

Vliv vývojového stádia na chování klíšťat při laboratorních *in-vitro* testech repelentů

The effect of developmental stage on the behaviour of ticks during laboratory in-vitro testing of tick repellents

Martin Kulma, Terezie Bubová, Oldřich Kopecký

Souhrn • Summary

Při registraci biocidního či repelentního přípravku v Evropské Unii a Spojených státech amerických je nutné předložit test účinnosti v souladu s nařízením a metodikou Evropské agentury pro chemické látky a Agentury pro ochranu životního prostředí. Přestože se nymfy a samice klíšťat výrazně liší z behaviorálního i morfologického hlediska, obě výše uvedené instituce ve svých metodikách povolují použití pro laboratorní testy nymfy a (nebo) samice. V tomto článku přinášíme důkaz o rozdílech mezi těmito stádii klíštěte *Ixodes ricinus* v mobilitě ($P < 0,05$) a senzitivitě k repelentu DEET ($P < 0,0001$). Tato studie tedy ukazuje, že výběr stádia pro testování může ovlivnit výsledky testu, přestože budou testy účinnosti provedeny v souladu s doporučenou metodikou.

In the European Union and United States of America, the efficacy of a biocide or repellent coming onto the market has to be evaluated according to the guidelines of the European Chemical Agency and the United States Environmental Protection Agency. Despite the obvious differences in morphology and behaviour, both these guidelines allow the use of nymph or adult female ticks for laboratory testing. Here, we provide evidence that sensitivity of *Ixodes ricinus* nymphs to diethyltoluamide (DEET) within the *in-vitro* trial was significantly higher compared to adult females ($P < 0.0001$). We also observed that feral ticks were less sensitive to the repellent than were laboratory-reared ticks ($P < 0.01$) and that mobility decreased when the trial was repeated ($P < 0.05$). This study has shown that the efficacy testing results may vary significantly between the two developmental stages even when the protocol is conducted in accordance with the guidelines.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2020; 29(7): 304–307

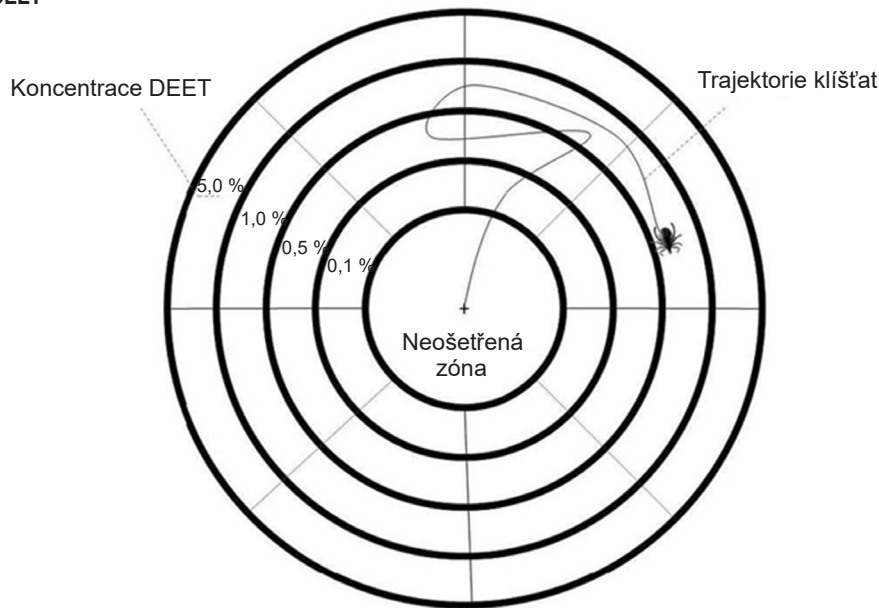
Klíčová slova: účinnost, pokyny pro testování, laboratorní testy, repelenty, klíšťata

Key words: efficacy, guidelines for testing, laboratory tests, repellents, ticks

ÚVOD

Klíšťata jsou hematofágní členovci a ektoparazité savců, ptáků a plazů, kteří patří mezi nejvýznamnější přenašeče velkého množství patogenů nejen veterinárního významu. Díky

