельминты не были обнаружены ни у одной из обработанных препаратом собак (Genchi и соавт. 2013). Потенциальная способность препарата для точечного нанесения уничтожать микрофилярии исследовалась различными авторами. В исследовании Траверса (Traversa) и соавт. (2011) однократное применение уничтожало микрофилярий у всех 18 обработанных собак. У 16 собак на протяжении периода наблюдения продолжительностью от 5 до 6 месяцев после применения препарата микрофилярии отсутствовали.

У двух собак наблюдалась рецидивирующая микрофиляриемия через 2 и 3 месяца после обработки соответственно. В другом полевом исследовании у всех 18 обработанных препаратом собак после первой обработки не отмечалось микрофиляриемии, при этом микрофилярии не обнаруживались на протяжении периода наблюдения продолжительностью от 3 до 4 месяцев после применения препарата (Hellmann и соавт. 2011). Фок (Fok) и соавт. (2010) оценили различные протоколы обработки животных, включающие многократное применение препарата, т.е. один раз в месяц в течение 3 или 6 месяцев или каждые 2 недели в течение 6 месяцев. У 38 из 44 обработанных препаратом собак через 2 недели после первой обработки микрофилярии отсутствовали, а через месяц только у одной собаки была выявлена низкая микрофиляриемия. После второй обработки микрофилярии отсутствовали в крови собак, а рецидивы микрофиляриемии не обнаруживались на протяжении периода наблюдения продолжительностью 6 месяцев после последнего применения препарата. Аналогичные результаты получены Параном (Paran) и соавт. (2011) при четырех последовательных ежемесячных обработках животных. После первой обработки микрофилярии *D. repens* отсутствовали у всех 11 собак, и это состояние также сохранялось в течение 6 месяцев после последнего применения препарата. В Европейском Союзе имидаклоприд/моксидектин для спот-он нанесения зарегистрирован для применения для профилактики кожного диروفилариоза и сокращения числа микрофилярий *D. repens*.

В настоящее время в продаже отсутствуют препараты с активностью против взрослых особей *D. repens*. Удаление взрослых гельминтов хирургическим путем проводится при их локализации в подкожных узелках, но не в глубоких тканях или даже висцеральных полостях тела. Кроме того, локализовать гельминтов под кожей может быть непросто, т.к. отмечается тенденция паразитов к изменению местоположения. Единственным лицензированным активным средством против взрослых особей диروفиларий являлся меларсомин, препарат мышьяка, для достаточной эффективности которого требуется повторное внутримышечное введение. В то время как в некоторых случаях зарегистрировано применение меларсомина против паразитирующих в коже гельминтов (Baneth 2002), эффективность препарата против *D. repens* не была подтверждена в клинических исследованиях (Genchi, личная коммуникация).

Результаты исследований по оценке микрофилярицидных свойств имидаклоприда/моксидектина для спот-он нанесения продемонстрировали длительное подавление микрофиляриемии, что позволяет также предположить его способность уничтожать *D. repens* в стадии взрослых особей (Fok и соавт. 2010). Настоящее исследование было разработано для исследования данной гипотезы в контролируемых лабораторных условиях.

Материалы и методы

Исследование выполнялось как одноцентровое плацебо-контролируемое рандомизированное слепое исследование эффективности. Исследования проводили в соответствии с руководством Международного сотрудничества в области гармонизации технических требований для регистрации ветеринарных лекарственных препаратов (VICH 9) «Надлежащая клиническая практика» (июль 2001 г.) и рекомендациями, изложенными в руководстве VICH 7 «Эффективность противогельминтных средств: Особые требования» (декабрь 2000 г.), руководстве VICH 19 «Эффективность противогельминтных средств: Ресурсы рекомендации для собак» (июль 2002 г.) и руководство Всемирной ассоциации по развитию ветеринарной паразитологии (WAAVP) по оценке эффективности противогельминтных средств у собак и кошек (Jacobs и соавт. 1994). Поскольку данные руководства не содержат особых рекомендаций, относящихся к *D. repens*, протокол инфицирования был основан на научных знаниях и опыте предыдущих экспериментальных исследований. Надежность протокола инфицирования была подтверждена в исследованиях по профилактике экспериментальной инфекции *D. repens* у собак (Genchi и соавт. 2010, Genchi и соавт. 2013).

Исследуемые животные

В исследование были включены 24 специально разводимых бигля (12 самцов / 12 самок). Ко времени начала исследования возраст собак составлял 10 месяцев, масса тела — от 7 до 12,2 кг. Проведена окончательная оценка 23 собак. Собаки были вакцинированы соответственно возрасту против всех основных инфекционных заболеваний собак. Повторная вакцинация в ходе исследования не проводилась, чтобы избежать влияния на действие препарата. Применение лекарственных средств, которые могли бы повлиять на результаты ис-

следования, особенно макроциклических лактонов, не допускалось в течение не менее 3 месяцев до начала исследования. Заражению собак предшествовал период акклиматизации продолжительностью не менее 9 дней. Собак размещали в закрытых питомниках группами от трех до шести животных одного и того же пола. После первой обработки собак одной группы лечения размещали вместе за исключением 2 дней после каждой обработки, в течение которых всех собак размещали по отдельности, чтобы избежать перекрестного заражения собак. Собаки получали стандартный коммерческий корм для собак, вода предоставлялась в неограниченном количестве. Животные получали игрушки и жевательный материал для обогащения среды, имели ежедневный доступ на открытую площадку и периоды взаимодействия с человеком не менее одного раза в день. До начала патентного периода инвазии принимались защитные меры (нейлоновая ткань) по предотвращению миграции комаров в зону содержания животных. Содержание животных соответствовало «Рекомендациям Комиссии о принципах содержания животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, и ухода за ними» (Европейская комиссия, 2007/526/ЕС, 18 июня 2007 г.).

