

# Скорость летального действия флураланера (Бравекто™) на клещей *Ixodes ricinus* у собак

Christina Wengenmayer<sup>1\*</sup>, Heike Williams<sup>1</sup>, Eva Zschiesche<sup>1</sup>, Andreas Moritz<sup>2</sup>, Judith Langenstein<sup>2</sup>, Rainer KA Roepke<sup>1</sup>, Anja R Hecker<sup>1</sup>

## Реферат

**Общие сведения:** переносимые клещами возбудители болезней собак, в частности бабезиоза, анаплазмоза, боррелиоза и эрлихиоза, являются всё более серьёзной проблемой во всём мире. Одним из методов профилактики этих трансмиссивных заболеваний является уничтожение клещей до передачи возбудителя собаке. Флураланер (Бравекто™) — новый изоксазолиновый инсектицид и акарицид системного действия, обладающий длительным и устойчивым противопаразитарным эффектом. В настоящем исследовании изучается скорость летального действия флураланера на клещей у собак.

**Методы:** в общей сложности 48 собак случайным образом распределили на 8 групп по 6 собак, каждую собаку заразили 50 самками и 10 самцами клещей *I. ricinus*. Два дня спустя (на 0-й день) 4 группы однократно получили флураланер в дозе 25 мг/кг массы тела в форме жевательных таблеток Бравекто™; собаки в других 4 группах остались без лечения. Для оценки эффективности уничтожения клещей в каждый момент времени (4, 8, 12 и 24 часа после лечения) использовалась отдельная пара контрольной и экспериментальной группы. Через 4, 8 и 12 недель после лечения всех собак снова заразили 50 самками *I. ricinus*, а осмотр на наличие живых или мёртвых клещей проводили через 4, 8, 12 и 24 часа после каждого повторного заражения. Эффективность рассчитывалась для каждого времени оценки путём сравнения экспериментальной группы с соответствующей контрольной группой.

**Результаты:** эффективность уничтожения клещей составила 89,6% через 4 часа, 97,9% через 8 часов и 100% через 12 и 24 часа после лечения. Через 8 часов после повторного заражения эффективность составила 96,8%, 83,5% и 45,8% через 4, 8 и 12 недель после заражения соответственно. **Через 12 и 24 часа после повторных заражений в течение всего 12-недельного периода исследования эффективность уничтожения клещей составляла не менее 98,1%.**

**Выводы:** после применения флураланера уничтожает клещей быстро — через 4 часа, а на протяжении всего 12-недельного срока действия он обеспечивает почти полное уничтожение клещей в течение 12 часов после заражения. Благодаря быстрому акарицидному эффекту в совокупности с большой продолжительностью действия флураланер помогает предотвратить заболевания, переносимые клещами.

**Ключевые слова:** жевательные таблетки Бравекто™, флураланер, скорость уничтожения, собака, клещ, *Ixodes ricinus*, бабезиоз, анаплазмоз, эрлихиоз, боррелиоз, эффективность.

## Общие сведения

Клещи являются серьёзной проблемой для человека и животных, так как не только питаются кровью хозяев, но и переносят многочисленных возбудителей болезней, в частности вирусов, бактерий и паразитов. При питании инфицированные клещи могут передавать возбудителей заболеваний как человеку, так и домашним животным, в частности собакам [1, 2]. Векторные заболевания становятся всё более острой проблемой по всему миру [3, 4], что связано с ростом числа домашних животных, их перемещением при путешествиях владельцев; а также с заселением новых ареалов обитания членистоногими — переносчиками заболеваний [5]. Клещи и переносимые ими заболевания распространяются по всему миру и более не ограничиваются определёнными областями.

Переносимые клещами заболевания можно предотвратить, если избегать места, заселённые клещами, и физически удалять клещей с тела поражённых собак. Более разумным подходом является использование репеллентных препаратов или средств, способных быстро уничтожать клещей до передачи возбудителей, предпочтительно с большой продолжительностью действия [6—9].