Obrázek 1: *In-vitro* test na filtračním papíře použitým pro posouzení schopnosti nymf a samic klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) překonat bariéru repelentu DEET



změně klimatu se rozšiřuje i areál výskytu klíšťat [1,2] a tím pádem i nemocí přenášených klíšťaty. S výjimkou využití vhodného oblečení a obuvi jsou repelenty jedinou možností jak zabránit přichycení klíštěte na hostiteli [3]. Repelenty jsou látky syntetického či přírodního původu, které odradí členovce od jejich úmyslu sát krev na hostiteli [4]. V současnosti je komerčně nabízena velká škála repelentních látek v různých koncentracích. Na základě doporučení Centra pro kontrolu a prevenci nemocí [5] jsou za neúčinnější látky považovány diethyltoluamid (DEET), picaridin, IR3535 a citridiol. Aby mohl být repelentní přípravek registrován pro komerční prodej, je nutné prokázat mimo jiné jeho účinnost, a to laboratorním testováním repelence. Při testování přípravků pro uvedení na trh v Evropské unii se laboratoře musí řídit Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 528/2012 a musí být v souladu s pravidelně aktualizovanou směrnicí Evropské agentury pro chemické látky (ECHA). Ve Spojených státech amerických se laboratoře řídí pokyny vydávanými Agenturou pro ochranu životního prostředí (USEPA). Co se týče testování přípravků proti klíšťatům, obě agentury povolují v testech používat nymfy nebo dospělé samice [6,7], přestože se jedná o morfologicky i behaviorálně odlišné aspekty těchto stádií [8,9]. Z tohoto důvodu bylo cílem této práce popsat rozdíly v jejich chování při expozici repelentu. Jako modelový organismus pro pokus bylo vybráno klíště obecné (*Ixodes ricinus*), dominantní druh klíšťat České republiky, jehož senzitivita byla testována proti DEETu.

METODIKA

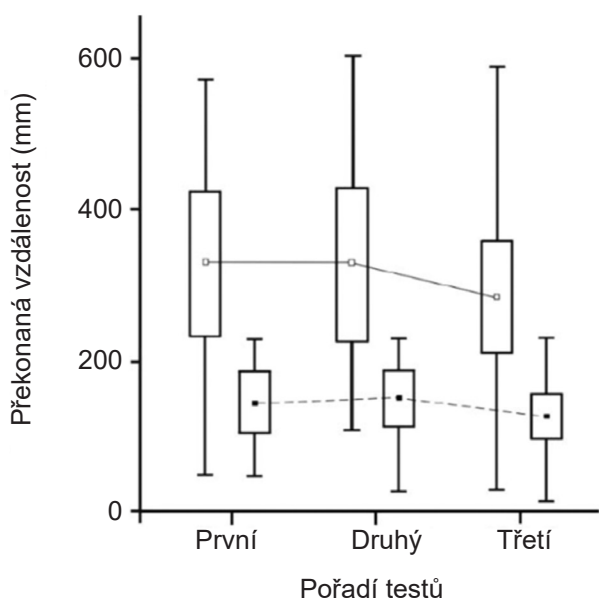
Klíšťata použitá pro pokus byla zakoupena z laboratoře Insect Services (Berlín, Německo) a odchycena metodou vlnkování ve volné přírodě na čtyřech různých lokalitách. První dvě lokality Krejčárek (50.095°N, 14.477°E) a Prokopské údolí (50.039°N, 14.366°) jsou lesoparky se smíšenými lesy a managementem seče v intravilánu hlavního města Prahy,

hojně využívané k volnočasovým aktivitám občanů. Hlavními zástupci fauny jsou zde ptáci a malí savci. Další lokalitou odchytu byla přírodní rezervace Dománovický les (50.114°N, 15.348°E). Les je smíšený s majoritou bučin, fauna zahrnuje pestrou škálu ptáků, plazů, malých a velkých savců. Poslední lokalitou je okraj jehličnatého lesa v blízkosti rekreačního areálu u rybníka Landa v obci Ostrovec (49.403°N, 14.118°E), kde se pohybuje velké množství vodního ptactva, nicméně přítomny jsou i ještěrky, malí savci a příležitostně i černá a spárkatá zvěř.

Celkem bylo pro testování využito 175 klíšťat (18 samic + 12 nymf z každé lokality vyjma Prokopského údolí, kde byly odchyceny 4 samice a 51 nymf). Před testováním byla klíšťata uložena v plastových zkumavkách s perforovaným víčkem do exsikátoru vybaveného vlhkou vatou (RH > 80 %). Exsikátory s klíšťaty byly uloženy v laboratoři při teplotě 26 ± 1 °C bez speciálního světelného režimu.