Результаты наблюдения за состоянием здоровья животных

Наблюдение за состоянием здоровья животных проводилось ежедневно, в начале периода акклиматизации, перед заражением и перед первым применением препарата выполнялось физикальное обследование. В исследование включали только здоровых собак. В дни применения препарата с целью выявления нежелательных явлений перед применением и примерно через 1, 4 и 24 часа после применения препаратов проводили клиническое обследование животных. Во все дни применения препарата определяли массу тела животных для расчета дозы, а также на протяжении всего исследования не реже, чем каждые 4 недели.

Экспериментальная инфекция

В день исследования (ДИ) 0 каждая собака была заражена примерно 75 инфицирующими личинками *D. repens* (L3). Инфекционный материал приготавливали, как описано ранее (Genchi и соавт. 2010). Вкратце, 4-дневные комары *Aedes aegypti* кормились кровью, собранной в Италии у собак с естественной инфекцией

D. repens. Гепаринизированную кровь держали в аппарате для питания комаров, комаров допускали для питания кровью на 60 минут. Через 28 дней, вскоре после экспериментального заражения, инфицирующие личинки третьей стадии собирали и держали в среде RPMI. Для каждой инфицирующей дозы, используя стеклянную пипетку, вручную отбирали около 75 личинок и переносили их в пробирки, содержащие 1,5 мл среды RPMI.

Распределение по группам и обработка препаратом

В ДИ 227 собак в случайном порядке распределяли на две группы, исходя из пола животных и наибольшего числа микрофилярий по результатам теста Кнотта, выполненного в период ДИ 164-220. После рандомизации каждая группа состояла из 12 собак с одинаковым распределением по полу. Собаки различных групп получали имидаклоприд (10 мг/кг) и моксидектин (2,5 мг/кг) в минимальной рекомендованной терапевтической дозе, что соответствовало 0,1 мл препарата для спот-он нанесения на 1 кг массы тела. В контрольной группе применяли раствор плацебо для спот-он нанесения в том же количестве, 0,1 мл, для имитации спот-он нанесения препарата моксидектина/имидаклоприда. Животные получили шесть последовательных обработок препаратом с 4-недельными интервалами (ДИ 228, 256, 284, 312, 340 и 368).

Три собаки, по-прежнему микрофилярия-негативные в ДИ 227, также были включены в фазу применения препарата и случайным образом распределены в группы исследования. Однако, независимо от распределения по группам, все микрофилярия-негативные собаки обрабатывались плацебо, т.е. в группе плацебо присутствовали две, а в группе имидаклоприда/моксидектина — одна микрофилярия-негативные собаки.

Отбор образцов крови

Для обнаружения в крови МФ *D. repens* использовали модифицированный тест Кнотта. Образцы крови собирали у всех 24 собак в конце дня (с 16:00 до 18:00). Для включения в исследование выполнялось требование отсутствия у собак *D. repens*. Возникновение патентной инфекции контролировали в ДИ 164, 178, 192 и 220 после заражения. После первой обработки течение микрофиляриемии ежемесячно контролировалось до окончания исследования (ДИ 256, 283, 311, 339, 367 и 395). Коли-

чество микрофилярий в крови определяли с помощью скрининга всего осадка или, при высокой плотности, путем подсчета репрезентативной выборки. Подтверждение принадлежности к биологическому виду выполняли с помощью анализа ПЦР (полимеразная цепная реакция). Использовали три пары праймеров: праймеры филярий (Rishniw и соавт. 2006) для обнаружения различных видов *Dirofilaria* (*D. repens*, *D. immitis*, *D. reconditum*), различных видов *Brugia* (*B. pahangi*, *B. malayi*, *B. timori*), а также *Acanthocheilonema dracunculoides* и *Onchocerca volvulus*, и пары праймеров, специфичных для *D. repens* и *D. immitis* (Favia и соавт. 2000; Hermosilla и соавт. 2006). В случае слабopоложительного результата ПЦР с праймерами филярий и отрицательного результата с *D. repens*-видоспецифичными праймерами, для подтверждения видовой принадлежности выполнялся анализ нуклеотидной последовательности.

Контроль

Через 35-36 дней после последней обработки препаратом (ДИ 403/404) собак подвергали эвтаназии. Визуально исследовали подкожную ткань и жир, мышечные фасции и мошонку на наличие взрослых особей и не достигших взрослого состояния *D. repens* и любых узелков, которые могли содержать гельминтов или их фрагменты. Затем проводили обследование брюшной и грудной полости на наличие гельминтов. Для определения живых (подвижных) и погибших (неподвижных) гельминтов проверяли подвижность паразитов. Кроме того, гельминтов и узелки изучали с помощью стереомикроскопа на наличие любых других характеристик и специфических признаков, таких как признаки дегенерации.

Определение эффективности препарата и статистический анализ

Достаточность инфекционной нагрузки определяли по руководствам VICH 7 и 19. В указанных руководствах требуется включение в контрольную группу не менее шести животных с не менее чем пятью гельминтами у каждого.

