

Репеллентная и акарицидная эффективность новой комбинации фипронила и перметрина против основного переносчика бабезиоза собак в Европе, клеща *Dermacentor reticulatus*

Pascal Dumont^{1*}, Josephus J Fourie², Mark Soll¹ и Frédéric Beugnet¹

Краткий обзор опубликованной статьи

Справочные данные: *Dermacentor reticulatus* – вид клеща, имеющий большое значение для ветеринарной медицины, так как он является основным переносчиком бабезиоза собак, вызываемого *Babesia canis*. Поэтому эффективность против данного вида клещей является ключевой характеристикой препарата против клещей, применяемого у собак. Репеллентная эффективность, профилактическая эффективность против прикрепления и акарицидная эффективность Фронтлайн Три-Акт, новой комбинации фипронила и перметрина, против индуцированных инвазий клещей *Dermacentor reticulatus* у собак оценивались после однократного местного нанесения.

Методика: группа из 20 собак была разделена на две исследуемые группы. Десять собак обрабатывали методом местного нанесения композиции, содержащей 6,76 % фипронила + 50,48 % перметрина однократно в день 0, остальные 10 собак были назначены контрольными животными и обработке не подвергались. Оценка заражения проводилась путем размещения 50 клещей *D. reticulatus* рядом с собаками, которым вводился седативный препарат и которые были помещены в специальные клетки, в дни 1, 7, 14, 21 и 28. Ручной подсчет прикрепившихся к собакам клещей проводился через 4, 12 и 24 ч после заражения. Подсчет мертвых клещей проводился через 48 ч после каждого заражения. Рассчитывалась репеллентная эффективность, профилактическая эффективность против прикрепления и акарицидная эффективность.

Результаты: новая комбинация обеспечивает репеллентную эффективность в диапазоне от 56,5 до 73,5 % через 4 ч после заражения (ПЗ), от 76,3 до 92,9 % через 12 ч ПЗ и от 83,9 до 96,5 % через 24 ч ПЗ, до 4 недель после обработки. Профилактическая эффективность против прикрепления колебалась от 64,1 до 79,7 % через 4 ч ПЗ, от 79,1 до 94,2 % через 12 ч ПЗ и от 84,2 до 99,6 % через 24 ч ПЗ, до 4 недель после обработки. Акарицидная эффективность против клещей *D. reticulatus* составила $\geq 99,5$ % в течение 4 недель после обработки.

Заключение: новая комбинация фипронила и перметрина продемонстрировала отличную гидрофобность, высокую профилактическую эффективность против прикрепления и акарицидную эффективность против *D. reticulatus* по меньшей мере в течение 4 недель. Результаты показывают, что в эндемических районах бабезиоза собак применение новой комбинации может значительно снизить потенциал передачи бабезиоза собак, а также других заболеваний, передаваемых клещами.

Ключевые слова: репеллентная эффективность, акарицидная эффективность, *Dermacentor reticulatus*, клещи, фипронил, перметрин

*Адрес для корреспонденции: pascal.dumont@merial.com

¹Merial S.A.S., 29 Av Tony Garnier, 69007 Lyon, France

Полная информация об авторах представлена в конце статьи.

© 2015 Dumont et al.; обладатель лицензии BioMed Central. Это статья открытого доступа, которая распространяется на основании международной лицензии Creative Commons (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), допускающей неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях информации, при условии соответствующей ссылки на оригинал. К данным, содержащимся в этой статье, применяется, если не указано иное, добровольный отказ авторских прав в пользу общественного достояния согласно лицензии Creative Commons (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>).

Справочные данные

Dermacentor reticulatus – вид клеща, достаточно широко распространенный в районах Европы с умеренным климатом, поражающий собак и являющийся основным переносчиком бабезиоза собак, вызываемого возбудителем *Babesia canis* [1,2]. *D. reticulatus* – трехступенчатый политропный и гидрофильный клещ. Личинки и нимфы инфицируют мелких млекопитающих и ведут эндофильный образ жизни в норах своих хозяев, тогда как образ жизни взрослых особей экзофильный, с тропизмом в первую очередь к собакам и в меньшей степени к копытным, таким как лошади, овцы и крупный рогатый скот. Этот клещ адаптирован к умеренному климату, предпочитает открытую местность с высоким уровнем влажности, особенно берега рек, обочины дорог, парки и пустыри [3]. Наблюдается значительная корреляция между распространением *D. reticulatus* и распространением бабезиоза собак [4]. Бабезиоз собак – передаваемая клещами болезнь, вызываемая внутриэритроцитарными простейшими рода *Babesia*, которые могут вызвать тяжелое клиническое заболевание [4-6]. В гиперэндемичных областях на юге Франции заболеваемость достигает 16 % от популяции собак [4]. В последние годы географическое распространение бабезиоза собак расширилось от Западной и Центральной Европы к Северной Европе; вероятно, это связано как с изменениями климата, которые повысили вероятность выживания клеща, так и с тем, что люди стали чаще путешествовать с животными [4-6].

Современные препараты для лечения бабезиоза собак (например, имидакарб дипропионат) в рекомендованной дозе не полностью убивают возбудителя, и получавшие лечение собаки могут страдать рецидивами или служить переносчиками для дальнейшего распространения паразитов *Babesia* в регионе [7]. В некоторых странах существует вакцинация против *B. canis*. Она производится методом введения растворимых антигенов к *B. canis*, полученных органическим способом и добавленных к инертному носителю (обычно в этом качестве используются сапонины). Эффективность вакцины не абсолютна, она предотвращает развитие тяжелых клинических признаков [8]. При отсутствии необходимых профилактических средств прямого воздействия рекомендуется использование акарицидных средств с достаточно сильным и стойким эффектом уничтожения клещей. В данном случае важно проверить эффективность продукта против конкретных видов клещей, которые являются переносчиками заболевания.

Фипронил (фенилпиразол), обладающий как инсектицидными, так и акарицидными свойствами, использовался в течение нескольких лет для уничтожения клещей, блох и вшей [9,10]. Перметрин, синтетический пиретроид, может как отпугивать паразитов, так и уничтожать их, благодаря чему может применяться против широкого спектра паразитов, включая клещей, блох, вшей и различных кровососущих двукрылых [9,11].

Данное исследование было проведено с целью оценки акарицидной и репеллентной эффективности новой комбинации фипронила и перметрина (Фронтлайн Три-Акт) против основного переносчика бабезиоза собак в Европе, клеща *D. reticulatus*.

Методика

Лабораторное исследование было проведено в соответствии с требованиями надлежащей клинической практики (GCP), согласно предписаниям Руководства 9 Международного сотрудничества по гармонизации технических требований для регистрации ветеринарных лекарственных препаратов (VICH). Исследование было спланировано как параллельное, рандомизированное, слепое, контролируемое исследование эффективности и проводилось в соответствии со стандартными методами оценки эффективности уничтожения паразитов для контроля и профилактики заражения клещом [12].

Животные

В качестве подопытных животных в данном исследовании использовались взрослые собаки смешанных пород, которые не подвергались обработке средствами против эктопаразитов в течение 12 недель до начала исследования (10 кобелей и 10 сук, от 1 до 8 лет, весом 7,4-21,8 кг). В исследовании животных держали отдельно в клетках размером 1,9 м x 2,97 м, контакт между собаками был исключен. Клетки для собак были частью внутреннего животноводческого комплекса с контролируемой температурой (20 ± 4 °C). Собаки содержались в одинаковых условиях, обеспечивающих их благополучие. С животными обращались в соответствии с предписаниями этического комитета Meriel и Южно-Африканского национального стандарта "SANS 10386: 2008 Содержание и использование животных в научных целях". Собаки акклиматизировались к условиям, в которых проводилось исследование, в течение 7 дней до начала исследования, общее состояние здоровья оценивалось на протяжении всего исследования.

Распределение и обработка

Сначала собак ранжировали в рамках каждого пола, основываясь на данных подсчета живых прикрепленных клещей до обработки и соблюдая равное количество кобелей и сук в каждой группе. Далее животных случайным образом и блоками (по две собаки в каждом) распределяли в одну из двух групп. Животные в группе 1 (n=10) не подвергались обработке и были назначены контрольными. Животных в группе 2 (n=10) обрабатывали в день 0 новой комбинацией в минимальной рекомендованной дозе (0,1 мл/кг исходя из массы тела в день 0, что соответствует дозе приблизительно 6,76 мг/кг фипронила и 50,48 мг/кг перметрина). Шерсть расчесывали, нанося препарат непосредственно на кожу по средней линии шеи. Общий объем был разделен на две приблизительно равные части. Одну часть наносили между основанием черепа и лопатками, другую – на переднюю часть лопаток. Собак осматривали до начала обработки и ежечасно в течение 4 ч после проведения обработки.

Заражение клещами и подсчет

Использовались клещи *D. reticulatus* из лабораторного штамма европейского происхождения. Клещи, используемые при искусственном заражении, представляли собой голодные взрослые особи возрастом не менее недели, со сбалансированным гендерным соотношением (50 % самок: 50 % самцов).

Заражение клещами проводилось с использованием 50 (± 5) клещей через день после обработки (день 1), а затем в дни 7, 14, 21 и 28. Собакам вводили седативный препарат и помещали их в отдельные клетки для экспозиции, клещей помещали на пол клетки возле задней части каждой собаки. После двух часов контакта собаку вынимали из клетки для экспозиции и помещали во вторую клетку. Еще через два часа собаку вынимали из второй клетки и возвращали в обычную жилую клетку. В обеих клетках после двух часов пребывания там собаки собирали и подсчитывали клещей (т. е. через 2 и 4 ч после заражения).

Ручной подсчет клещей также производился на всех собаках через 4, 12 и 24 ч после заражения (клещи классифицировались как живые отдельные, живые прикрепленные, мертвые отдельные или мертвые прикрепленные). Клещей снимали с собак и подсчитывали через 48 ч после заражения (дни 3, 9, 16, 23 и 30) и классифицировали как мертвых/живых и отдельных/прикрепленных в соответствии с руководством WAAVP [12].

Эксперты пользовались средствами индивидуальной защиты и были заслеплены в отношении исследуемых групп.

Анализ данных

Подсчет клещей в клетках

Общее количество клещей (мертвых и живых), собранных на месте в двух клетках для каждой собаки суммировалось для обработанной или контрольной группы, вычислялась пропорция от общего количества зараженных животных в каждой группе (n=500). Общее количество клещей в клетках с обработанными животными сравнивали с числом клещей в клетках с необработанными животными контрольной группы с использованием критерия хи-квадрат. Тест был двусторонним, с уровнем значимости 5 %. Анализ данных производился с использованием SAS®, версия 9.1.3.

Репеллентная эффективность, профилактическая эффективность против прикрепления и акарицидная эффективность у собак

Репеллентная эффективность против клещей вычислялась на основании общего количества клещей (живых или мертвых, прикрепленных или отдельных), наблюдаемых на собаках при ручном подсчете через 4, 12 и 24 ч после заражения.

Профилактическая эффективность против прикрепления вычислялась на основании общего количества прикрепленных клещей (живых или мертвых) при том же ручном подсчете через 4, 12 и 24 ч после заражения.

Акарицидная эффективность у собак вычислялась на основании общего количества живых клещей, снятых с собак через 48 ч после начала каждого заражения.

Для каждой переменной (репеллентная эффективность, профилактическая эффективность против прикрепления и акарицидная эффективность) общие результаты подсчета для одной собаки преобразовывались в натуральный логарифм (полученное значение +1) для расчета среднего геометрического по группе в каждый момент времени. Для обработанной группы рассчитывали процентное снижение по сравнению с контрольной группой в каждый момент времени после обработки по формуле $[(C - T)/C] \times 100$, где C – среднее геометрическое для контрольной группы, T – среднее геометрическое для обработанной группы. Обработанную группу сравнивали с необработанной контрольной группой с

применением рангового критерия Фридмана по блокам, соответствующим блокам распределения. Тест был двусторонним, с уровнем значимости 5 %. Анализ данных производился с использованием SAS®, версия 9.1.3.

Результаты

Общее количество клещей, собранных на месте в клетках, колебалось от 7 до 22 в контрольной группе и от 178 до 294 в обработанной группе, что составляет соответственно 1-4 % и 36-59 % от 500 клещей, использованных для заражения в каждой группе (Таблица 1). Во всех временных точках и во все дни оценки в клетках с необработанными животными контрольной группы зарегистрировано значительно меньше клещей, чем в клетках с обработанными животными ($p < 0,002$).

Среднее геометрическое число клещей, рассчитанное для необработанных животных контрольной группы, колебалось от 30,8 до 35,9 в течение 24-часового ручного подсчета (Таблица 2) и от 31,2 до 35,9 при 48-часовом подсчете собранных в клетках клещей (Таблица 3). Во всех временных точках и во все дни оценки у обработанных животных было зарегистрировано значительно меньше клещей по сравнению с необработанными животными контрольной группы ($p < 0,002$).

Репеллентная эффективность новой комбинации составляла $\geq 56,5$ % (56,5-73,5 %) через 4 ч после заражения, $\geq 76,3$ % (76,3-92,9 %) через 12 ч после заражения и $\geq 83,9$ % (83,9-96,5 %) через 24 ч после заражения в течение 4 недель после обработки (Таблица 2).

Профилактическая эффективность против прикрепления составляла $\geq 64,1$ % (64,1-79,7 %) через 4 ч после заражения, $\geq 79,1$ % (79,1-94,2 %) через 12 ч после заражения и $\geq 84,2$ % (84,2-99,6 %) через 24 ч после заражения в течение 4 недель после обработки (Таблица 2).

Акарицидная эффективность против *D. reticulatus* составляла $\geq 99,5$ % в течение 4 недель после обработки (Таблица 3).

В течение всего исследования собаки были здоровы, не зарегистрировано никаких явлений, связанных с обработкой, сопутствующие препараты, за исключением седативных, в ходе данного исследования не применялись.

Обсуждение

Данное исследование продемонстрировало репеллентную эффективность, профилактическую эффективность против прикрепления и акарицидную эффективность новой комбинации фипронила и перметрина против клещей *D. reticulatus* у собак.

Таблица 1. Количество *D. Reticulatus*, собранных на месте в клетках для двух исследуемых групп через 2 и 4 ч после заражения (доля от 500 клещей, использованных для заражения)

	Количество клещей в клетке для необработанных животных контрольной группы (в процентах от общего количества клещей)	Количество клещей в клетке для обработанных животных (в процентах от общего количества клещей)
Кол-во клещей и собак:	500 клещей/10 собак	500 клещей/10 собак
День заражения		
1	12 (2 %)	178 (36 %)
7	7 (1 %)	294 (59 %)
14	9 (2 %)	271 (54 %)
21	22 (4 %)	262 (52 %)
28	8 (2 %)	203 (41 %)

Количество клещей между исследуемыми группами статистически значимо различалось в каждой временной точке ($p < 0,002$).

Репеллентная эффективность определяется в "Руководстве по тестированию и оценке эффективности противопаразитарных веществ для контроля и профилактики заражения клещами и блохами у собак и кошек" ЕС (ЕМЕА/CVMP/005/2000 - Rev.2) следующим образом: "Отсутствие клещей, прикрепленных к животному, либо отсутствие клещей, обнаруживаемых на животном, через 24 ч после применения препарата". Подсчет клещей через 24 часа после нанесения подтвердил высокую репеллентную эффективность новой комбинации против взрослых, голодных *D. reticulatus* по крайней мере в течение 4 недель после обработки (репеллентная эффективность $\geq 93,7$ %, за исключением показателей первого

заражения (83,9 %) и в день 22 (89,7 %), и профилактическая эффективность против прикрепления $\geq 94,1$ %, за исключением показателей первого заражения (84,2 %). В исследовании с другим планом (Драйден и др. [13]) проводилась оценка репеллентной эффективности комбинации перметрина и имидаклоприда против *D. variabilis*; репеллентная эффективность составила 93,0 % в день 1, а затем от 86,0 до 49,0 % со дня 7 по день 28. Пониженная репеллентная эффективность, наблюдаемая при первом после обработки заражении, вероятно, коррелирует с проникновением в кожу действующего вещества, которое через 48 ч завершается еще не полностью.

Некоторые публикации указывают на трудности в оценке репеллентной эффективности против ползающих членистоногих, особенно тех, которым свойственна длительная связь хозяин-паразит, например клещей [12,14]. В последнем руководстве WAAVP предложен метод оценки репеллентной эффективности путем помещения обработанных и контрольных собак, которым введен седативный препарат, в клетки для заражения, выпускания клещей в клетки (а не на собак) и подсчета только клещей, оставшихся в клетках [12]. Таким образом, в данном исследовании используется модификация этой методики, с подсчетом клещей, оставшихся в клетках, через 2 и 4 ч после заражения. Количество клещей, собранных в клетках через 2 и 4 ч после заражения, позволяет оценить репеллентную эффективность другим способом, и высокие показатели в обработанной группе (от 36 до 59 % клещей, используемых для заражения) подтверждают оценку репеллентной эффективности, полученную на основании подсчета клещей на собаках. Очень низкие показатели в контрольной группе (от 1 до 4 %) подтверждают, что необработанные собаки устойчиво привлекают почти всех клещей.

Профилактическая эффективность против прикрепления, которая важна для избегания укуса клеща и, следовательно, передачи инфекции, была продемонстрирована в 4-часовых и 12-часовых временных точках на уровне $\geq 64,1$ % и $\geq 84,1$ % соответственно, со дня 7 по день 28. Это указывает на то, что у большинства клещей не хватило бы времени для передачи *Babesia*. Считается, что *Babesia* spp. в основном передаются за время от 36 до 72 ч после прикрепления [15].

Акарицидная эффективность новой комбинации оказалась удивительно высокой ($\geq 99,5$ %) в течение всего срока исследования по сравнению с другим препаратом местного применения – сочетанием перметрина с имидаклопридом [16,17]. Новая комбинация оказывала эффект сразу же после нанесения (эффективность 99,6 % в День 1 после обработки). С другой стороны, препарат, сочетающий перметрин с имидаклопридом, продемонстрировал терапевтическую акарицидную эффективность 81,2 %, 82,6 % и 93 % в трех различных исследованиях [16,17]. Акарицидная эффективность комбинации фипронила и перметрина сохранялась на уровне $\geq 99,5$ % в течение 4 недель, в то время как эффективность препарата, сочетающего перметрин с имидаклопридом, варьировались от 86,5 % до 93,0 % в день 7, от 76,8 % до 97,0 % в день 14, от 73,4 % до 87,0 % в день 21 и от 17,5 % до 76,0 % в день 28 [15-17]. Кроме того, судя по информации на упаковках нескольких препаратов на основе перметрина, *D. reticulatus* может оказаться менее чувствителен к перметрину, чем другие виды клещей. Это подтверждается более короткой продолжительностью эффекта против *D. reticulatus*, чем против *Ixodes ricinus* или *Rhipicephalus sanguineus*.

Таблица 2. Репеллентная эффективность и профилактическая эффективность против прикрепления *D. reticulatus* у собак, получавших новую комбинацию фипронила и перметрина при ручном подсчете через 4, 12 и 24 ч после заражения, в процентных значениях

День заражения	Время после заражения	Среднее количество клещей (живых или мертвых, прикрепленных или отдельных) на одной собаке		Репеллентная эффективность (%)	Среднее количество прикрепленных клещей, насчитанных на одной собаке		Профилактическая эффективность против прикрепления (%)
		Необработанная контрольная группа (10 собак)	Обработанная группа (10 собак)		Необработанная контрольная группа (10 собак)	Обработанная группа (10 собак)	
1	4 ч	39,1	14,6	62,5	37,4	13,0	65,2
7		34,7	9,2	73,5	32,9	7,4	77,6
14		34,5	9,5	72,5	31,9	6,5	79,7

21		35,3	12,7	63,9	32,6	8,8	72,9
28		35,6	15,5	56,5	33,3	12,0	64,1
1	12 ч	35,5	8,4	76,3	35,3	7,4	79,1
7		33,5	2,4	92,9	32,8	1,9	94,2
14		36,8	3,6	90,3	36,2	3,0	91,7
21		36,5	7,1	80,5	36,1	5,5	84,7
28		33,1	6,7	79,8	32,6	5,2	84,1
1	24 ч	32,5	5,2	83,9	32,4	5,1	84,2
7		33,3	1,2	96,5	33,0	0,1	99,6
14		35,9	1,6	95,5	35,7	1,1	96,8
21		32,8	3,4	89,7	32,6	1,6	95,0
28		30,8	1,9	93,7	30,8	1,8	94,1

Количество клещей между исследуемыми группами статистически значимо различалось ($p < 0,002$).

Таблица 3. Акарицидная эффективность новой комбинации фипронила и перметрина в течение 48 ч после заражения против *D. reticulatus* на собаках, в процентах

День заражения	Среднее количество живых клещей, насчитанных на одной собаке		Акарицидная эффективность (%)
	Необработанная контрольная группа (10 собак)	Обработанная группа (10 собак)	
1	32,5	0,1	99,6
7	35,9	0,0	100,0
14	34,7	0,0	100,0
21	33,7	0,0	100,0
28	31,2	0,1	99,5

Количество клещей между исследуемыми группами статистически значимо различалось ($p < 0,002$).

Два активных ингредиента новой комбинации хорошо известны своей акарицидной эффективностью [9,16-20], их объединенное акарицидное действие объясняет высокую акарицидную эффективность препарата, а также большую продолжительность его действия на клещей.

План данного исследования похож на тот, который был использован Прулладжем и др. [21]. Клещи были размещены рядом с собаками, а не непосредственно на их шерсти. Таким образом, клещи должны были сами перемещаться по направлению к хозяину, и это больше напоминает естественный процесс заражения. Ручной подсчет, проводимый через 4, 12 и 24 ч, хотя и менее точен, чем удаление и подсчет, так как не позволяет легко пересчитать снятых с собаки клещей, зато позволяет получить данные о репеллентной эффективности и оценить акарицидную эффективность при сохранении клещей на собаке в течение 48 ч. Большое количество клещей, наблюдаемое в необработанной контрольной группе на всех временных точках, означает, что клещ активно прикреплялись во все дни оценки (>30 клещей соответствует >60 % от общего количества клещей, используемых для заражения).

Заключение

Новая комбинация фипронила и перметрина обеспечивает отличную репеллентную эффективность, профилактическую эффективность против прикрепления и акарицидную эффективность против *D. reticulatus* в течение одного дня после нанесения на кожу собакам. Действие препарата сохраняется в течение 4 недель.

Эти результаты показывают, что в эндемичных районах бабезиоза ежемесячное применение новой комбинации может предотвратить прикрепление клеща к собаке и, таким образом, значительно снизить возможность передачи *B. canis*, а также других заболеваний, передаваемых клещами.

Конфликт интересов

Рассматриваемая работа финансировалась Merial Limited, Джорджия, США. Авторы, которые в настоящее время являются сотрудниками или подрядчиками Merial, участвовали в разработке и проведении исследований, собирали данные и подготовили рукопись.

Данный документ предоставляется только для научных целей. Любые ссылки на бренд или товарный знак в данном документе предназначены исключительно для информационных целей и не предназначены для коммерческих целей или нарушения прав соответствующего владельца (владельцев) бренда(ов) или товарного знака(ов).

Вклад авторов

ФД, ЖЖФ, ФБ и МС участвовали в разработке дизайна исследования и протоколов, ЖЖФ – в проведении исследования. ЖЖФ обобщил и проанализировал данные. Авторству ФД принадлежит первый проект рукописи, который затем был существенно пересмотрен всеми авторами. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Выражение благодарности

Авторы искренне благодарны всем сотрудникам на месте проведения исследования, которые приняли участие в исследовании и обеспечили соблюдение высоких стандартов GCP. Фронтлайн Три-Акт является зарегистрированными товарными знаками компании Merial во Франции, в других странах ожидают регистрации. Остальные товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

Информация об авторах

¹Merial S.A.S., 29 Av Tony Garnier, 69007 Lyon, France. 2ClinVet International (Pty) Ltd, PO Box 11186, 9321 Universitas, South Africa.

Получено: 20 января 2015 года

Принято: 21 января 2015 года

Опубликовано интернете: 27 января 2015 года

Литература

1. Beugnet F, Marie JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol.* 2009;163:298–305.
2. Otranto D, Dantas-Torres F. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasit Vectors.* 2010;3:2.
3. Beugnet F, Chalvet-Monfray K, Loukos H. FleaTickRisk: a meteorological model developed to monitor and predict the activity and density of three tick species and the cat flea in Europe. *Geospat Health.* 2009;4:97–113.
4. Halos L, Lebert I, Chao I, Vourc'h G, Ducrot C, Abrial D, et al. Questionnairebased survey on distribution and clinical incidence of canine babesiosis in France. *BMC Vet Res.* 2013;9:41.
5. Matijatko V, Torti M, Schetters TP. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol.* 2012;28:99–105.
6. Halos L, Lebert I, Abrial D, Danlois F, Garzik K, Rodes D, et al. Questionnairebased survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. *Parasite.* 2014;21:13.
7. Vial HJ, Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol.* 2006;138:147–60.
8. Bourdoiseau G. Canine babesiosis in France. *Vet Parasitol.* 2006;138(1–2):118–25.
9. Taylor MA. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J.* 2001;161:253–68.
10. Jongejan F, Fourie JJ, Chester ST, Manavella C, Mallouk Y, Pollmeier MG, et al. 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;179:343–50.
11. Brown M, Hebert AA. Insect repellents: an overview. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36:243–9.
12. Marchiondo AA, Holdsworth PA, Fourie LJ, Rugg D, Hellmann K, Snyder DE, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. *Vet Parasitol.* 2013;194:84–97.
13. Dryden MW, Payne PA, Smith V, Hostetler J. Efficacy of imidacloprid (8.8% w/w) plus permethrin (44% w/w) spot-on topical solution against *Amblyomma americanum* infesting dogs using a natural tick exposure model. *Vet Ther.* 2006;7:99–106.
14. Halos L, Baneth G, Beugnet F, Bowman AS, Chomel B, Farkas R, et al. Defining the concept of 'tick repellency' in veterinary medicine. *Parasitology.* 2012;139(4):419–23.

15. Schein E, Mehlhorn H, Voigt WP. Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Trop.* 1979;36:229–41.
16. Doyle V, Beugnet F, Carithers D. Comparative efficacy of the combination fipronil-(S)-methoprene and the combination permethrin-imidacloprid against *Dermacentor reticulatus*, the European dog tick, applied topically to dogs. *Vet Ther.* 2005;6:303–10.
17. Dryden M, Payne P, McBride A, Mailen S, Smith V, Carithers D. Efficacy of fipronil (9.8% w/w) + (S)-methoprene (8.8% w/w) and imidacloprid (8.8% w/w) + permethrin (44% w/w) against *Dermacentor variabilis* (American dog tick) on Dogs. *Vet Ther.* 2008;9:15–25.
18. Tielemans E, Manavella C, Pollmeier M, Chester T, Murphy M, Gale B. Comparative acaricidal efficacy of the topically applied combinations fipronil/(S)-methoprene, permethrin/imidacloprid and metaflumizone/ amitraz against *Dermacentor reticulatus*, the European dog tick (ornate dog tick, Fabricius, 1794) in dogs. *Parasite.* 2010;17:343–8.
19. Dryden MW, Payne PA, Smith V, Hostetler J. Evaluation of an imidacloprid (8.8% w/w)-permethrin (44.0% w/w) topical spot-on and a fipronil (9.8% w/w)-(S)-methoprene (8.8% w/w) topical spot-on to repel, prevent attachment, and kill adult *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* ticks on dogs. *Vet Ther.* 2006;7:187–98.
20. Bonneau S, Gupta S, Cadiergues MC. Comparative efficacy of two fipronil spot-on formulations against experimental tick infestations (*Ixodes ricinus*) in dogs. *Parasitol Res.* 2010;107:735–9.
21. Prullage JB, Hair JA, Everett WR, Yoon SS, Cramer LG, Franke S, et al. 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;179:311–7.