K popisu mobility klíšťat (vzdálenost, kterou klíště urazí během testu) a schopnost překonat bariéru repelentu DEET byl použit *in-vitro* test na filtračním papíře, jež byl navržen na základě dříve publikovaných metodik [10,11]. Na filtrační papír Whatman™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, Velká Británie) bylo natištěno 5 soustředných kruhů, po celé šířce pásme vytvořeného těmito kruhy (15 mm) byl štětcem nanesen repelent DEET v koncentraci od 0,1 % do 5 % (viz Obrázek 1). Klíšťata byla vysazována na prostřední část kruhu o průměru 60 mm, která zůstala neošetřena 15 minut od aplikace repelentu, a jejich pohyb byl monitorován po dobu 2 minut. Jako stimul k aktivizaci klíšťat byl použit dech pozorovatele. Trajektorie klíštěte byla zaznamenána mikrotužkou a změřena křivkoměrem (Recta, Zurich, Švýcarsko). Klíště bylo považováno za nerepelované v případě, že překonalo vnější hranici ošetřené zóny. Každé klíště bylo otestováno třikrát, mezi opakováními bylo uloženo v 5ml Eppendorf zkumavce, ta byla označena unikátním kódem a uložena v exsikátoru (RH > 80%, t = 26 °C). Po

Obrázek 2: Mobilita jednotlivých klíšťat (2 minutový test) v opakovaných pokusech (čtverce bez výplně, uprostřed krabicového grafu, představují průměry u samic, plně čtverce průměry u nymf. Střední část diagramu je ohraničena konci 1. a 3. kvartilu, úsečky na koncích krabicového grafu představují minimální a maximální hodnoty). Zvýšený rozsah úseček s menší plochou pole ve třetím pokusu ukazuje na heteroskedasticitu



ukončení pokusu byla klíšťata zamrzána při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poskytnuta Národní referenční laboratoři pro lymeskou boreliózu na otestování přítomnosti patogenů. Testy byly provedeny během června 2017 v Národní referenční laboratoři pro dezinfekci a deratizaci ve Státním zdravotním ústavu v Praze při vlhkosti $50 \pm 2\%$ a teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

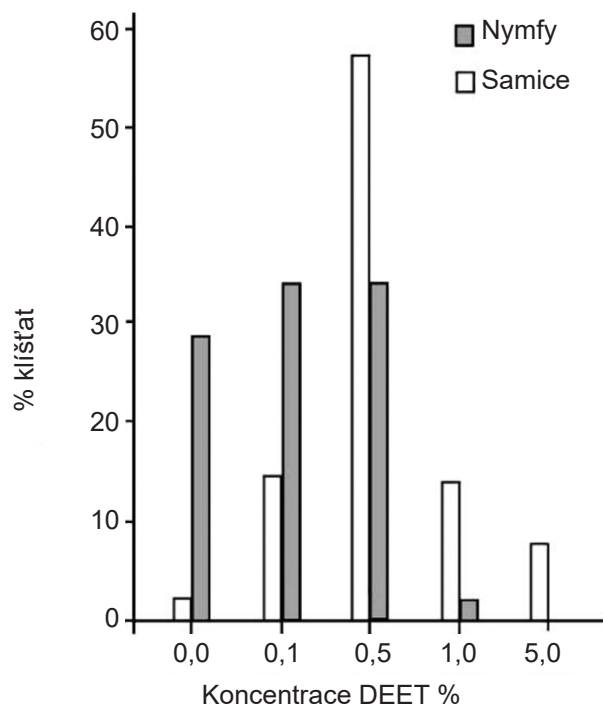
Pro statistické vyhodnocení ovlivnění mobility vývojovým stádiem a opakováním pokusu byl použit zobecněný lineární smíšený model (GLMM), funkce (lme). Senzitivita na repelent (překonání bariéry repelentu) byla hodnocena kumulativním smíšeným modelem (CMML). Všechny analýzy byly počítány za pomoci softwaru R studio (R Studio, Boston, Spojené státy americké).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Mobilita klíšťat během pokusu byla ovlivněna vývojovým stádiem (GLMM: $F = 189,82$; $P < 0,0001$) i pořadím pokusu (GLMM: $F = 4,79$, $P < 0,05$), přičemž samice během testování urazily větší vzdálenost a s opakováním pokusu mobilita klesala u obou testovaných stádií (Obrázek 2). Tolerance repelentu byla významně ovlivněna vývojovým stádiem klíšťat, kdy nymfy byly senzitivnější než samice (CLMM: estimate = $-3,13$; z-value = $-9,28$, $P < 0,0001$) (Obrázek 3). Dále byla schopnost překonávat bariéru repelentu ovlivněna také původem klíšťat, kdy laboratorní kmen byl výrazně citlivější v porovnání s odchycenými klíšťaty ve volné přírodě (CLMM: estimate = $-1,19$; z-value = $-2,81$, $P < 0,01$). Naopak mezi klíšťaty z přírody nebyl v závislosti na lokalitě v tomto ukazateli žádný rozdíl.