Эффективность определяли путем подсчета количества живых гельминтов у животных различных групп и рассчитывали в соответствии с руководством VICH 7 и руководством WAAVP по оценке эффективности противогельминтных средств у собак и кошек (Jacobs и соавт. 1994) следующим образом:

$$\text{Эффективность, \% (уменьшение)} = \frac{(N1 - N2)/N1 \times 100}{}$$

N1: среднее геометрическое (СГ) числа живых особей *D. repens* в контрольной группе
 N2: среднее геометрическое (СГ) числа живых особей *D. repens* в терапевтической группе

Из-за того, что в некоторых случаях количество гельминтов составляло 0, ко всем результатам подсчета перед логарифмической трансформацией добавили 1 и из антилогарифмического значения вычитали 1. Для исследования эффекта в группах лечения (имидаклоприд/моксидектин и плацебо) применяли непараметрический критерий суммы рангов Уилкоксона (двусторонний, $\alpha = 0,05$). Во все дни исследований оценивали число живых, погибших и общее число гельминтов, а также число микрофилярий. Анализ выполняли с использованием программного обеспечения SAS версия 8.2 (SAS Institute, Кэри, Северная Каролина, США, 2001 г.).

Результаты

Тест Кнотта и ПЦР

В ДИ 164 у 11 собак из 24 присутствовали микрофилярии. Это количество увеличилось до 21 в ДИ 220, и в день 228 было инициировано лечение. Две собаки без микрофилярий были отнесены к контрольной группе. У этих двух собак тест Кнотта дал положительный результат в день 256, при контроле показана достаточность инфекционной нагрузки. Соответственно, эти собаки были учтены при расчете эффективности. Третья «отрицательная» собака была отнесена к группе лечения для уравнивания числа собак в группах исследования. Однако эта собака получала раствор плацебо и, следовательно, не учитывалась при расчете эффективности. ПЦР-анализ 21 положительного образца в ДИ 220 выявил ДНК *D. repens* в 19 образцах. Для двух образцов со слабopоложительным результатом ПЦР с праймерами филярий и отрицательным результатом с *D. repens*-видоспецифичными праймерами видовая принадлежность была подтверждена анализом нуклеотидной последовательности. В двух образцах (собаки №№ 101 и 121) микрофиляриемия в ДИ 220 была слишком низка для определения ДНК.

После рандомизации между группами исследования отсутствовали статистически достоверные различия

средних геометрических значений числа микрофилярий до применения препарата. Через 4 недели после первого применения препарата у всех собак, обработанных имидаклопридом/моксидектином для спот-он нанесения, микрофилярии отсутствовали, и это состояние сохранялось до конца исследования, за исключением одной собаки с низким числом микрофилярий (4 и 1 МФ/мл) в ДИ 283-367. В контрольной группе в ДИ 256-339 у девяти из 12 собак обнаружены микрофилярии. У двух собак с низкой микрофиляриемией (идентификационные номера 105 и 109) при двух последних оценках получен отрицательный результат. У одной собаки (идентификационный номер 121) с положительным результатом теста Кнотта в период между ДИ 178 и 220 на протяжении последующего периода получены отрицательные результаты. Во все дни оценки, проводившейся после обработки животных, различия между группой лечения и контрольной группой были статистически достоверны (Таблица 1).

Оценка эффективности

Из-за исключения одной собаки из исследования были оценены 12 собак контрольной группы и 11 собак группы лечения. У девяти из 12 контрольных собак при контроле обнаружены по пять или более живых гельминтов (рис. 1). Таким образом, требования к достаточности инфекционной нагрузки *D. repens* были выполнены. За исключением одной собаки (идентификационный номер 105), живые особи *D. repens* были найдены у всех контрольных животных (диапазон 2-11). У восьми из 11 собак, обработанных препаратом имидаклоприд/моксидектин для спот-он нанесения, живые гельминты при контроле отсутствовали. У каждого из остальных трех животных было обнаружено по одной живой самке *D. repens*. Исходя из среднего геометрического числа живых паразитов, эффективность составила 96,2 % ($p < 0,0001$).

Число погибших гельминтов варьировало от 0 до 4 (среднее геометрическое 1,41) в контрольной группе и от 2 до 16 (среднее геометрическое 5,94) в группе лечения. Существовало статистически достоверное различие между исследованными группами, при этом у обработанных препаратом собак обнаружено достоверно большее число погибших гельминтов ($p = 0,0013$). Большая часть погибших гельминтов была инкапсулирована, подверглась дегенерации или и то, и другое (рис. 2 и 3). Гистопатологическое исследование подкож-

Таблица 1 Число микрофилярий у отдельных собак различных групп исследования до и после применения препарата