Флураланер (Бравекто™) — инновационный эктопаразитицид, принадлежащий к новому классу соединений, изоксазолинам, — эффективен против *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor variabilis* и *Rhipicephalus sanguineus*, т.е. против всех видов клещей, способных переносить наиболее важных возбудителей болезней человека и домашних животных, в частности анаплазмоз, бабезиоз, боррелиоз и эрлихиоз [3].

Механизм действия флураланера основан на блокаде лигандзависимых хлоридных каналов (ГАМК-рецепторов и глутаматных рецепторов), приводящей к подавлению нервной системы членистоногих [10], что приводит к параличу и гибели блох и клещей [11]. Флураланер обладает высокой селективностью в отношении нейронов членистоногих в сравнении с нейронами млекопитающих [10, 12] и хорошо переносится собаками, начиная с 8-недельного возраста, включая собак с мутацией в гене MDR-1 (–/–) [13, 14].

У собак флураланер характеризуется длительным временем полувыведения, длительным временем удержания, относительно высоким объёмом распределения и низким клиренсом [15]. Длительное время

удержания флуранера в плазме крови собаки обуславливает стабильную летальную активность в отношении блох и клещей на протяжении 12 недель после однократного перорального применения [16]. Для действия флуранера необходимо, чтобы клещи прикрепилась к коже хозяина и, таким образом, проглотили активный компонент [11]. Продолжительное питание повышает риск передачи возбудителей от клещей собакам, однако заражение, как правило, не происходит непосредственно после прикрепления клеща к собаке. Для передачи большинства заболеваний, переносимых клещами, необходимо первоначальное прикрепление и период кровососания продолжительностью не менее 24—48 часов, во время которого происходит реактивация возбудителей [2]. Этот срок между прикреплением клеща и передачей патогена позволяет флуранеру оказать своё действие. Если инфицированные клещи погибнут в течение этого периода, то передачу возбудителей, вероятнее всего, удастся предотвратить. Таким образом, скорость уничтожения, определяемая как время, необходимое для уничтожения уже прикрепившихся клещей или для уничтожения клещей после повторной инвазии, является важным фактором профилактики переносимых клещами заболеваний.

Исходя из обоснования, указанного выше, было проведено 2 исследования для оценки скорости уничтожения клещей флуранером. Для этого эффективность уничтожения клещей измеряли через 4 и 8 часов (исследование 1) или через 12 и 24 часа (исследование 2) после однократного применения, а также через различные промежутки времени после повторного заражения этих собак на протяжении 12 недель действия препарата.

В обоих исследованиях для заражения собак выбраны клещи *I. ricinus* [17].

## Методы

Оба исследования проведены в соответствии с германским законодательством по защите животных, а до начала исследования получено одобрение Управления по исследованиям земли Рейнланд-Пфальц (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz). Исследования проводились в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) ОЭСР и принципами GLP, изложенными в немецком Законе о химических веществах (Chemikaliengesetz). Оба исследования являлись слепыми рандомизированными исследованиями с отрицательным контролем.

## Дизайн исследования

В исследованиях изучалась скорость летального действия флуранера на клещей *I. ricinus* у собак. В исследование включено в общей сложности 48 здоровых взрослых собак породы бигль (<7 лет), не получавших лечение каким-либо противопаразитарным препаратом в течение как минимум 12 недель до начала исследования. Перед распределением по группам собак взвесили (размах 9,3—19,9 кг) и провели клиническое обследование. Собак-участников до этого заразили 80 блохами (*Ctenocephalides felis*), чтобы продемонстрировать их восприимчивость к паразитарной инвазии и подтвердить отсутствие эктопаразитицидов. Собаки были ранжированы в порядке уменьшения количества блох (в диапазоне 63—80 блох/собаку) и случайным образом распределены по 8 группам (4 группы терапии и 4 соответствующие контрольные группы) по 6 собак с помощью сгенерированного на компьютере рандомизационного списка.

