

# Schopnost fipronilu zabránit přenosu zárodků *Borrelia burgdorferi*, původců lymfské choroby, na psy

Cílem předložené studie bylo ověření účinnosti fipronilu ve formě spreje a v kombinaci s (S)-methoprenem ve formě spot-on proti klíštěti *Ixodes scapularis* a v prevenci přenosu *Borrelia burgdorferi*.

## Úvod

Lymfská choroba se vyskytuje na celém území USA, s převahou některých regionů. K infekci psů zde dochází přenosem z klíštěte druhu *Ixodes scapularis*. Morbidita připisovaná borelióze je zpravidla zjišťována v endemických oblastech s vysokou prevalencí infekce s klinickými příznaky postižení končetin nebo kloubů, které se vyvíjejí zhruba u 5 – 10 % infikovaných psů.

Ochrana proti lymfské chorobě je založena na vakcinaci nebo prevenci před infestací klíštěty nebo alespoň na zkrácení délky uchycení na periodu kratší, než je potřebná pro přenos *B. burgdorferi*. I když byl přenos spirochet zjištěn již po 37 hodinách po přisátí klíštěte, nebyly tyto organismy schopné způsobit infekci. K infekci došlo, když byly mikroorganismy uvolněny 52 hodin a déle po uchycení klíštěte. Pro snížení rizika přenosu musí být klíštěta eliminována z hostitelského zvířete přibližně do 48 hodin po uchycení. Časový interval, během něhož dojde k usmrcení klíštěte na zvířeti ošetřeném akaricidním přípravkem, je tedy důležitým faktorem.

K ochraně proti blechám a klíšťatům jsou k dispozici tři formy fipronilu – 0,25% sprej, 10% spot on a kombinace 10% fipronilu a 9% (S)-methoprenu (růstového regulátoru hmyzu) rovněž v aplikační formě spot-on. Fipronil může být používán u štěňat a prokázal účinnost proti mnoha druhům klíšťat během 24 – 48 hodin, např. *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes holocyclus*, *Haemaphysalis* i *Boophi-*

*lus microplus*. U těchto druhů dosahuje účinnost minimálně jednoho měsíce po ošetření. Cílem předkládaných studií bylo stanovit účinnost fipronilu proti čelenži klíštěty *Ixodes scapularis* infikovanými zárodky *Borrelia burgdorferi* a zjistit, zda účinnost proti této čelenži může zabránit přenosu spirochet *B. burgdorferi* na psy.

## Materiál a metodika

Nezávisle na sobě byly prováděny dvě paralelní studie za použití 0,25% koncentrace fipronilu ve spreji pro topické použití (Frontline® Spray, Merial) nebo fipronilu pro topické použití v 10% koncentraci kombinované s (S)-methoprenem v 9% koncentraci (Frontline® Plus, Merial). Každá studie zahrnovala 24 psů plemene beagle, z nichž bylo vždy 12 fen a 12 psů. Zvířata byla po dobu dvou týdnů aklimatizována v podmínkách speciálního chovného zařízení, v němž byla až do umělé expozice klíštěty držena v individuálních boxech. Poté byla ustájena až do konce sledování ve výběžích. Zdravotní stav všech psů byl kontrolován nejméně jedenkrát denně. Obě studie byly prováděny v souladu s doporučeními TRS Labs, Inc., Industrial Animal Care and Use, které stanovují podmínky při použití zvířat ve výzkumu.

V každé studii byli psi rozděleni náhodným výběrem do osmi podskupin po třech. V těchto podskupinách byli potom náhodným výběrem (losování) umístěni do jedné ze tří léčebných skupin:

*Skupina 1:* bez léčby – kontrolní.

*Skupina 2:* psi ošetřeni fipronilem v den -7 (tj. 7 dní před infestací *I. scapularis*).

*Skupina 3:* psi ošetřeni fipronilem v den -28 (tj. 28 dní před infestací *I. scapularis*).

Ve studii 1 byl aplikován podle doporučení výrobce fipronil topický spray v dávce 6 ml/kg každému zvířeti.

Ve studii 2 byl aplikován topický fipronil kombinovaný s (S)-methoprenem ve formě spot-on, způsobem i dávkou (vzhledem k hmotnosti ošetřovaných zvířat) odpovídající doporučení výrobce.

K čelenži byla použita klíštěta *Ixodes scapularis*. Zjištěná míra infekce použitých parazitů zárodky *B. burgdorferi* byla 42 %. Každý pes zařazený do pokusu byl v sedaci infestován 75 klíšťaty (přibližně v rovnocenném poměru samic a sameček použitých parazitů).

Krevní vzorky (7 ml), respektive získaná séra, byly testovány na přítomnost protilátek *B. burgdorferi* metodou KELA (kinetic enzyme-linked immunosorbent assay).

Pro potvrzení infekce byl použit Western blot u všech psů v den 49 a u dvou psů v den 77 z důvodu objasnění nejednoznačných výsledků dne 49.

Biopsie byly prováděny u sledovaných psů v sedaci 77. nebo 78. den dvojité z každého ze čtyř míst s maximálním počtem uchycených klíšťat (tato místa byla určena a označena 5. den po umělé infestaci). Jeden vzorek z dvojice biopsií byl určen pro kultivaci a druhý pro analýzu PCR (polymerase chain reaction). Kultury byly vyvíjeny při 34 °C a vyšetřovány každý týden po dobu šesti týdnů na přítomnost zárodků *B. burgdorferi* za použití zástinu a detekce protilátek nepřímou fluorescencí.

Počty parazitů byly vyhodnoceny za použití Friedmannova testu. Účinnost byla vypočítána za použití modifikovaného Abbottova vzorce. K určení incidence psů pozitivních sérologicky (KELA a Western blot) i kulti-vačně (přítomnost *B. burgdorferi*) byl použit Fisherův Exact test.

## Výsledky

### Účinnost proti *I. scapularis*

Všichni psi v kontrolních skupinách byli úspěšně infestováni klíšťaty (geo-

metrický průměr 22,4 klíšťat pro studii používající sprej a 24,5 klíšťat pro studii používající spot-on).

Jak ukazuje tabulka 1, u psů léčebných sedm dní před infestací oběma formami fipronilu byla účinnost 100%.

U psů infestovaných 28 dní po léčbě fipronil jak v kombinaci s (S)-methoprenem ve formě spot-on, tak samotný ve formě spreje poskytl vysoce signifikantní ( $P < 0,005$ ) redukci stupně infestace, a to 97,6 % ve skupině ošetřené formou spot-on a 99,6 % ve skupině ošetřené sprejem.

V případě skupiny s čelení 28 dní po ošetření sprejem bylo 48 hodin po expozici parazity sedm psů bez klíšťat a u jednoho bylo nalezeno jedno klíště. V obdobné skupině s ošetřením formou spot-on bylo šest psů z osmi bez klíšťat a u dvou psů byla zjištěna klíšťata v počtu tři a osm.

#### Infekce *B. burgdorferi*

Všichni testovaní psi byli před zahájením studie sérologicky negativní na *B. burgdorferi*. Všechny 16 neléčených psů v obou studiích bylo zárodky *B. burgdorferi* infikováno, což bylo prokázáno a) sérokonverzí u všech psů, b) pozitivní kultivací z bioptátů (u všech psů s výjimkou jednoho kontrolního zvířete ze studie s formou spot-on) a c) pozitivními výsledky PCR z kožních bioptátů (rovněž u všech psů s výjimkou jedné kontroly ze studie spot-on). Ze 16 kontrolních zvířat bylo 14 pozitivních ve všech bioptátech, jedno bylo pozitivní ve třech ze čtyř bioptátů a zbývající pes byl pozitivní ve dvou ze čtyř bioptátů.

Žádný ze psů ošetřených sprejovou formou fipronilu a infestovaný 7. nebo 28. den po aplikaci a žádný ze psů ošetřených formou fipronilu spot-on a infestovaný 7. den po aplikaci nevykázal sérokonverzi v žádném z následných časových termínů. Všechny hodnoty sérologického vyšetření metodou KELA těchto psů byly nižší než 100 v každé vyšetřované kolekci, což ukazuje, že k přenosu mikroorganismů z infikovaných klíšťat nedošlo. Kultivace u všech těchto psů byly jednotně negativní a výsledky PCR všech bioptátů získané v den 77 byly negativní, vyjma jednoho, což potvrzuje, že použití fipronilu poskytlo ochranu před

infekcí *B. burgdorferi*. Jediný pes s PCR pozitivním vzorkem (ze dne 7 po čelení ve skupině spot-on) byl však negativní jak při kultivaci, tak i sérologicky. Šest z osmi psů léčebných formou spot-on 28 dní před čelení zůstávalo sérologicky negativní v průběhu celé studie. Zbylí dva psi v této skupině, kteří byli infestováni klíšťaty ještě 48 hodin po čelení, vytvořili protilátky proti *B. burgdorferi* a kožní biopsie z obou byly kultivačně pozitivní na *B. burgdorferi*. To bylo potvrzeno pozitivními PCR výsledky v jedné ze čtyř biopsií, respektive ve dvou ze čtyř biopsií.

U tohoto psa nedošlo k rozvoji infekce *B. burgdorferi*. Ve studii s použitím fipronilu v kombinaci s (S)-methoprenem ve formě spot-on měli dva psi léčeni 28 dní před infestací tři a osm klíšťat, která zůstávala uchycena 48 hodin po infestaci. O dva dny později (tedy přibližně po 96 hodinách od infestace) zůstala tři klíšťata uchycena u jednoho psa. U těchto dvou psů byla zjištěna sérokonverze, která potvrzovala, že klíšťata uchycená déle než 48 hodin, ale méně než 96 hodin, mohou úspěšně přenést zárodky borelií.

Výsledky ukazují, že redukce počtu klíšťat v rozsahu 97,6 – 100 % u psů

Tab. 1 – Souhrn účinnosti proti *Ixodes scapularis* po ošetření formou fipronil spray a fipronil + (S)-methopren spot-on

	Den 7	Den 28
Fipronil spray	100 %	99,6 %
Fipronil + (S)-methopren spot-on	100 %	97,6 %

#### Diskuse

V obou studiích byl dokumentován akaricidní účinek spojený s ochranou proti přenosu *B. burgdorferi*. Jistotu pro tyto závěry poskytuje průkaz úspěšného přenosu zárodků *B. burgdorferi* u kontrolních zvířat, která nebyla tímto akaricidním přípravkem ošetřena. Vzhledem k možným falešně negativním výsledkům kultivačního a PCR vyšetření bylo prováděno i sérologické vyšetření. Všechny 16 kontrolních psů (osm kontrol v každé studii) vykazovalo sérokonverzi a 15 z nich bylo kultivačně i PCR pozitivních. Jeden pes zůstal PCR a kultivačně negativní, ale reagoval vysokými ELISA titry, potvrzenými vyšetřením western blot. Negativní výsledky kultivace a PCR mohou být vysvětleny skutečností, že mikroorganismy nejsou v těle psa distribuovány homogenně a nemusely být jehlovou biopsií zachyceny. Uvedená data ukazují, že použití tří vyšetření k průkazu infekce zvyšuje jistotu, že všechna zvířata zahrnutá do studie byla vystavena infekci *B. burgdorferi* prostřednictvím 75 klíšťat umístěných na každého z testovaných psů.

Interval, během něhož dojde k usmrcení klíštěte na zvířeti ošetřeném akaricidním přípravkem, je důležitým faktorem. Ve studii s použitím fipronilu ve formě spreje bylo jedno klíště uchyceno ještě 48 hodin po expozici klíšťaty u psa, který byl ošetřen před 28 dny.

ošetřených fipronilem významně snižuje riziko přenosu *B. burgdorferi* prostřednictvím klíštěte jako vektoru. Nicméně fakt, že i jedno perzistentně přichycené klíště může přenést infekci, naznačuje, že ošetření psů je třeba opakovat v průběhu celé klíšťové sezóny. Redukce přenosu nemoci může být dosaženo vakcinací v endemických oblastech.

Výsledky předložené studie prokazují vysokou účinnost fipronilu ve formě spot-on i spreje v prevenci přenosu *B. burgdorferi* na psy prostřednictvím infikovaných klíšťat po dobu 30 dnů. Je-li ošetření fipronilem, aplikované v měsíčních intervalech, doplněno dalšími preventivními opatřeními, jako např. vakcinací a osvětou majitelů psů vysvětlující stávající rizika a jejich snižování, je pravděpodobnost infekce psů původcem lymeské choroby významně redukována.

**Jacobson R., McCall J., Hunter J., Alva R., Irwin J., Eschner A., Jeannin P., Boeck A. The Ability of Fipronil To Prevent Transmission of *Borrelia burgdorferi*, the Causative Agent of Lyme Disease To Dogs. The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 2004;2(1):39-45.**

Přeložil a upravil:  
MVDr. Michal Gojda