Группа	Идент. номер собаки	ДИ 164	ДИ 178	ДИ 192	ДИ 220	ДИ 256	ДИ 283	ДИ 311	ДИ 339	ДИ 367	ДИ 395
Адвокат®	101	0	2	6	2	0	0	0	0	0	0
	102	16	122	370	340	0	0	0	0	0	0
	103	4	33	660	2810	0	0	0	0	0	0
	106	0	0	4	35	0	0	0	0	0	0
	110	2	30	30	32	0	0	0	0	0	0
	112	2	16	45	83	0	0	0	0	0	0
	115	0	23	500	440	0	0	0	0	0	0
	117	0	89	910	4170	0	0	0	0	0	0
	119	0	0	310	420	0	0	0	0	0	0
	122	107	510	3710	6100	0	0	0	0	0	0
	123	5	99	810	1320	0	4	1	1	1	0
Среднее геометрическое значение		2,29	21,45	175,66	299,30	0,00	0,16	0,07	0,07	0,07	0,00
Плацидо	104	2	6	25	62	229	1540	1080	610	1400	140
	105	0	0	7	10	3	3	7	1	0	0
	107	0	11	66	123	43	544	1150	250	740	770
	108	9	117	630	2420	2370	4930	4800	1000	2800	1500
	109	0	0	0	0	4	54	40	1	0	0
	113	6	31	2630	2700	271	6040	2100	2050	3100	5200
	114	0	4	3	76	18	507	960	520	60	580
	116	9	195	800	910	55	740	570	600	110	65
	118	0	23	310	1100	279	3450	2100	700	560	490
	120	2	126	1620	3020	145	9050	9600	2100	1500	270
	121	0	34	350	2	0	0	0	0	0	0
	124	0	0	0	0	6	71	354	1540	450	5880
Среднее геометрическое значение		1,07	12,39	68,69	91,52	41,98	358,50	397,78	175,19	128,95	129,97
Значение p		0,5468	0,6600	0,4219	0,3551	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0006	0,0003

ных узелков выявило признаки воспаления и капсулы/отграничения, содержащие структуры вероятностного паразитического происхождения или идентифицированные как гельминты. В некоторой степени присутствовала минерализация (рис. 4 и 5). Общее число гельминтов (живых + погибших) варьировало от 2 до 14 (среднее геометрическое 7,72) в контрольной группе и от 2 до 16 (среднее геометрическое 6,25) в группе лечения. Статистически достоверные различия общего числа гельминтов в исследованных группах отсутствовали ($p = 0,5127$) (таблица 2).

Большая часть гельминтов была обнаружена в подкожной ткани. У пяти контрольных животных обнаружены в общей сложности 8 живых и 1 погибший гельминт в висцеральных полостях тела. 6 гельминтов обнаруже-

ны в брюшной полости, 3 — в грудной полости. Один погибший гельминт обнаружен в брюшной полости собаки, обработавшейся препаратом.

Результаты наблюдения за состоянием здоровья животных

Спот-он нанесение имидаклоприда/моксидектина хорошо переносилось всеми собаками. Клинические симптомы непереносимости не наблюдались. Животные всей исследуемой популяции оставались клинически здоровыми на протяжении всего периода исследования. У отдельных животных в отдельных случаях наблюдались незначительные проявления, такие как царапины или раны от укуса, слюнотечение и рвота. Мягкие или твердые узелки или частично утолщенная кожа были



Рис. 1 Живая взрослая особь *D. repens* в брюшной полости на серозной оболочке



Рис. 2 Погибшая взрослая особь *D. repens* в капсуле на мышечной фасции, после удаления кожи. Правая половина капсулы была разрезана.



Рис. 3 Останки погибшей взрослой особи *D. repens* на мышечной фасции, после удаления кожи.

отмечены не менее одного раза у пяти обработанных препаратом собак и двух контрольных животных. Данные признаки впервые наблюдались в ДИ 164. После применения препарата частота этих признаков несколько возросла в группе лечения препаратом имидаклоприд/моксидектин. При окончании исследования эти признаки присутствовали у одного контрольного животного и отсутствовали у обрабатывавшихся препаратом собак.

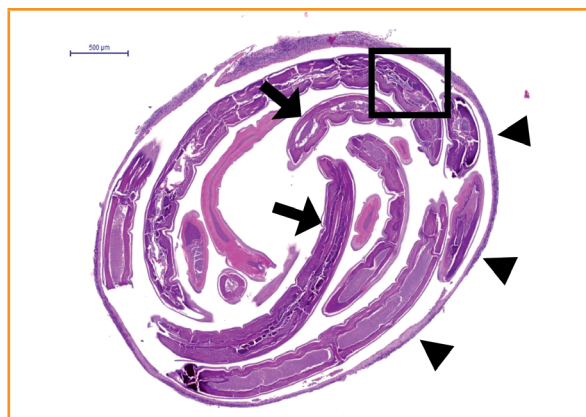


Рис. 4 Микрофотография окрашенной гематоксилин-эозином погибшей взрослой особи *D. repens* в капсуле. Треугольные стрелки указывают на тонкую, несколько воспаленную капсулу из соединительной ткани, окружающую гельминта. Стрелки указывают срезы гельминтов. Рамкой обозначен участок, показанный на рис. 5 (шкала 500 мкм)

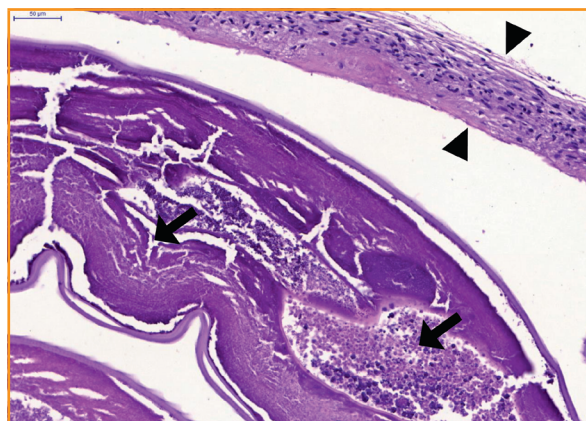


Рис. 5 Микрофотография окрашенной гематоксилин-эозином погибшей взрослой особи *D. repens* в капсуле (увеличение рис. 4). Треугольные стрелки указывают на несколько воспаленную капсулу из соединительной ткани. Стрелки указывают на дегенерирующие внутренние структуры гельминта с начинающейся минерализацией (шкала 50 мкм)