Все собаки содержались в помещении. Во время периодов без паразитарной инвазии собак содержали в тех группах, в которые они были распределены, а в периоды паразитарной инвазии все собаки содержались по отдельности. Температура в виварии с собаками составляла 17—22 °С, а относительная влажность — 40—90%. Собак кормили стандартным коммерчески доступным сухим собачьим кормом один раз в день, а доступ к воде не ограничивался. Наблюдения за общим состоянием здоровья проводились один раз в день в течение всего исследования.

## Применение препарата

На 0-й день (т.е. день применения препарата) собаки в 4 экспериментальных группах получили жевательные таблетки флуранера исходя из массы тела конкретного животного и минимальной дозы в 25 мг флуранера/кг массы тела. Жевательные таблетки флуранера помещались в заднюю часть ротовой полости на язык для стимуляции глотания. Собаки получали половину суточного рациона пищи не ранее 20 минут до применения препарата, а остальную часть — непосредственно после этого. За каждой собакой непрерывно наблюдали в течение 1 часа после применения препарата, чтобы определить, не выплюнет ли и не срыгнёт ли собака жевательную таблетку; таких случаев не происходило. Собаки в 4 контрольных группах остались без лечения.

## Заражение клещами и его оценка

Клещей *I. ricinus*, использовавшихся в исследовании, выращивали в лаборатории на протяжении как минимум 2-х поколений после отбора из естественных условий обитания в Европе. Собак, находящихся под действием седативного препарата медетомидина, заражали клещами на – 2 день (за два дня до дачи препарата), 28 (4 недели), 56 (8 недель) и 84 (12 недель) дни. При каждом заражении непосредственно на шерсть каждой собаки вдоль спины, на бок и на голову помещали 50 некармливаемых взрослых самок клещей. Кроме того, на собак помещали по 10 некармливаемых взрослых самцов *Ixodes ricinus* для обеспечения самкам оптимальных условий для прикрепления. Заражённые клещами собаки содержались в индивидуальных загонках до удаления паразитов. Клещевая нагрузка (количество самцов и самок клещей) у всех собак в каждой паре экспериментальной и контрольной группы оценивали через 4 ( $\pm 0,75$ ), 8 ( $\pm 0,75$ ), 12 ( $\pm 1,5$ ) или 24 ( $\pm 1,5$ ) часов после лечения (0-я неделя) или после повторного заражения (на 4, 8 и 12 неделе). Осмотру подвергалось всё тело каждой собаки, а клещей тщательно удаляли щипцами. Клещи классифицировались как мёртвые или живые, прикрепленные или неприкрепленные, и подсчитывались. Персонал, проводивший классификацию и подсчёт клещей, не был

осведомлён о лечении, назначенном каждой собаке.

## Статистический анализ

Статистический анализ проведён с помощью пакета программного обеспечения SAS® (SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина, США, версия 9.2). Во всех статистических расчётах статистической единицей было отдельное животное. Процентная эффективность в отношении клещей рассчитывалась для каждой группы, получавшей лечение, и каждого времени оценки в соответствии с формулой Эббота:

Эффективность (%) =  $100 \times (M_C - M_T) / M_C$ , где  $M_C$  — среднее геометрическое количество живых клещей на собаках в контрольной группе, а  $M_T$  — среднее геометрическое количество живых клещей на собаках в группе, получавшей лечение. В случае нулевого количества клещей среднее геометрическое количество клещей ( $x_g$ ) рассчитывалось следующим образом:

$$x_g = \left( \prod_{i=1}^n (x_i + 1) \right)^{\frac{1}{n}} - 1$$

где  $n$  — количество животных,  $i$  — индекс, а  $x_i$  — количество клещей на  $i$ -м животном.

Достоверность различий оценивали, сравнивая логарифм количества живых клещей в каждой получавшей лечение группе с логарифмом количества клещей в соответствующей контрольной группе для каждого времени оценки. Группы лечения и контрольные группы сравнивали в рамках смешанной линейной модели, в которой группа животных была фиксированным эффектом, а блок — случайным эффектом. Двусторонний уровень достоверности для  $F$ -критериев эффектов модели был выбран равным  $\alpha = 0,05$ .

