

# Prevenção da transmissão de *Babesia canis* pelos carrapatos *Dermacentor reticulatus* a cães após a administração tópica da solução *spot-on* de fluralaner.



Janina Taenzler<sup>1\*</sup>, Julian Liebenberg<sup>2</sup>, Rainer K. A. Roepke<sup>1</sup> e Anja R. Heckerath<sup>1</sup>.

## Resumo

**Retrospecto:** O efeito preventivo da solução *spot-on* de fluralaner contra a transmissão de *Babesia canis* pelos carrapatos *Dermacentor reticulatus* foi avaliado.

**Achados:** Dezesesseis cães com resultado de teste negativo para *B. canis* por reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunofluorescência indireta (IFI), foram alocados a dois grupos de estudo. No dia 0, os cães de um grupo (n = 8) foram tratados uma vez topicamente com a solução *spot-on* de fluralaner (Bravecto™ Solução *Spot-on*) de acordo com as recomendações da bula, e os cães do grupo controle (n = 8) permaneceram não tratados. Nos dias 2, 28, 56, 70 e 84, todos os cães foram infestados com 50 (±4) carrapatos *D. reticulatus* abrigando *B. canis*, com contagens manuais dos carrapatos *in situ* 48 ± 4 h após cada infestação. No dia 90, os carrapatos foram removidos de todos os cães e contados. Antes de cada infestação, a presença de *B. canis* no respectivo lote de carrapatos foi confirmada por PCR, sendo verificado que 12-16 % dos carrapatos estavam infectados com *B. canis*. A eficácia contra carrapatos foi de 99,5 e 99,3 % nos dias 4 e 58 após o tratamento, respectivamente, e de 100 % em todos os outros dias. Cães substitutos foram incluídos para qualquer cão controle infectado por *B. canis* (19 no total). Todos os cães controle (n = 27) foram infectados por *B. canis*, conforme confirmado por PCR, realizada a cada 7 dias, e pela IFI, realizada a cada 14 dias após o tratamento. Nenhum dos oito cães tratados foi infectado por *B. canis*, pois seus testes por PCR e IFI foram negativos durante todo o estudo até o dia 112. Comparando os cães infectados do grupo tratado com os cães infectados do grupo controle não tratado, foi demonstrado um efeito 100% preventivo contra a transmissão de *B. canis*.

**Conclusões:** Uma única administração tópica da solução *spot-on* de fluralaner efetivamente preveniu a transmissão de *B. canis* por carrapatos *D. reticulatus* infectados ao longo de um período de 12 semanas.

**Unitermos:** Bravecto™ Solução *Spot-on*, *Babesia canis*, Babesiose, Fluralaner, *Dermacentor reticulatus*, Cão, Eficácia, Prevenção da transmissão, *Spot-on*.

## Achados

### Hipótese

O fluralaner extermina rapidamente os carrapatos em 12 h após a fixação dos carrapatos[1] e a prevenção da transmissão do *Babesia canis* pelo tratamento oral com o fluralaner em comprimidos mastigáveis já tinha sido mostrada [2]. Recentemente, uma nova formulação do fluralaner, o Bravecto™ Solução *Spot-on* ficou disponível[3]. Assim, foi testado o potencial do fluralaner administrado topicamente para prevenir a transmissão do *B. canis*.

### Métodos e configuração do estudo

A mesma metodologia já descrita por Taenzler et al. [2] foi aplicada para investigar a prevenção da transmissão de *B. canis* pelo tratamento com fluralaner tópico e, portanto, os métodos e a configuração do estudo são apenas rapidamente resumidos abaixo. A aprovação ética foi obtida pelo Comitê de Ética para Animais da ClinVet (CAEC) antes do início do estudo.

\*Correspondência: janina.taenzler@msd.de

<sup>1</sup>MSD Animal Health Innovation GmbH, ZurPropstei, 55270 Schwabenheim, Germany  
A lista completa de informações sobre os autores está disponível no final do artigo.

### Detalhes dos animais

Dezesseis cães mestiços hígdidos (oito machos, oito fêmeas; 1-8 anos, 13,8-26,9 kg) com teste negativo para *B. canis* por reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunofluorescência indireta (IFI) foram aleatoriamente alocados a dois grupos de estudo de oito cães cada. Os cães foram alojados individualmente em recinto fechado e alimentados com uma ração canina seca padrão disponível comercialmente uma vez ao dia; água potável foi fornecida *ad libitum*.

### Tratamento

No dia 0 (isto é, o dia do tratamento), os cães do grupo de tratamento foram tratados uma vez topicamente com solução *spot-on* de fluralaner de acordo com as instruções do fabricante na bula. Não houve nenhuma evidência de dose incorreta, tal como derramamento ou escorrimento/gotejamento fora de qualquer animal tratado. Os cães do grupo controle permaneceram não tratados.

### Infestações com carrapatos e avaliações

Nos dias 2, 28, 56, 70 e 84, todos os cães foram infestados com 50 ( $\pm 4$ ) carrapatos *D. reticulatus* adultos, não alimentados (origem europeia, proporção de sexo 1:1). Antes de cada infestação, a presença de *B. canis* era confirmada por PCR usando 50 carrapatos do respectivo lote. As contagens manuais in situ dos carrapatos foram realizadas 48  $\pm$  4 h após cada infestação. No dia 90, todos os carrapatos restantes em cada cão foram removidos e contados.

### Saúde dos animais

Após o tratamento, a condição de saúde de cada animal foi monitorada através de exames físicos em um intervalo de 7 dias e a temperatura corporal retal de cada cão medida três vezes por semana. As observações gerais de saúde, indicando o cão como normal ou anormal, foram realizadas uma vez ao dia a partir de 7 dias antes do tratamento até o dia 112 após o tratamento. Se um cão fosse indicado como anormal ou a temperatura corporal retal estivesse igual ou acima de 39,4 °C, era realizado um exame físico adicional.

### Análise do sangue

Se um ou mais parâmetros durante o exame físico estivessem anormais, era feito um esfregaço sanguíneo. Amostras de sangue para análise sorológica para anticorpos anti-*B. canis* (IFI) e para detecção de DNA de *B. canis* (PCR) foram coletadas em um intervalo de 14 dias e em um intervalo de 7 dias após o tratamento, respectivamente [2].

### Tratamento de resgate e substituição

Os cães confirmados como positivos para *B. canis* pelo esfregaço sanguíneo receberam tratamento de resgate usando imidocarb e diminazeno [2] e continuaram a fazer parte das observações de saúde, mas não foram submetidos às infestações subsequentes de carrapatos. PCR e IFI foram realizadas nas amostras de sangue e após a confirmação de babesiose por ambas as análises; esses cães foram finalmente excluídos do estudo. Os cães controle positivos para *B. canis* foram substituídos por um cão substituto negativo para *B. canis* para assegurar um número suficiente de cães controle para infestações/contagem de carrapatos. No total, foram

usados 19 cães substitutos (dez machos, nove fêmeas); desse modo, foi incluído um total de 27 cães no grupo controle.

**Tabela 1.** Média das contagens de carrapatos e eficácia contra carrapatos após o tratamento tópico único com solução *spot-on* de fluralaner.

<b>Dia 4</b>	Média das contagens de carrapatos <sup>a</sup> (controles/tratados) (n)	18,6/0,1
	Eficácia (%)	99,5 <sup>b</sup>
<b>Dia 30</b>	Média das contagens de carrapatos <sup>a</sup> (controles/tratados) (n)	18,8/0,0
	Eficácia (%)	100 <sup>b</sup>
<b>Dia 58</b>	Média das contagens de carrapatos <sup>a</sup> (controles/tratados) (n)	12,7/0,1
	Eficácia (%)	99,3 <sup>b</sup>
<b>Dia 72</b>	Média das contagens de carrapatos <sup>a</sup> (controles/tratados) (n)	22,2/0,0
	Eficácia (%)	100 <sup>b</sup>
<b>Dia 86</b> <sup>c</sup>	Média das contagens de carrapatos <sup>a</sup> (controles/tratados) (n)	23,0/0,0
	Eficácia (%)	100 <sup>b</sup>
<b>Dia 90</b> <sup>c</sup>	Média das contagens de carrapatos <sup>a</sup> (controles/tratados) (n)	22,3/0,0
	Eficácia (%)	100 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Média geométrica dos carrapatos vivos fixados.

<sup>b</sup> As contagens transformadas em logaritmo dos carrapatos do grupo tratado foram significativamente diferentes ( $P < 0,0001$ ) das contagens transformadas em logaritmo do grupo controle não tratado.

<sup>c</sup> Grupo controle: seis cães disponíveis para infestação, dois cães tiveram resultado de teste positivo para *B. canis* no dia 85 e foram excluídos, cálculo da eficácia baseado em quatro cães.

### Avaliação da eficácia

A análise estatística foi realizada usando o pacote de software SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, release 9.3). A unidade experimental era o cão individual.

A porcentagem de eficácia contra carrapatos foi calculada para o grupo de tratamento em cada momento de avaliação usando médias geométricas com a fórmula de Abbott:

Eficácia (%) =  $100 \times (M_c - M_T) / M_c$ , onde  $M_c$  é a média do número total de carrapatos vivos fixados nos cães controle não tratados e  $M_T$  é a média do número total de carrapatos vivos fixados nos cães tratados. As contagens transformadas em logaritmo ( $x_i = \ln(x_i + 1)$ ) dos carrapatos vivos fixados foram usadas para confirmar o cálculo da eficácia. As diferenças significativas foram avaliadas entre as contagens transformadas em logaritmo dos carrapatos vivos fixados no grupo tratado em cada momento de avaliação, comparadas às contagens transformadas em logaritmo do grupo de controle não tratado usando um modelo linear misto incluindo o grupo do estudo como efeito fixo e o bloco como um efeito aleatório. O nível de significância bilateral era declarado quando  $p \leq 0,05$ .

A porcentagem de efeito preventivo contra a transmissão do *B. canis* para o grupo de tratamento foi calculada como segue: Efeito preventivo (%) =  $100 \times (T_c - T_t) / T_c$ , onde  $T_c$  é o número total de cães infectados no grupo não tratado e  $T_t$  é o número total de cães infectados no grupo tratado. Um cão era considerado infectado por *B. canis* se tivesse resultado de teste positivo tanto na IFI como na PCR. Os grupos do estudo foram comparados usando o teste exato de Fisher.

**Tabela 2** Número de cães com temperatura corporal retal (TCR) elevada e número de cães com teste positivo para *B. canis* no esfregaço sanguíneo, na PCR e na IFI.

Grupo do estudo	TCR	Esfregaço sanguíneo	PCR	IFI
	≥39,4 °C	[POS]	[POS]	[POS]
Controle não tratado (n)	19/27	27/27	27/27	27/27
Grupo de tratamento <sup>a</sup> (n)	1 <sup>b</sup> /8	0/8	0/8	0/8

<sup>a</sup> Tratamento tópico com solução *spot-on* de fluralaner

<sup>b</sup> A TCR igual ou acima de 39,4 °C foi medida, mas não confirmada como relacionada a uma infecção com *B. canis* pois a PCR e a IFI foram negativas durante todo o estudo.

**Tabela 3.** Efeito preventivo contra a transmissão de *B. canis* por carrapatos *D. reticulatus*.

	Controle não tratado	Grupo de tratamento <sup>a</sup>
Infectados (n)	27/27	0/8
Não infectados (n)	0/27	8/8
Infectados (%)	100	0
Prevenção (%)	-	100
Valor de P	-	0,0002

<sup>a</sup> Tratamento tópico com solução *spot-on* de fluralaner

## Resultados

Nenhum evento adverso relacionado ao tratamento foi observado em qualquer um dos oito cães tratados uma vez topicamente com fluralaner. Foi obtida eficácia entre 99,3 e 100 % contra os carrapatos em cada momento de avaliação (Tabela 1). Em cada momento de infestação, foi verificado que 12-16 % dos carrapatos estavam infectados com *B. canis* pela análise por PCR. O modelo de infecção foi considerado válido, pois todos os 27 cães controle não tratados foram infectados por *B. canis*, conforme confirmado pelo resultado positivo para *B. canis* pelo esfregaço sanguíneo, o DNA do babesia pela análise por PCR e pelos anticorpos anti-*B. canis* pela IFI após a primeira ou as subsequentes infestações com carrapatos (Tabela 2). Além disso, os cães do grupo controle apresentaram sinais clínicos relacionados à babesiose, tal como membranas mucosas pálidas, temperatura corporal retal igual ou acima de 39,4 °C, comportamento deprimido/apático, linfonodos aumentados e baço aumentado. No total, 19 cães substitutos (dez machos, nove fêmeas) foram incluídos no grupo controle durante todo o estudo, assegurando que em cada momento de infestação com carrapatos o grupo controle consistisse em oito animais, o que foi possível para todos os momentos de infestação, exceto o último, no dia 84. Para o desafio dos carrapatos no dia 84, somente seis animais controle estavam disponíveis, dos quais dois tiveram resultado de teste positivo pelo esfregaço sanguíneo e análise por PCR no dia 85 e foram tratados com tratamento de resgate, de modo que para a contagem manual in situ dos carrapatos no dia 86 o grupo controle consistia em apenas quatro animais. O cálculo da eficácia do dia 86 e do dia 90 foi feito, portanto, com quatro cães controle.

Nenhum dos cães tratados com a solução *spot-on* de fluralaner apresentou qualquer sinal clínico relacionado à babesiose. Temperatura corporal retal elevada foi medida em 1 dos 8 cães tratados, mas não foi confirmada como relacionada a uma infecção por *B. canis*, pois a PCR e a IFI foram ambas negativas durante todo o estudo. Nenhum dos cães tratados foi infectado pelo *B. canis* durante todo o tempo de duração do estudo, o que foi confirmado pela ausência de anticorpos anti-*B. canis* na IFI e um resultado de teste negativo para DNA de babesia pela análise por PCR em qualquer um dos momentos de análise de sangue programados até 4 semanas após a última infestação de carrapatos (Tabela 2). Um efeito 100 % preventivo contra a transmissão de *B. canis* por carrapatos *D. reticulatus* infectados foi obtido após um único tratamento com fluralaner tópico (Tabela 3).

## Conflito de interesses

JL é funcionária da ClinVet e todos os outros autores deste artigo são funcionários da MSD Animal Health. O estudo foi conduzido como parte de um programa de pesquisa para avaliar o potencial do fluralaner de inibir a transmissão de patógenos a hospedeiros após a fixação de carrapatos após o tratamento com fluralaner tópico.

## Contribuições dos autores

O desenho, o protocolo e o relatório do estudo foram preparados por JT, JL, AH e RR. JL e sua equipe da ClinVet foram responsáveis pela fase animal, a coleta de dados e os cálculos estatísticos. Todos os autores leram e aprovaram a versão final.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a toda a equipe da ClinVet por sua assistência e contribuição para este estudo.

## Detalhes dos autores

<sup>1</sup>MSD Animal Health Innovation GmbH, ZurPropstei, 55270 Schwabenheim, Germany. <sup>2</sup>ClinVet International, Uitsigweg, Bainsvlei, 9338 Bloemfontein, Free State, South Africa.

**Recebido em:** 23 de novembro de 2015,

**Aceito em:** 30 de março de 2016

**Publicado online em:** 31 de maio de 2016

## Referências

1. Wengenmayer C, Williams H, Zschiesche E, Moritz A, Langenstein J, Roepke RK, Heckerroth AR. The speed of kill of fluralaner (Bravecto™) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs. *Parasit Vectors*. 2014;7:525.
2. Taenzler J, Liebenberg J, Roepke RK, Heckerroth AR. Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated orally with fluralaner chewable tablets (Bravecto™). *Parasit Vectors*. 2015;8:305.
3. European Commission. Community register of veterinary medicinal products, Product information Bravecto. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/002526/vet\\_med\\_000285.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1c](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/002526/vet_med_000285.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1c).