Таблица 2 Число *D. repens* у отдельных собак

Идент. номер собаки	Живые особи D. repens					Погибшие особи D. repens					Живые + погибшие	
	самец	самка	НО	сумма	геом. среднее/ эффектив- ность	самец	самка	НО	сумма	геомет- рическое среднее	сумма	геомет- рическое среднее
Имидаклоприд/моксидектин												
101	0	0	0	0	0,21/ 96,2 %	0	0	8 ^a /8 ^c	16	5,94	16	6,25
102	0	0	0	0		6 ^a	7 ^a	0	13		13	
103	0	1	0	1		0	0	3 ^c	3		4	
106	0	0	0	0		0	2 ^a	0	2		2	
110	0	0	0	0		0	0	1 ^a /8 ^c	9		9	
112	0	0	0	0		0	0	1/2 ^a /1 ^c	4		4	
115	0	0	0	0		0	0	1 ^a /3 ^c	4		4	
117	0	0	0	0		0	0	1 ^a /1 ^c	2		2	
119	0	1	0	1		0	0	3 ^a /2 ^c	5		6	
122	0	1	0	1		0	0	1/3 ^a /1 ^b /4 ^c	9		10	
123	0	0	0	0		0	0	2/9 ^a /1 ^b /1 ^c	13		13	
Плацебо												
104	4	6	0	10	5,44	0	0	1 ^c	1	1,41	11	7,72
105	0	0	0	0		0	2 ^a	0	2		2	
107	3	3	0	6		0	0	3 ^c	3		9	
108	2	9	0	11		0	0	0	0		11	
109	3	5	2	10		0	0	1/3 ^c	4		14	
113	2	4	0	6		0	0	0	0		6	
114	1	1	0	2		0	0	3 ^c	3		5	
116	2	3	0	5		0	4 ^a	0	4		9	
118	2	1	1	4		0	0	1 ^c	1		5	
120	0	10	0	10		0	0	0	0		10	
121	3	5	0	8		0	1 ^a	2 ^a	3		11	
124	2	5	0	7		0	0	1 ^c	1		8	

НО = пол неопределяем; ^a инкапсулированная; ^b подвергшаяся дегенерации; ^c инкапсулированная+подвергшаяся дегенерации

Обсуждение

В данном исследовании продемонстрирована эффективность препарата имидаклоприд/моксидектин для спот-он нанесения (Адвокат®, «Байер») против взрослых особей *D. repens* при шестикратном последовательном ежемесячном применении у экспериментально инфицированных собак. Достаточность инфекции животных контрольной группы доказала надежность модели инфицирования, а заболеваемость была в пределах диапазонов, отмеченных ранее для этой дозы инфицирования (Genchi и соавт. 2010; Genchi и соавт. 2013.), патентный период инфекции возник ранее, чем ожидалось. Согласно опубликованным данным, препатентный период *D. repens* составляет 27-34 недели

(Manfredi и соавт. 2007). Веббер (Webber) и Хоукин (Hawking) (1955) идентифицировали первые положительные образцы крови через 25 недель после заражения. В реальном исследовании, однако, образцы 11 собак уже были положительны через 23 недели после заражения.

Из-за отсутствия данных в литературе не было ясно, какую картину следует ожидать и в каком виде будут присутствовать взрослые особи *D. repens*, погибшие под действием антигельминтного препарата. Стало очевидно, что большая часть погибших гельминтов инкапсулирована или подверглась дегенерации или и то, и другое. Достигнутая эффективность 96,2%, таким образом, основана на «числе живых гельминтов». Различия общего числа гельминтов (живые + погибшие) в группах

исследования были статистически недостоверны, что указывало на аналогичную степень исходной инфекции в группах до начала применения препарата. Ежемесячная обработка препаратом хорошо переносилась всеми собаками. Более высокую частоту образования мягких или твердых узелков в коже/под кожей в группе применения имидаклоприда/моксидектина можно объяснить тем, что погибающие гельминты, как правило, сворачиваются в клубок (рис. 2 и 3) и что эти «кластеры гельминтов» затем отграничиваются от прилежащих тканей и образуют области типичного гранулематозного воспаления (рис. 4 и 5). Эти структуры идентифицируются при контроле, однако у животных группы применения препарата становятся слишком мягкими и слишком мелкими для обнаружения во время клинического ветеринарного обследования.

В предыдущих исследованиях по оценке микрофилярицидной эффективности имидаклоприда/моксидектина для спот-он нанесения против *D. repens* было выдвинуто предположение о том, что многократное применение препарата также может быть эффективным против взрослых особей гельминтов (Fok и соавт. 2010). Однако эти предположения были сделаны на основании устойчивого отсутствия микрофилярий и/или исчезновения клинических симптомов. Насколько нам известно, это первое исследование, демонстрирующее эффективность антигельминтного препарата против *D. repens* при контроле животных. Данное исследование было необходимо, т.к. не существует других исследований, позволяющих обнаружить присутствие или отсутствие взрослых особей, паразитирующих в коже гельминтов, а исследование на наличие микрофилярий не обеспечивает надежных данных, т.к. неполовозрелые или бесполое гельминты не обнаруживаются. И, наконец, исчезновение микрофилярий не является мерой эффективности препарата против половозрелых гельминтов. Показано, что микрофилярии *D. immitis* могут вновь появиться даже по прошествии длительного времени после отмены макроциклических лактонов (пересмотрено Bowman и Mannella 2011). В действительности, это наблюдение также было сделано в исследовании по оценке эффективности однократного применения препарата имидаклоприд/моксидектин для спот-он нанесения для уничтожения микрофилярий *D. repens*. После получения отрицательных результатов для всех животных через 2 и 3 месяца после применения препарата

в крови двух собак были обнаружены микрофилярии (Traversa и соавт. 2011).

Интенсивно изучалась эффективность макроциклических лактонов, особенно ивермектина, против взрослых гельминтов у филярий при дирофиляриозе (см. резюме: McCall 2005). В то время как эффективно уничтожаются личиночные стадии (L3/L4) гельминтов, для устранения не достигших половой зрелости и взрослых паразитов необходимо длительное применение препарата, и чем старше гельминт при первом воздействии макроциклических лактонов, тем больше времени требуется для его уничтожения. Для обеспечения эффективности не менее 95% требуется применение профилактических доз ивермектина (6 мкг/кг) до одного года в случае личинок в возрасте 3 месяцев и ежемесячное применение препарата в течение 2,5 лет в случае половозрелых взрослых особей гельминтов. Более высокие дозы ивермектина (200 мкг/кг) и менее продолжительное лечение не способствовали значительному повышению эффективности (McCall 2005). Этот так называемый метод «медленного уничтожения» не рекомендуется при дирофиляриозе, т.к. инфекция сохраняется в течение длительного периода, а патология прогрессирует. Кроме того, существуют опасения относительно того, что терапия только ивермектином потенциально способствует образованию резистентных субпопуляций дирофилярий (Симпозиум Американского общества по изучению дирофиляриоза (AHS), 2014).

Действие препарата имидаклоприд/моксидектин для точечного нанесения против взрослых дирофилярий не исследовалось в контексте исследования эффективности. Но, поскольку препарат зарегистрирован для обработки животных против микрофилярий *D. immitis*, аспект эффективности против взрослых особей изучался в целевых исследованиях безопасности на животных при использовании передозировки у собак с существующим дирофиляриозом. Лабораторные исследования с трехкратным использованием с 2-недельным интервалом доз, до 5 раз превышающих рекомендованные (до 13,6 раз превышающие минимальную терапевтическую дозу), продемонстрировали отсутствие достоверных различий в числе взрослых гельминтов, собранных при контроле, у обработанных препаратом собак по сравнению с контрольной группой животных, получавших плацебо (EMA 2009).

В отличие от *D. immitis*, результаты представленного здесь исследования продемонстрировали высокую

эффективность раствора имидаклоприда/моксидектина для точечного нанесения против взрослых особей *D. repens*. Помимо возможных различий восприимчивости двух видов к моксидектину, это, вероятно, можно объяснить двумя непосредственно связанными фактами: локализацией взрослых гельминтов в организме и фармакокинетическим профилем моксидектина. В то время как взрослые особи *D. immitis* обитают в крови правой части сердца и легочной артерии, *D. repens* в основном мигрируют в подкожную ткань. Моксидектин значительно распределяется в тканях и благодаря своей липофильности в основном депонируется в жировой ткани (Vanapalli и соавт. 2002). Таким образом, жировая ткань может выступать резервуаром препарата, обеспечивая длительное присутствие моксидектина в организме. По сравнению с ивермектином и дорамектином, моксидектин обладает наибольшим периодом полувыведения (19 дней у собак) (Vanapalli и соавт. 2002). *Dirofilaria repens*, обитающая в богатой жиром ткани, таким образом, подвергается длительному воздействию высоких доз моксидектина, что может объяснить сильный эффект в отношении уничтожения паразитов, продемонстрированный в этом исследовании. Кроме того, показано, что непрерывное ежемесячное применение препарата ведет к постоянно высокому уровню содержания препарата в сыворотке крови и ткани, что объясняет далеко идущие возможности препарата в отношении контроля существования паразитов в отдельных тканях, например, обитающих в коже клещей *Demodex* (Paterson и соавт. 2014) и легочных нематод (Conboy и соавт. 2009).

В отличие от классических средств профилактики диروفилариоза, результаты данного и многих других более ранних исследований продемонстрировали высокую эффективность препарата имидаклоприда/моксидектина для точечного нанесения против микрофилярий. Во многих случаях препарат уничтожал микрофилярий у собак после однократного применения. Раствор для местного применения был исходно разработан как антигельминтное средство против обитающих в желудочно-кишечном тракте нематод широкого спектра действия. По сравнению с личинками *D. immitis* и *D. repens* третьей и четвертой стадии, для эффективного

уничтожения этих эндопаразитов требуются значительно более высокие дозы макроциклических лактонов. Следовательно, рекомендованная минимальная доза во много раз выше, чем 3 мкг/кг моксидектина или 6 мкг/кг ивермектина, обеспечиваемые классическими препаратами для профилактики диروفилариоза.

Можно сделать вывод о том, что применение препарата имидаклоприда/моксидектина для точечного нанесения в течение 6 последовательных месяцев безопасно и эффективно у собак против взрослых особей *D. repens*. Вместе с новыми результатами настоящего исследования препарат для точечного нанесения предоставляет полный вариант контроля подкожного диروفилариоза, включая профилактику, устранение микрофилярий и гельминтов взрослых стадий развития. Точечное нанесение является удобным методом применения, и, следовательно, препарат имеет потенциал для способствования соблюдению владельцами собак стандартов защиты животных в эндемичных районах и лечения собак, зараженных *D. repens*, даже при бессимптомной инфекции. Устранение паразита из резервуара имеет огромное значение для предотвращения дальнейшего распространения заболевания и защиты как животных, так и человека от заражения.

Этические стандарты

Исследование проведено в соответствии с действующим национальным законодательством и регламентами.

Финансирование исследования

Исследование проведено при финансовой поддержке компании «Байер Энимал Хелс ГмбХ» (Bayer Animal Health GmbH), Германия.

Конфликт интересов

Во время проведения исследования Клаудио Генки (Claudio Genchi) и Марко Генки (Marco Genchi) являлись сотрудниками Миланского университета. Габриэле Петри (Gabriele Petry) и Роланд Шапер (Roland Schaper) являются сотрудниками компании Bayer Animal Health GmbH. Беттина Лоренц (Bettina Lawrenz) является сотрудником компании Bayer Pharma AG. Хольгер Шмидт (Holger Schmidt) является владельцем компании BioMedVet Research GmbH.

Литература

- AHS: American Heartworm Society (2014) Current canine guidelines for the prevention, diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs, revised July 2014. American Heartworm Society. <http://www.heartwormsociety.org>. Accessed 20 February 2015
- Baneth G, Volansky Z, Anug Y, Favia G, Bain O, Goldstein RE, Harrus S (2002) *Dirofilaria repens* infection in a dog: diagnosis and treatment with melarsomine and doramectin. *Vet Parasitol* 105:173–178
- Bowman DD, Mannella C (2011) Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Top Companion Anim Med* 26:160–172
- Cancrini G, Tassi P, Coluzzi M (1989) Ivermectin against larval stages of *Dirofilaria repens* in dogs. *Parassitologia* 31:177–182
- Conboy G, Hare J, Charles S, Settje T, Heine J (2009) Efficacy of a single topical application of Advantage Multi® (= Advocate®) topical solution (10 % Imidacloprid + 2.5 % Moxidectin) in the treatment of dogs experimentally infected with *Crenosoma vulpis*. *Parasitol Res* 105:S49–S54
- Czajka C, Becker N, Jöst H, Poppert S, Schmidt-Chanasit J, Krüger A, Tannich E (2014) Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 20:328–331
- Di Cesare A, Braun G, Di Giulio E, Paoletti B, Aquilino V, Bartolini R, La Torre F, Meloni S, Drake J, Pandolfi F, Avolio S, Traversa D (2014) Field clinical study evaluating the efficacy and safety of an oral formulation containing milbemycin oxime/praziquantel (Milbemax®, Novartis Animal Health) in the chemoprevention of the zoonotic canine infection by *Dirofilaria repens*. *Parasit Vectors* doi: 10.1186/1756–3305–7–347
- EMA (2009) Scientific discussion: Advocate. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/veterinary/000076/WC500060915.pdf. Accessed 20 February 2015
- Favia G, Cancrini G, Ricci I, Bazzocchi C, Magi M, Pietrobelli M, Genchi C, Bandi C (2000) 5 S ribosomal spacer sequences of some filarial parasites: comparative analysis and diagnostic applications. *Mol Cell Probes* 14:285–290
- Fok E, Jacsó O, Szebeni Z, Gyorffy A, Sükösd L, Lukács Z, Schaper R (2010) Elimination of *Dirofilaria* (syn. *Nochtiella*) *repens* microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5 %/imidacloprid 10 % (Advocate, Bayer) spot-on. *Parasitol Res* 106:1141–1149
- Genchi C, Genchi M, Petry G, Kruedewagen EM, Schaper R (2013) Evaluation of the efficacy of imidacloprid 10 % / moxidectin 2.5 % (Advocate®, Advantage® Multi, Bayer) for the prevention of *Dirofilaria repens* infection in dogs. *Parasitol Res* 112 Suppl 1:81–89
- Genchi C, Kramer LH, Rivasi F (2011) Dirofilarial infections in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1307–1317
- Genchi M, Pengo G, Genchi C (2010) Efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of subcutaneous filarial (*Dirofilaria repens*) infection in dogs. *Vet Parasitol* 170:167–169
- Genchi C, Poglayen G, Kramer L, Casiraghi M, Venco L, Brianti E (2002) Efficacia di selamectin nella profilassi delle infestazioni da *Dirofilaria repens* del cane. *Veterinaria* 16:69–71
- Giannelli A, Ramos RA, Traversa D, Brianti E, Annoscia G, Bastelli F, Dantas-Torres F, Otranto D (2013) Treatment of *Dirofilaria repens* microfilariaemia with a combination of doxycycline hyclate and ivermectin. *Vet Parasitol* 197:702–704
- Hellmann K, Heine J, Braun G, Paran-Dobesova R, Svoboda V (2011) Evaluation of the therapeutic and preventive efficacy of 2.5 % moxidectin / 10 % imidacloprid (Advocate®, Bayer animal health) in dogs naturally infected or at risk of natural infection by *Dirofilaria repens*. *Parasitol Res* 109 Suppl 1:S77–86
- Hermosilla C, Pantchev N, Dyachenko V, Gutmann M, Bauer C (2006) First autochthonous case of canine ocular *Dirofilaria repens* infection in Germany. *Vet Rec* 158:134–135
- Jacobs DE, Arakawa A, Courtney CH, Gemmell MA, McCall JW, Myers GH, Vanparijs O (1994) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics for dogs and cats. *Vet Parasitol* 52:179–202
- Jacsó O, Fok E, Kiss G, Kökény G, Lang Z (2010) Preliminary findings on the efficacy of selamectin in the treatment of dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. *Acta Vet Hung* 58:405–412
- Kramer L, Genchi C (2014) Where are we with Wolbachia and doxycycline: an in-depth review of the current state of our knowledge. *Vet Parasitol* 206:1–4
- Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R, Werner D (2014) Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasit Vectors* 7:30. doi: 10.1186/1756–3305–7–30
- Manfredi MT, Di Cerbo A, Genchi M (2007) Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (ed) *Mappe parassitologiche 8: Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, 1st edn., Naples, pp. 41–45

- Marconcini A, Magi M, Contin BH (1993) Efficacy of ivermectin in preventing *Dirofilaria repens* infestation in dogs naturally exposed to contagion. *Parassitologia* 35:67–71
- McCall JW (2005) The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Vet Parasitol* 133:197–206
- McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L (2008) Heartworm disease in animals and humans. *Adv Parasitol* 66:193–285
- Pantchev N, Norden N, Lorentzen L, Rossi M, Rossi U, Brand B, Dyachenko V (2009) Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitol Res* 105 Suppl 1:S63–74
- Paran RD, Svobodová V (2011) Effect of therapy by using advocate spot-on combination (imidacloprid 10% and moxidectin 2.5%) on subcutaneous dirofilariosis in dogs. *Vet Med Int* doi: 10.4061/2011/482–746
- Paterson TE, Halliwell RE, Fields PJ, Louw ML, Ball G, Louw J, Pinckney R (2014) Canine generalized demodicosis treated with varying doses of a 2.5% moxidectin + 10% imidacloprid spot-on and oral ivermectin: Parasiticidal effects and long-term treatment outcomes. *Vet Parasitol* 205:687–696
- Pollono F, Pollmeier M, Rossi L (1998) The prevention of *Dirofilaria repens* infection with ivermectin/pyrantel chewables. *Parassitologia* 40:457–459
- Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Dominguez Alpizar JL (2006) Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 135:303–314
- Rossi L, Ferroglio, E, Agostini, A (2002) Use of moxidectin tablets in the control of canine subcutaneous dirofilariosis. *Vet Rec* 150:383
- Rossi L, Ferroglio, E, Agostini, A (2004) Use of an injectable, sustained release formulation of moxidectin to prevent canine subcutaneous dirofilariosis. *Vet Rec* 154:26–27
- Sassnau R, Dyachenko V, Pantchev N, Stöckel F, Dittmar K, Dauschies A (2009) *Dirofilaria repens* Befall in einem Schlittenhunde-Rudel im Land Brandenburg, Diagnose und Therapie der kaninen kutanen Dirofilariose. *Tieraerztl Praxis K* (2) 95–101
- Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA (2012) Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev* 25:507–544
- Tappe D, Plauth M, Bauer T, Muntau B, Dießel L, Tannich E, Herrmann-Trost P (2014) A case of autochthonous human *Dirofilaria* infection, Germany, March 2014. *Euro Surveill* 19:2–4
- Tasić-Otašević SA, Trenkić Božinović MS, Gabrielli SV, Genchi C (2015) Canine and human *Dirofilaria* infections in the Balkan Peninsula. *Vet Parasitol* 209:151–156
- Traversa D, Aste G, Di Cesare A, Paoletti B, Di Tommaso M, Di Giulio E, Pampurini F, Tunesi C, Boari A (2011) Efficacy of a single administration of a spot-on solution containing imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% in eliminating *Dirofilaria repens* microfilariae in naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 179:107–112
- Traversa D, Mazzi A, Di Cesare A, Famigli Bergamini P, Fracassi F, Fanini G, Aste G, Pampurini F, Boari A (2013) Potential efficacy of monthly administrations of spot-on moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% in the simultaneous prevention of major canine filarioses. *Parasitol Res* 112:3753–3756
- Vanapalli SR, Hung YP, Fleckenstein L, Dzimianski MT, McCall JW (2002) Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos* 23:263–272
- VICH Guideline 7: Efficacy of Anthelmintics: General Requirements. Veterinary International Cooperation on Harmonization, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, CVMP/VICH/832/99-corr, November 2000
- VICH Guideline 9: Good Clinical Practice. Veterinary International Cooperation on Harmonization, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, CVMP/VICH/595/98-Final, June 2000
- VICH Guideline 19: Efficacy of anthelmintics: Specific recommendations for canine. Veterinary International Cooperation on Harmonization, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, CVMP/VICH/835/99-Final, June 2001
- Venco L, McCall JW, Guerrero J, Genchi C (2004) Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. *Vet Parasitol* 124:259–268
- Webber WA, Hawking F (1955) Experimental maintenance of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* in dogs. *Exp Parasitol* 4:143–164