## Результаты

Ни у одной из 24 собак, получавших флуранер, в течение 12-недельного периода после лечения не обнаружено связанных с лечением нежелательных явлений. Средние количества клещей и подробные результаты изучения эффективности представлены в табл. 1. Эффективность уничтожения клещей составила 89,6% через 4 часа, 97,9% через 8 часов и 100% через 12 и 24 часа после лечения. Через 8 часов после повторного заражения эффективность составила 96,8%, 83,5% и 45,8% через 4, 8 и 12 недель после заражения соответственно. Через 12 и 24 часа после повторных заражений в течение всего 12-недельного периода исследования эффективность уничтожения клещей составляла не менее 98,1%.

У собак, получавших флуранер, количество клещей через 4, 8, 12 или 24 часа после лечения было достоверно ниже ( $p < 0,0001$ ), чем у контрольных собак, не получавших лечение. У собак, получавших флуранер, количество клещей через 8, 12 и 24 часа после повторного заражения также было достоверно ниже (во все моменты времени  $p < 0,0001$ ; через 8 часов после повторного заражения на 12-й неделе  $p < 0,004$ ), чем у контрольных собак. Через 4 часа после повторного заражения на 4-й неделе также зафиксировано достоверно меньшее количество клещей ( $p < 0,03$ ).

## Обсуждение результатов

Флуранер (Бравекто™) — первый эктопаразитицид для перорального применения, демонстрирующий значительную продолжительность действия против клещей. Настоящее исследование чётко показывает, что флуранер быстро уничтожает клещей с возрастающей со временем эффективностью, причём полный эффект достигается через 12 часов и сохраняется на протяжении всего 12-недельного периода действия.

Флуранер является системным паразитицидом и действует на клеща с началом кормления на теле хозяина. Быстрый летальный эффект ограничивает период кормления. Передача возбудителей заболеваний хозяину происходит не немедленно после прикрепления клеща, а после продолжительного кровососания.

Перед передачей возбудители активируются непосредственно в слюнных железах, либо для размножения и миграции в слюнные железы им необходим период реактивации [2]. Этот период реактивации начинается после прикрепления к хозяину, а передача происходит, когда клещ отгрызает излишки жидкости в рану от укуса [2, 18].

Для оценки времени, требующегося для передачи возбудителя, проведено несколько исследований [9, 19—21]. Заражённым клещам позволяли питаться на теле хозяина в течение определённых промежутков времени. После удаления клещей хозяина проверяли на наличие или отсутствие возбудителя или специфической иммунной реакции. Если данные указывали, что хозяин контактировал с возбудителем, то время, проведённое клещом на хозяине, считалось достаточным для передачи возбудителя.

Так передача *B. burgdorferi* мышам нимфами иксодовых клещей происходила не ранее, чем через 24 часа после прикрепления: 0 из 18 мышей заразились после контакта с нимфами *I. ricinus*, инфицированными *B. burgdorferi*, в течение 24 или 48 часов, и ни одна из 58 мышей не заразилась после контакта с нимфами *I. scapularis*, инфицированными *B. burgdorferi*, в течение 24 часов [20, 21]. Передача собакам *Babesia canis* от инфицированных клещей *D. reticulatus* происходит не ранее, чем через 48 часов [19]. Более того, Prullage et al. заключили, что частота передачи *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* и *B. microti* существенно снижается, если клещам не давать кормиться более 24 часов [22].

После того, как кровососание становится возможным, вероятность передачи возбудителя существенно возрастает и продолжает расти с увеличением продолжительности кровососания [21]. При сравнении данных о времени передачи возбудителей с результатами нашего исследования можно сделать вывод, что флуранер уничтожает клещей до того, как начинается передача боррелий и бабезий.

**Таблица 1. Среднее количество клещей и эффективность уничтожения клещей (%) после перорального применения флуранелера у собак**

Время оценки	4 часа	8 часов	12 часов	24 часа	
0 неделя	Среднее количество клещей <sup>b</sup> (контроль/лечение) [n]	33.0/3.4	30.6/0.6	28.1/0	15.8/0
	Эффективность (%)	89.6 <sup>#</sup>	97.9 <sup>#</sup>	100 <sup>#</sup>	100 <sup>#</sup>
4 неделя	Среднее количество клещей <sup>b</sup> (контроль/лечение) [n]	36.5/24.4	40.5/1.3	36.7/0.1	30.6/0
	Эффективность (%)	33.2 <sup>*</sup>	96.8 <sup>#</sup>	99.7 <sup>#</sup>	100 <sup>#</sup>
8 неделя	Среднее количество клещей <sup>b</sup> (контроль/лечение) [n]	38.6/31.8	31.2/5.2	32.0/0.3	29.8/0.1
	Эффективность (%)	17.5	83.5 <sup>#</sup>	99.2 <sup>#</sup>	99.6 <sup>#</sup>
12 неделя	Среднее количество клещей <sup>b</sup> (контроль/лечение) [n]	37.4/34.5	30.0/16.2	34.3/0.6	32.7/0.6
	Эффективность (%)	7.8	45.8 <sup>§</sup>	98.3 <sup>#</sup>	98.1 <sup>#</sup>

<sup>a</sup> Оценка клещей в часах после лечения или повторного заражения. <sup>b</sup> Среднее геометрическое.

\* Логарифм количества живых клещей в получившей лечение группе достоверно отличался ( $p < 0,03$ ) от логарифма количества клещей в соответствующей контрольной группе.

§ Логарифм количества живых клещей в получившей лечение группе достоверно отличался ( $p < 0,004$ ) от логарифма количества клещей в соответствующей контрольной группе.

# Логарифм количества живых клещей в получившей лечение группе достоверно отличался ( $p < 0,0001$ ) от логарифма количества клещей в соответствующей контрольной группе.

Для возбудителей *A. phagocytophilum* и *E. canis*, возможно более раннее время передачи. Так передача мышам *A. phagocytophilum* от нимф *I. scapularis* происходит в течение первых 24 часов [20], а передача *E. canis* происходит в течение первых 3—6 часов [9]. Таким образом, риск передачи этих возбудителей нельзя полностью исключить с учётом скорости уничтожения клещей флуранелером и опубликованных значений времени передачи по данным лабораторных исследований. Однако эти исследования проводились в лабораторных условиях; воспроизвести все имеющиеся переменные естественного состояния переносчика и хозяина (напр., инвазионное давление со стороны переносчика и распространённость инфекции среди переносчиков, прерывание кормления клеща, различия в возрасте, породе и иммунном статусе хозяина, а также наличие других резервуарных хозяев) в лаборатории невозможно. Что более важно, в некоторых исследованиях, проведённых на собаках, использование коммерчески доступных акарицидных препаратов защищало от заражения *A. phagocytophilum* или *E. canis* [8, 23—27]. Согласно описанию у этих препаратов скорость уничтожения меньше (т.е. время, необходимое для уничтожения >90% прикрепившихся клещей, после лечения/повторного заражения больше), чем у флуранелера [23, 28—31]. Таким образом, флуранелер, по всей видимости, обладает не меньшей способностью защищать собак от заражения *A. phagocytophilum* и *E. canis*.

Системный механизм действия флуранелера обуславливает дополнительные преимущества для пользователя по сравнению с веществами, предназначенными для местного нанесения или применяющимися в составе ошейников и остающимися на поверхности тела собаки. При использовании этих препаратов возможно снижение эффективности против клещей из-за потери ошейника или после купания. Кроме того, тот факт, что клещи погибают после кормления на собаке, получившей флуранелер, снижает также вероятность заражения другой собаки, что может произойти при применении веществ с исключительно репеллентным эффектом. В дополнение к высокой скорости уничтожения паразитов и системному механизму действия, большая продолжительность действия флуранелера приносит владельцам дополнительную пользу, так как позволяет реже использовать препарат по сравнению с другими коммерчески доступными акарицидами для ежемесячного применения. Частое и регулярное применение эктопаразитицидов — важный инструмент профилактики клещевых заболеваний. Однако владельцы недостаточно хорошо соблюдают режим применения [32, 33], что приводит к периодам отсутствия защиты собак от эктопаразитов [32], т.е. случаям неприменения средств для ежемесячного использования с рекомендованной периодичностью. Это подвергает риску не только здоровье их собак, но и других собак и людей, так как незащищённая собака является потенциальным резервуаром возбудителей. Поэтому эктопаразитицид с высокой скоростью уничтожения паразитов и большой продолжительностью действия — флуранелер (Бравекто™) — помогает предотвращать и контролировать заболевания, переносимые клещами.

## Выводы

После применения флуранелера уничтожает клещей быстро — через 4 часа, а на протяжении всего 12-недельного срока действия он обеспечивает почти полный летальный эффект против клещей в течение 12 часов после заражения. Системный механизм действия флуранелера является преимуществом, так как он позволяет избежать снижения эффективности. 12-недельная продолжительность действия является дополнительным преимуществом, так как позволяет преодолеть проблему несоблюдения режима повторных обработок. Благодаря быстрому акарицидному эффекту в совокупности с большой продолжительностью действия флуранелер помогает предотвратить заболевания, переносимые клещами.

1. Chomel B: Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. *Vet Parasitol* 2011, 179:294–301.
2. Little SE: Changing paradigms in understanding transmission of canine tick-borne diseases: the role of interrupted feeding and intrastadial transmission. In 2nd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium. Mazara del Vallo, Sicily, Italy; 2007:30–34.
3. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D: Ticks and tick-borne diseases: a One health perspective. *Trends Parasitol* 2012, 28:437–446.
4. Piesman J, Eisen L: Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol* 2008, 53:323–343.
5. Irwin PJ: It shouldn't happen to a dog ... or a veterinarian: clinical paradigms for canine vector-borne diseases. *Trends Parasitol* 2014, 30:104–112.
6. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB: Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol* 2009, 25:228–235.
7. Jongejan F, Fourie JJ, Chester ST, Manavella C, Mallouk Y, Pollmeier MG, Baggott D: The prevention of transmission of *Babesia canis canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs using a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene. *Vet Parasitol* 2011, 179:343–350.
8. Fourie JJ, Luus HG, Stanneck D, Jongejan F: The efficacy of Advantix to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite* 2013, 20:36.
9. Fourie JJ, Stanneck D, Luus HG, Beugnet F, Wijnveld M, Jongejan F: Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol* 2013, 197:595–603.
10. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T: The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod gamma-aminobutyric acid- and Lglutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol* 2014, 45:111–124.
11. Bravecto EPAR summary for the public. European Medicines Agency. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/veterinary/002526/WC500163861.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/002526/WC500163861.pdf).
12. Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T: The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 391:744–749.
13. Walther FM, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC: Safety of fluralaner chewable tablets (Bravecto), a novel systemic antiparasitic drug, in dogs after oral administration. *Parasit Vectors* 2014, 7:87.
14. Walther FM, Paul AJ, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC: Safety of fluralaner, a novel systemic antiparasitic drug, in MDR1(–/–) Collies after oral administration. *Parasit Vectors* 2014, 7:86.
15. Kilp S, Ramirez D, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC: Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration. *Parasit Vectors* 2014, 7:85.
16. Rohdich N, Roepke RK, Zschiesche E: A randomized, blinded, controlled and multicentered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto (fluralaner) against Frontline (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. *Parasit Vectors* 2014, 7:83.
17. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F: Lyme borreliosis. *Lancet* 2012, 379:461–473.
18. Kidd L, Breitschwerdt EB: Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2003, 10:742–751.
19. Heile CH, Hoffmann-Köhler P, Weimann A, Schein E: Uebertragungszeiten von durch Zecken übertragenen Erregern beim Hund: Borrelien, Anaplasmen/Ehrlichien und Babesien. *Praktischer Tierarzt* 2007, 88:584–590.
20. des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC III, Fish D: Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001, 183:773–778.
21. Crippa M, Rais O, Gern L: Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002, 2:3–9.
22. Prullage JB, Hair JA, Everett WR, Yoon SS, Cramer LG, Franke S, Cornelison K, Hunter

- JS 3rd: The prevention of attachment and the detachment effects of a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* on dogs. *Vet Parasitol* 2011, 179:311–317.
23. Davoust B, Marie JL, Mercier S, Boni M, Vandeweghe A, Parzy D, Beugnet F: Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Vet Parasitol* 2003, 112:91–100.
24. Fourie JJ, Ollagnier C, Beugnet F, Luus HG, Jongejan F: Prevention of transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs treated with a combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene (CERTIFECT(R)). *Vet Parasitol* 2013, 193:223–228.
25. Otranto D, Paradies P, Testini G, Latrofa MS, Weigl S, Cantacessi C, Mencke N, de Caprariis D, Parisi A, Capelli G, Stanneck D: Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Vet Parasitol* 2008, 153:320–328.
26. Blagburn BL, Spencer JA, Butler JM, Land TM, Billeter SA, Dykstra CC, Stafford KC, Pough MB, Levy SA, Endrizzi M, Hostetler J: Prevention of transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* from ticks to dogs using K9 Advantix and Frontline Plus applied 25 days before exposure to infected ticks. *Intern J Appl Res Vet Med* 2005, 3:69–75.
27. McCall JW, Baker CF, Mather TN, Chester ST, McCall SD, Irwin JP, Young SL, Cramer LG, Pollmeier MG: The ability of a topical novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene to protect dogs from *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections transmitted by *Ixodes scapularis*. *Vet Parasitol* 2011, 179:335–342.
28. Fourie JJ, Beugnet F, Ollagnier C, Pollmeier MG: Study of the sustained speed of kill of the combination of fipronil/amitraz/(S)-methoprene and the combination of imidacloprid/permethrin against *Dermacentor reticulatus*, the European dog tick. *Parasite* 2011, 18:319–323.
29. Kunkle BN, Everett WR, Yoon SS, Beugnet F, Pollmeier M: Study of the sustained speed of kill of the combination fipronil/amitraz/(S)-methoprene and the combination imidacloprid/permethrin against newly acquired *Dermacentor variabilis* (American Dog Tick). *Intern J Appl Res Vet Med* 2012, 10:42–47.
30. Hunter JS 3rd, Baggott D, Everett WR, Fourie JJ, Cramer LG, Yoon SS, Collidor N, Mallouk Y, Lee L, Blair J, Prullage JB: Efficacy of a novel topical combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of induced infestations of brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. *Vet Parasitol* 2011, 179:318–323.
31. Baker CF, Hunter JS 3rd, McCall JW, Young DR, Hair JA, Everett WR, Yoon SS, Irwin JP, Young SL, Cramer LG, Pollmeier MG, Prullage JB: Efficacy of a novel topical combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of induced infestations with four North American tick species (*Dermacentor variabilis*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum* and *Amblyomma maculatum*) on dogs. *Vet Parasitol* 2011, 179:324–329.
32. Beck S, Schein E, Baldermann C, von Samson-Himmelstjerna G, Kohn B: [Tick infestation and tick prophylaxis in dogs in the area of Berlin/Brandenburg—results of a questionnaire study]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2013, 126:69–76.
33. Mencke N: Future challenges for parasitology: vector control and 'One health' in Europe: the veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2013, 195:256–271.
34. Leschnik M, Feiler A, Duscher GG, Joachim A: Effect of owner-controlled acaricidal treatment on tick infestation and immune response to tick-borne pathogens in naturally infested dogs from Eastern Austria. *Parasit Vectors* 2013, 6:62.