Přestože platná nařízení [6,7] vyžadují při registraci repelentů testy účinnosti na předloktí pokusných osob, *in-vitro* testy jsou běžně používány k porovnání účinnosti různých účinných

Obrázek 3: Podíl všech testovaných klíšťat podle vývojového stádia, která úspěšně překonala různé koncentrace DEET



látek či koncentrací repelentů a s výsledky laboratorních testů *in-vivo* korelují [12], proto je využití takového testu při popisu sledovaného jevu relevantní. Všechna klíšťata využitá v rámci této práce reagovala na hostitelské stimuly velice dobře, po celou dobu pozorování se pohybovala a snažila překonat bariéru repelentu. Výsledky této studie ukazují, že samice v porovnání s nymfami dokáží lépe překonávat bariéru repelentu, přestože dle Vassalo et. Perez-Eid (2002) [9] je motivace nymf sát na člověku větší, a jsou tak vůči repelentu signifikantně vnímavější. Tento výsledek může být vysvětlen rozdíly v chování i morfologii obou testovaných stádií. Zatímco nymfy měří $1,2 \times 1,5\text{ mm}$ a jejich hmotnost se pohybuje okolo 4 mg, průměrná velikost a hmotnost nenasátých dospělých samic je $2,0 \times 4,0\text{ mm}$ a 18 mg [13,14]. Když vezmeme v potaz, že obě výše uvedené směrnice k laboratornímu testování repelentů vyžadují aplikaci přípravku pouze na 30 mm pásmo okolo zápěstí (Obrázek 4) a dle našich výsledků nymfy za stejnou dobu urazí zhruba poloviční vzdálenost v porovnání se samicemi, bariéra tak jasně představuje pro nymfy větší překážku než pro samice, což může mít za následek ovlivnění výsledku testování.

Co se týče rozdílů mezi klíšťaty z přírody a laboratoře, klíšťata z umělého odchovu byla významně vnímavější na repelent. Naopak chování klíšťat z přírody vůči repelentu se mezi jednotlivými lokalitami významně nelišilo. Aby byla vyloučena možnost ovlivnění výsledku patogenem, který by mohl zvýšit motivaci klíštěte překonávat repelent, jako bylo prokázáno například pro klíšťovou encefalitidu [11], klíšťata, jež byla pozitivní na přítomnost borrelií (10–40 %) byla porovnána s klíšťaty negativními pocházejícími ze stejné lokality. V chování těchto klíšťat nebyl nalezen rozdíl. Nižší senzitivitu vůči repelentům tak lze vysvětlit určitou expozicí repelentům a insekticidním přípravkům. Dalším důvodem tohoto jevu může

Obrázek 4: Laboratorní testování repelentů proti klíšťatům při aplikaci přípravku na pásmo okolo zápěstí dle směrnic EPA a USEPA



být určité potlačení vyhledávacího módu, kdy není třeba vyvinout snahu k hledání hostitele. Obdobné rozdíly v chování vůči repelentu je známé například pro komáry [15,16], octomilky [17] nebo šváby [18].

Zajímavým výsledkem je také opakovatelnost pokusu, kdy se při obou testech (mobilita a senzitivita) výkony jedince lišily méně než výkony mezi sledovanými klíšťaty. Tento jev by mohl znamenat, že určitou roli hraje individuální motivace, tedy zjednodušeně určitá „osobnost“ významně ovlivňující rozhodování a chování klíštěte. Ať už to zní jakkoli bizarně, tato vlastnost již byla popsána i u jiných bezobratlých včetně roztočů [19]. Celkově ovšem došlo k poklesu sledovaných vlastností, a přestože první a druhé opakování se významně nelišilo (Obrázek 2), prokázalo se, že při opakování pokusu klíště ztrácí motivaci překonat bariéru repelentu. Požadavek platných nařízení na pouze jedno použití jednoho klíštěte se tak zdá z tohoto pohledu oprávněný.

ZÁVĚR

Na základě in-vitro testu je zřejmé, že chování nymf a samic je při testech repelence rozdílné, přičemž samice jsou méně vnímavé a více pohyblivé. Použitím odlišného stádia tak lze významně zkreslit výsledek testu účinnosti, a proto by tato práce měla přispět k zpřesnění nových směrnic, jejichž vydání chystá Evropská agentura pro chemické látky na podzim roku 2020.

Originál textu vyšel v časopise „Journal of the American Mosquito Control Association“ v prosinci 2019: Martin Kulma, Oldřich Kopecký, Terezie Bubová. Nymphs of *Ixodes ricinus* Are More Sensitive to Deet Than Adult Females. *J Am Mosq Control Assoc.* 2019; 35(4): 279–284.

Literatura

1. Jaenson TGT, Jaenson DGE, Eisen L, Petersson E, Lindgren E. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors.* 2012; 5(1): 8.

2. Ragagli C, Mannelli A, Ambrogi C, et al. Presence of host-seeking *Ixodes ricinus* and their infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Northern Apennines, Italy. *Exp Appl Acarol.* 2016; 69(2): 167–178.
3. Slunge D, Boman A. Learning to live with ticks? The role of exposure and risk perceptions in protective behaviour against tick-borne diseases. *PLoS One.* 2018; 13(6): e0198286.
4. Dethier VG, Browne BL, Smith CN. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J Econ Entomol.* 1960; 53(1): 134–136.
5. CDC. Lyme and Other Tickborne Diseases Increasing.
6. ECHA. *Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume I: Identity of the Active Substance/Physico-Chemical Properties/Analytical Methodology – Information Requirements, Evaluation and Assessment. Parts A+B+C.* Helsinki: European Chemicals Agency; 2018.
7. USEPA. *Product Performance Test Guidelines OPPTS 810.3700: Insect Repellents to Be Applied to Human Skin.* Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2010.
8. Mejlou HA, Jaenson TGT. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 1997; 21(12): 747–754.
9. Vassallo M, Perez-Eid C. Comparative behavior of different life-cycle stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) to human-produced stimuli. *J Med Entomol.* 2002; 39(1): 234–236.
10. Kulma M, Bubová T, Kopecký O, Rettich F. Lavender, Eucalyptus, and Orange Essential Oils as Repellents Against *Ixodes ricinus* females. *Sci Agric Bohem.* 2017; 48(2): 76–81. <https://content.sciendo.com/view/journals/sab/48/2/article-p76.xml>. Accessed January 1, 2019.
11. Belova OA, Burenkova LA, Karganova GG. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks—evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3(4): 240–246.
12. Dautel H. Test systems for tick repellents. *Int J Med Microbiol Suppl.* 2004; 293: 182–188.
13. Lees H, Quastel JH. Biochemistry of nitrification in soil: 1. Kinetics of, and the effects of poisons on, soil nitrification, as studied by a soil perfusion technique. (with an Addendum by H. Lees). *Biochem J.* 1946; 40(5–6): 803.
14. Chrdle A, Chmelík V, Růžek D. Tick-borne encephalitis: What travelers should know when visiting an endemic country. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12(10): 2694–2699.
15. Frances SP, Eikarat N, Sripongai B, Eamsila C. Response of *Anopheles dirus* and *Aedes albopictus* to repellents in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc.* 1993; 9(4): 474–476.
16. Walker TW, Robert LL, Copeland RA, et al. Field evaluation of arthropod repellents, deet and a piperidine compound, AI3-37220, against *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in western Kenya. *J Am Mosq Control Assoc News.* 1996; 12(2): 172–176.
17. Becker HJ. The genetics of chemotaxis in *Drosophila melanogaster*: Selection for repellent insensitivity. *Mol Gen Genet MGG.* 1970; 107(2): 194–200.
18. Strong CA, Koehler PG, Patterson RS. Insecticide resistance decline and selection in laboratory-reared *German cockroaches* (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol.* 1997; 90(1): 183–187.
19. Kralj-Fišer S, Schuett W. Studying personality variation in invertebrates: why bother? *Anim Behav.* 2014; 91: 41–52.

Martin Kulma^{1,2}, Terezie Bubová¹, Oldřich Kopecký²

¹Národní referenční laboratoř pro dezinfekci a deratizaci, CEM, SZÚ

²Katedra zoologie a rybářství, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze