

Aleksandra Gliniewicz¹, Anna Borecka², Marta Przygodzka¹, Ewa Mikulak¹

SUSCEPTIBILITY OF *DERMACENTOR RETICULATUS* TICKS TO REPELENTS CONTAINING DIFFERENT ACTIVE INGREDIENTS

WRAŻLIWOŚĆ KLESZCZY *DERMACENTOR RETICULATUS* NA REPELENTY ZAWIERAJĄCE RÓŻNE SUBSTANCJE AKTYWNE

¹National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland

²Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland

¹Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, Polska

²Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa, Polska

ABSTRACT

Ticks are vectors of human and animal diseases.

MATERIALS AND METHODS. The aim of this study was to investigate the efficacy of four different formulations containing DEET, Icaridin, IR3535 and mix of three compounds: DEET, IR3535 and geraniol, against *Dermacentor reticulatus* ticks.

RESULTS. The repellent effectiveness of these products to adult ticks was different. At 90 minutes after application the repellent A (DEET 30%), repellent D (DEET 30%, IR3535 20%, geraniol 0.1%) and repellent G (IR3535 12%) exhibited a 100% effectiveness in protection against ticks, but the efficacy of repellent C (Icaridin 20%) dropped to 95%.

DISCUSSION. DEET is considered by many authors to be the ‘gold’ standard of insect repellents, and we have also confirmed this in our studies with *Dermacentor reticulatus*. DEET expressed the higher repellency after 7 hours of application (90%) comparing to other formulation - repellent D containing DEET 30%, IR3535 20% and geraniol 0.1%, whose effectiveness dropped to 60%. Repellents C (Icaridin 20%) and G (IR3535 12%) were effective only up to four hours after application (the efficacy was 85% and 40%, respectively).

CONCLUSIONS. DEET has proven to be the most effective repellent against *Dermacentor reticulatus* ticks.

Key words: repellents, ticks, *Dermacentor reticulatus*

STRESZCZENIE

Kleszcze są przenosicielami wielu chorób ludzi i zwierząt.

MATERIAŁ I METODYKA. Celem pracy było określenie działania odstrasżającego kleszcze *Dermacentor reticulatus* czterech produktów zawierających DEET, ikarydynę, IR3535 i mieszaninę 3 substancji: DEET, IR3535 oraz geraniolu.

WYNIKI. Skuteczność odstrasżania kleszczy przez poszczególne preparaty była różna. Po 90 min po aplikacji repelent A (30% DEET), repelent D (DEET 30%, IR3535 20%, geraniol 0.1%) repelent G (IR3535) wykazywały 100% ochrony przed kleszczami; aktywność repelentu C (Ikarydyna 20%) wynosiła 95%.

DYSKUSJA. DEET jest uważany przez wielu autorów za ‘złoty standard’ repelentu dla stawonogów; potwierdzone to zostało również w naszych wynikach dotyczących jego działania na kleszcze *Dermacentor reticulatus*. Po 7 godzinach od aplikacji repelent zawierający 30% DEET wykazywał 90% odstrasżania kleszczy, podczas, gdy aktywność pozostałych formułacji znacząco zmalała: produkt C (zawierający 20% ikarydyny) i produkt G (zawierający 12% IR3535) po 4 godzinach były skuteczne odpowiednio w 85% i 40%.

WNIOSKI. Produkt zawierający 30% DEET wykazywał najlepsze właściwości odstrasżające w stosunku do kleszczy *Dermacentor reticulatus*.

Słowa kluczowe: repelenty, kleszcze, *Dermacentor reticulatus*

INTRODUCTION

Ticks are dangerous external parasites which attack humans, domestic and wild animals. Considering number of hosts and biology almost one half of tick species are important because of epidemiological or veterinary points of view. In Europe we know 60 species; in Poland – there are 21 present. The most known species in Poland are the sheep tick (*Ixodes ricinus*) and meadow tick (*Dermacentor reticulatus*). Epidemiologically important vectors of bacterial pathogens (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Francisella*, *Coxiella*) are mostly *Ixodes ricinus* ticks (1,2). But there is also to be believed, that meadow ticks (*Dermacentor reticulatus*) play important role in circulating several pathogens causing antropozoonoses (3). Juvenile stages of meadow ticks live on voles in their burrows. They could therefore transmit pathogens to those animals; on the other hand bloodsucking ticks *Ixodes ricinus* could be infected during feeding on small rodents (also voles) and transmit pathogens in transtadial way or attack different animals (rodents, deer, birds) and humans. In a study on pathogens present in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from humans Aubry et al (4) found in 2.7% of collected ticks *Babesia* protozoans, 2,1% there were *Babesia microtii* (responsible for human babesiosis), 34% of these ticks were also infected by *Rickettsia slovaca*, 23% - with *Rickettsia raoultii* as well. It should be noted also that meadow ticks attacking dogs invade human houses and flats. Because dogs are often effectively protected from ticks, wandering arachnids searching for a host could pose a threat to people when accidentally stick. In the literature there are described cases when *Dermacentor reticulatus* ticks were attached to humans and were then removed (5,6). Data presented above showed that meadow tick could be also considered as important vector in human life environment and people should protect themselves against it.

The aim of our study was the evaluation of susceptibility of *Dermacentor reticulatus* ticks to repellents containing different active ingredients. The investigation was undertaken because intensifying expansion of meadow ticks into urban and suburban areas was observed from several years. Therefore the role of personal protection against them stay more important.

MATERIALS AND METHODS

1. Biological material

Adults (males and females) of *Dermacentor reticulatus* ticks from an autumn population, collected in the field. Ticks were collected in the riparian bushes and meadows on the edge of forests Kazuń Polski and Warszawa-Rembertów nearby. Arthropods were captured in October – November 2015 and 2016 in

WSTĘP

Kleszcze to niebezpieczne, bezwarunkowe pasożyty zewnętrzne atakujące człowieka, zwierzęta domowe i dzikie. Ze względu na zakres żywicieli i biologię, prawie połowa z nich ma znaczenie epidemiologiczne i weterynaryjne. W Europie aktualnie znanych jest 60 gatunków; w naszym kraju występuje stale 21 gatunków kleszczy. Najbardziej znanymi gatunkami występującymi w Polsce są: kleszcz pospolity (*Ixodes ricinus*) i kleszcz łąkowy (*Dermacentor reticulatus*). Znaczenie epidemiologiczne jako wektory patogenów bakteryjnych (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Francisella*, *Coxiella*) mają głównie kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* (1,2). Przypuszcza się jednak, że kleszcze *Dermacentor reticulatus* odgrywają ważną rolę w utrzymywaniu krążeń niektórych patogenów powodujących antropozoonozy (3). Stadia młodociane kleszczy tego gatunku bytują w gniazdach normików, na których pasożytują. Mogą wtedy przekazywać tym zwierzętom patogeny; z kolei żywiące się krwią normików kleszcze *Ixodes ricinus* mogą być tą drogą zakażane i przekazywać drobnoustroje zarówno transtadialnie, jak i napadając na zwierzęta (gryzonie, jeleniowate, ptaki) i ludzi. W badaniach nad patogenami obecnymi w kleszczach *Dermacentor reticulatus* zebranych z ludzi Aubry i in. (4) stwierdzili u 2,7% osobników obecność pierwotniaków *Babesia*, w tym u 2,1% *Babesia microtii*. Pierwotniak ten jest odpowiedzialny za zachorowania na ludzką babeszjozę. Z kolei u 34% kleszczy tego gatunku stwierdzono zakażenie drobnoustrojem *Rickettsia slovaca*, a u 23% - *Rickettsia raoultii*. Zauważyć także należy, że kleszcze te atakujące często psy, dostają się do siedzib ludzkich. Ponieważ psy są najczęściej skutecznie zabezpieczone przed kleszczami, wędrujące w mieszkaniach w poszukiwaniu żywiciela kleszcze mogą stanowić zagrożenie dla ludzi, jeżeli przypadkowo ukłują. Opisane są także przypadki zdejmowania z ludzi przyczepionych kleszczy z gatunku *Dermacentor reticulatus* (5,6). Dane te wskazują, że *Dermacentor reticulatus* może być również groźnym wektorem patogenów w środowisku życia człowieka i dlatego należałoby się przed nim również chronić.

Celem pracy była ocena wrażliwości kleszczy *Dermacentor reticulatus* na repelenty zawierające różne substancje aktywne. Badania te podjęto w związku z nasilającą się ekspansją tego kleszcza na tereny miejskie i podmiejskie, gdzie może on stanowić zagrożenie dla ludzi.

MATERIAŁ I METODYKA

1. Materiał biologiczny

Odłowy kleszczy prowadzono w październiku - listopadzie 2016 r. w godzinach rannych. Pogoda była słoneczna, temperatura w dzień wahała się pomiędzy 7 a 11°C, w nocy nie notowano temperatur ujemnych. Tereny, na których były odławiane kleszcze, znajdowały się w pobliżu Kazunia Polskiego i Rembertowa (dzielnica Warszawy). Pod względem przyrodniczym stanowiły one zarośla

morning hours. The weather this time was sunny, day temperature was between 7 – 11°C; there were no night temperatures below 0°C.

Ticks were captured with flagging method. The white flannel flag 150cm long x 100cm width, was fasten to the wood stick; the higher plants were swept, the lower – dragged with it. Arthropods were then collected in the small containers, which were kept in the temp. approx. 8°C and RH 50 – 80%. In the laboratory ticks were analysed taxonomically according to the keys of Nowak-Chmura and Siuda (1) and Siuda (2).

Because of the fact that males and females of *Dermacentor reticulatus* are both blood suckers, there was no need to differentiate tick sexes. The tests were carried out on undamaged animals, actively searching for a victim - they showed negative geotropism and stayed on the edge of container in the foraging pose.

2. Volunteers

Volunteers were 2 women in the age of 30 and 45, from the staff of Medical Entomology Laboratory; they fulfilled the Informed Consent Form. They were instructed during the day of the test not to use perfums, deodorants or other cosmetics with plant oils such as: vanilla, eucalyptus, mint, cloves and not to drink alcohol and smoke cigarettes. Before the test the volunteers washed the hand skin thoroughly with odorless soap and then treated it with 70% alcohol. They took part in the repetition of tests next days.

3. Method of evaluation of repellent efficiency

The method used was elaborated in Entomological Laboratory NIPH-NIH in ISO 9001:2008 standard. It gives 100% certainty that the tested tick will not move uncontrollably on the skin or on the clothes of the volunteer. Laboratory testing ensures that environmental conditions are controlled to a greater extend than in natural tick biotopes and it allows the same standardized number of ticks to be used in successive replications. The test was verified on *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks.

In our method the volunteer's pointing finger was covered by a fragment of vinyl glove. The second finger's joint and finger up to the hand were covered by cotton adhesive plaster. On the outer and inner of hand the place of application of repellent was marked with the marker. On the marked surface of hand – approx. 30cm² the repellent was applied in the amount 1,8 – 1,6 mg/cm² (the time of application was 1 – 2 sec). The container with the tested repellent was weighted before and after application.

After 15 min the volunteer placed such prepared finger in the middle of Petri dish and the second person gently placed one tick on the cotton plaster on the finger. The tick was observed during one minute: this

i łąki na obrzeżach lasów mieszanych. Kleszcze odławiano metodą flagowania z użyciem płatów flaneli o wymiarach 150 x 100 cm, zamocowanych na drewnianych drążkach. Stosowano dwa sposoby zbierania pajęczaków: zarośla i wysokie trawy omiatano flagą, po niższych trawach flagę wleczone. Przyczepione do materiału kleszcze zdejmowano za pomocą pęsety i przekładano je do zamykanych pojemników. Następnie pajęczaki były transportowane do laboratorium NIZP-PZH, gdzie określono przynależność systematyczną kleszczy (1, 2). Kleszcze do czasu rozpoczęcia badań przechowywane były w szklanych probówkach w temperaturze 4-8°C, wilgotności 70-90%, w ciemności. Do badań wykorzystano samce i samice. Pajęczaki były oceniane pod kątem: ich ruchliwości, agresywności i czy wykazują one skłonność do przemieszczania pionowego w górę (geotropizm ujemny). Kleszcze agresywne, przemieszczające się pionowo w górę po ściankach pojemnika i pozostające na jego krawędzi w pozycji poszukiwania żywiciela były wykorzystywane do badań.

2. Osoby biorące udział w badaniach – ochotnicy:

W badaniach wzięło udział 2 ochotników – pracowników Samodzielnej Pracowni Entomologii Medycznej i Zwalczania Szkodników (2 kobiety w wieku 30 i 45 lat), którzy uczestniczyli w powtórzeniach w kolejnych dniach. Osoby biorące udział w badaniach repelentów wypełniły kwestionariusz zgody na badania. W dniu badania nie stosowały one perfum, dezodorantów i innych kosmetyków zawierających w swoich kompozycjach olejki i aromaty mogące odstraszać kleszcze: wanilie, geranium, goździki itp.

3. Badanie repelentów stosowanych na skórę.

Do celów badania wykorzystano autorską metodę badania skuteczności repelentów (podlegającą normie ISO 9001:2008), opracowaną w Samodzielnej Pracowni Entomologii Medycznej i Zwalczania Szkodników NIZP-PZH. Została ona zweryfikowana na dwóch gatunkach kleszczy: *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Metoda bazuje na ekspozycji kleszcza na cieple osoby przeprowadzającej badanie. Jednocześnie jej skóra jest zabezpieczona w taki sposób, aby uniemożliwić wkłucie się stawonoga, a repelentem traktowane jest miejsce powyżej osłony.

Ochotnicy aplikowali każdy z badanych preparatów cienką warstwą - w sposób proponowany w etykiecie - na skórę palca i części dłoni ponad osłonę zabezpieczającą palec wskazujący. Repelentem traktowane było ok. 30 cm² skóry, czas opryskiwania wynosił 1 - 2 sekundy (aplikowana ilość repelentu wynosiła 1,6–1,8 mg/cm²). Po 15 minutach na środku przygotowanej wcześniej płytki Petriego umieszczono „traktowany” preparatem palec a druga osoba wykładała jednego kleszcza na granicę palec - bibuła. Obserwacja zachowania kleszcza trwała minutę (czas ten jest wystarczający do oceny zachowania pajęczaka). Po tym

time was enough to evaluate the tick's behavior: the movement up or down or falling away from the treated hand. The positive (not repelled) reacting tick was when it walked up and entered the treated area (marked as 1); the negative (repelled) tick was, when it walked down on the finger, fall away or walked on the finger around (marked as 0).

5 ticks were tested on 1 volunteer in one time point and then next 5 ticks on the hand of second volunteer (20 ticks in one time point together on 2 volunteers, because tests were replicated). Between tests the fingers of volunteers were protected that the repellent does not be wiped off. Ticks exposed on the second hand of the volunteer prepared in the same way in the same time were the control group. The study was carried out in laboratory room, where 23 – 24°C and RH 50 – 60% were kept.

4. Tested products

Repellents for the tests were chosen from products present on Polish market, having positive opinions of Biocidal Products Registration Bureau, containing one or more active ingredients. Products were marked with letters A,B,G,D respectively; the names of active ingredients, their concentration in the products, formulation were given in Table 1. All products were sprays to application on skin with the airpump.

5. Assessment of repellency time and statistical analysis

For each time point the efficacy of the each repellent was evaluated as repellency - R (%):

$$\text{Repellency } R(\%) = [(C - T)/C] \times 100$$

Where:

R (%) - repellency

C – No of ticks in control for a given time point

T – No of ticks entered treated skin by repellent

The R values and their standard deviations are showed on Fig. 1.

Results obtained were analysed taking into account directions from EU TNsG on Product Evaluation. The criterion of good efficacy in this guidance was 90% or more of repellency after 90min (1.5 hour) at least (7).

Results of efficacy of tested repellents were showed in the Table No I. and Fig. 1.

Obtained results were elaborated with the logistic regression test in Stats Direct Computer Programme. In the model the time after application of repellent/reaction of ticks and the type of repellent was analysed. Results were given as quotient ratio (OR) of fact, that a tick could enter a skin treated by a repellent (Table II). For the result's elaboration we define a repellent A containing 30% DEET as the reference preparation.

czasie kleszcz był zabierany, a wynik odnotowywano: wynikiem dodatnim (1) było przejście kleszcza przez noga, traktowaną skórę palca; wynikiem ujemnym (0) była ucieczka z palca lub chodzenie po palcu, ale nie przejście przez traktowaną preparatem powierzchnię. Czynności te wykonywano do chwili wyczerpania agresywnych kleszczy z danej partii (5 sztuk). Następnie ochotnicy zamieniali się rolami i badana była druga partia - następne 5 stawonogów.

Kolejne testy wykonywano co godzinę, na nowych kleszczach, po 5 na każdego ochotnika w danym punkcie czasowym. Między testami chroniono traktowany repelentem palec przed starciem substancji. Każdy ochotnik wykonywał 2 powtórzenia badania dla jednego preparatu (w jednym punkcie czasowym testom poddawanych było 20 kleszczy).

Doświadczenie prowadzono w pomieszczeniu w temperaturze 23 – 24°C i wilgotności względnej 50 – 47%.

4. Preparaty użyte do badań

Repelenty do badań skuteczności odstraszenia kleszczy *Dermacentor reticulatus* wybrano spośród produktów dopuszczonych na rynek przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Preparaty te (oznaczone literami A,B,C,D na użytek doświadczenia) zawierały w swoim składzie różne substancje czynne, w różnych stężeniach (Tab. I.) Wszystkie preparaty były w formie użytkowej przeznaczonej do aplikacji na skórę za pomocą atomizera.

5. Obliczenia czasu odstraszenia oraz analiza statystyczna

Procent odstraszenia kleszczy przez badane preparaty po każdym kolejnym przedziale czasowym, do czasu zakończenia ekspozycji obliczono wg wzoru:

$$R(\%) = [(C - T)/C] \times 100$$

gdzie:

R(%) – procent odstraszenia, C – liczba kleszczy wziętych do badania w danym przedziale czasowym, T – liczba kleszczy, które przeszły przez traktowaną repelentem powierzchnię skóry.

Kryteria oceny skuteczności działania repelentu:

Do oceny skuteczności działania repelentów zastosowano kryteria zgodne z wytycznymi zamieszczonymi w przewodniku Unii Europejskiej (7), gdzie przyjęto, że preparaty skuteczne wykazują od 90% włącznie do 100% odstraszenia po 1,5 godz. (90 min) lub dłuższym. Doświadczenie przerywano, jeżeli skuteczność produktu obniżała się znacznie w czasie tak, że nie było spełnione powyższe kryterium.

Wyniki przedstawiono na rycinie nr 1 oraz w tabeli I.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą metody regresji logistycznej.

RESULTS

Fig. 1. shows changes in tick repellency vs time when a product was applied on human skin. Up to 1.5 hour all tested repellents showed very good efficiency: A, G, D – 100%; C – 95% respectively. The repellency was lower in the case of product C: soon after 1.5 h till 4 h it not exceeded $85\pm 5\%$. Product G was efficient till 90min and then its ability to repel ticks went down until 40% in 4 hour (Fig.1).

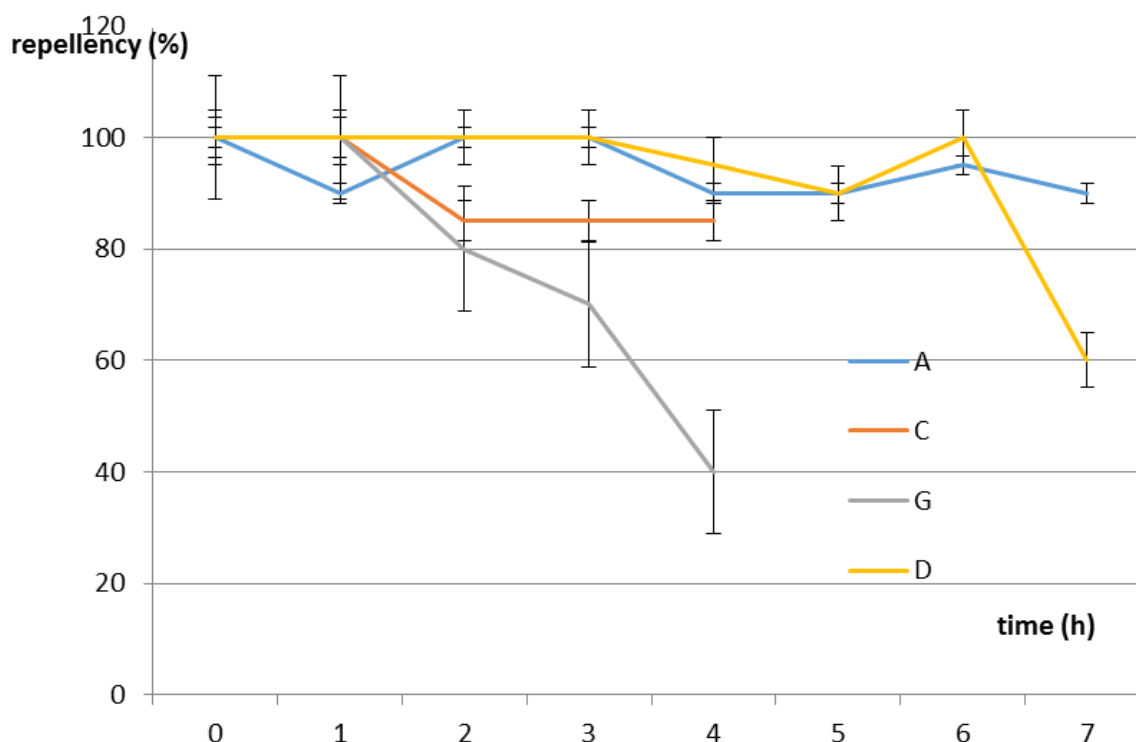


Fig. 1. Efficiency of repellents A, C, D, G containing different active ingredients against *Dermacentor reticulatus* ticks expressed as percentage of repelled ticks vs time after application of biocidal product.

Ryc. 1. Skuteczność repelentów A, C, D, G zawierających różne substancje aktywne w stosunku do kleszczy *Dermacentor reticulatus* wyrażona jako odsetek odstrasżanych kleszczy w stosunku do czasu po aplikacji produktu biobójczego.

After 4 h repellency showed by products A and D was higher and reached $90\pm 10\%$ and $95\pm 5\%$. The critical value 90% of efficient repellency was achieved after 5 and 7 h in the case of A product; after 1.4 h ($85,3\pm 15\text{min}$) in the case of C; after 1.8 h ($105\pm 15\text{min}$) in the case of G and after 6 h in the case of D (Fig.1.).

During every hour of remaining of repellent film on the skin, a chance of entering a tick on it rose at 170% (2.7 times). This proportion was statistically significant (Tab .2). Taking all tested products into account, the chance of entering the skin treated with the repellent C was 2.86 higher in comparison to A (reference agent); in the case of preparation G the chance of entering of a tick on the skin treated with it was 7.78 higher than reference product A. However, a chance of entering of a tick on skin treated by D was 77% lower than for the reference preparation (this relation is not statistically significant).

WYNIKI

Na ryc. 1 przedstawiono zmiany odstrasżania kleszczy w upływającym czasie przez badane repelenty zastosowane na skórze człowieka. Jak wynika z danych na ryc.1 wszystkie badane preparaty zawierające różne substancje aktywne wykazywały bardzo dobrą minimalną skuteczność spełniającą kryterium dla repelentów mogących się znaleźć na rynku europejskim: 90% i powyżej odstrasżania po 1,5 godz.: preparaty oznaczone literami A,G,D – 100%; preparat C - 95%. Po upływie 1,5 godziny odstrasżanie kleszczy przez środek C było mniej skuteczne i osiągało $85\pm 5\%$ dla tego preparatu zawierającego 20% Ikaridyne. Taki wynik utrzymywał się do czasu 4 godzin – 240 min obserwacji). (Fig. 1.) W przypadku preparatu G zawierającego 12% IR3535 właściwości odstrasżające skóry nim pokrytej malały do wartości 40% w czasie 4 godzin (240 min) obserwacji.

Table I. Time after application, when products A, C, D, G were effective against *Dermacentor reticulatus* ticks ($90\geq$ - 100% repellency).Tabela I. Czas od aplikacji, w którym repelenty A, C, D, G wykazywały skuteczne działanie odstrasżające na kleszcze *Dermacentor reticulatus* ($90\geq$ - 100% odstrasżania).

Lp.	Produkt Product	Substancje czynne Active ingredients	Czas od aplikacji (min± błąd st.) Time after application (min± standard error)
1.	A	DEET 30%	420.0±5.0
2.	C	Ikaridyna 20%	85.0±15.0
3.	D	DEET 30%, IR3535 20%, geraniol 0,1%	360.0±5.0
4.	G	IR3535 12%	105.0±15.0

DISCUSSION

The aim of our study was to investigate the sensitivity of ticks *Dermacentor reticulatus* to four repellent agents containing DEET, Icaridin, IR3535 and mixture of three active ingredients: DEET, IR3535 and geraniol, respectively.

Dermacentor reticulatus is the second most often reported tick species after *Ixodes ricinus* in central Europe. Its distribution changes according to climate, land use patterns and forest management (8, 9). It is an ideal arthropod vector: has a high reproduction rate, an ability to survive and even spread within variable habitats. It is able to be a host and transmit a great variety of pathogens e.g. *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* (s.l.), *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*, *Bartonella henselae*, *Salmonella typhimurium* (3, 10, 11).

The most effective means for preventing tick attachment and contraction of tick-vector disease organisms is: limiting exposure to tick habitat, thorough self-examination after contact with tick and using of personal arthropod repellents. The most known repellents applied to the skin could contain active ingredients such as: DEET, ethyl butylacetylaminopropionate (IR3535), 1-methyl-propyl-2-(hydroxyethyl)-1-piperidinecarboxylate (Icaridin), p-menthane-3,8-diol (PMD), 1S,2S-2-methylpiperidinyl-3-cyclohexene-1-carboxamide (SS220) and racemic 2-methylpiperidinyl-3-cyclohexene-1-carboxamide (AI3-37220). Most repellents present on the market contain one of three first mentioned active ingredients, or mixture of them.

Our study demonstrated the repellent effect of four products containing DEET, Icaridin, IR3535 and mix of three compounds: DEET, IR3535 and geraniol, respectively. The effectiveness of these biocidal products to adult ticks were different. At 90 minutes after application, repellents A (DEET 30%), D (DEET 30%, IR3535 20%, geraniol 0.1%) and G (IR3535 12%) gave a 100% protection against ticks, but efficacy of repellent C (Icaridin 20 %) dropped to 95%. After four hours, the efficacy of repellents: A and D was still high compared to

Po upływie 4 godzin odstrasżanie kleszczy eksponowanych na skórze traktowanej preparatem A (30% DEET) oraz preparatem D (DEET 30%, IR3535 20%, geraniol 0,1%) było wyższe niż środków omawianych wcześniej - przekraczało $90\pm 10\%$ oraz $95\pm 5\%$ odpowiednio. Krytyczną wartość 90% odstrasżania, przyjętą za kryterium skuteczności (7) obserwowano w przypadku preparatu A po upływie 7 godzin (420 min), w przypadku produktu C – po upływie 1,4 godziny ($85,3\pm 15$ min). Dla preparatu G było to 1,8 godziny (105 ± 15 min); a dla produktu D – 6 godzin (360min) – Tab. I.

Podczas każdej godziny pozostawiania repelentu na skórze szansa (OR) wejścia kleszcza na powierzchnię traktowaną rosła o 170% (2,7 razy). Wartość ta była istotna statystycznie (Tab. II). Szanse wejścia kleszcza na skórę pokrytą preparatem C była 2,86 razy większa w porównaniu do użycia preparatu referencyjnego A; W przypadku produktu G szansa to była 7,78 razy większa niż dla preparatu A. Dla repelentu D natomiast szansa penetracji powierzchni skóry pokrytej tym preparatem była 77% mniejsza (wartość nieistotna statystycznie, Tab. II).

Table II. Comparison of efficacy of C, D, G repellent products vs reference product A containing 30% DEET, expressed as odds ratio (OR) of tick passage on the skin covered by repellent

Tabela II. Porównanie działania produktów C, D G odstrasżających kleszcze w stosunku do preparatu referencyjnego A, zawierającego 30% DEET wyrażone jako iloraz szans (OR) przejścia kleszcza przez skórę pokrytą repelentem

		OR	95% P.U.	p
Czas (time)		2.70	(1.87- 3.89)	<0.001*
Repellent	A (ref)	1.00		
(Product)	C	2.86	(0.58-14.17)	0.198
	D	0.23	(0.02-2.72)	0.246
	G	7.78	(1.66,36.52)	0.009*

* zależność istotna statystycznie (statistically significant)

other repellents: 90% and 95%, respectively. Product A was the most effective against *Dermacentor reticulatus*, because its effectiveness after 7 hours of application was still 90%. Slightly less effective was the repellent D, which in this time was in 60% efficient against ticks. Repellents C (Icaridin 20%) and G (IR3535 12%) gave less protection: in four hours after application their efficacy was 85% and 40%, respectively. These results of repellency could not fit efficacy criterion included in EU Guidance on the Biocidal Product Regulation (7). Although DEET is considered by many authors to be the gold standard of insect repellents, there are limited data in the literature on its efficacy against the tick *Dermacentor reticulatus*. We suppose that our study is the first one to confirm the high efficacy of several repellents against this tick species. Büchel et al. (13) stated that application of 20% DEET resulted in median complete protection times between 4 and 4,5 h against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs. On the other hand Žáková (14) used 7% DEET in their experience, and this product efficiently repelled 74% of the *Ixodes ricinus* nymphs. Another repellent used by this author containing DEET 25% and <1% permethrin was effective at 98% relative to *I. ricinus*, and other product with DEET 14% and deltamethrin 0.01% gave 94% protection (14). Similarly, in our experiment repellent D contained DEET 30%, IR3535 20% and geraniol 0.1% had a 100% effectiveness in protection against *D. reticulatus*. The use of repellent G containing only IR3535 12% was effective at 100% during the first 90 minutes of the experiment, and then the efficacy was reduced to 40% in the fourth hour of the test. Bissinger and (15), who tested the efficacy of IR3535 19.6% versus *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* on cotton cloths, found its efficacy at around 90% after 3 to 3.5 hours of application. Carroll et al. (16) investigated the efficacy of DEET, Icaridin, and IR3535 in relation to the *Amblyomma americanum* tick. As in our experiment (where we used IR3535 12%), the authors stated that IR3535 10% lotion was significantly less effective than the formulations with higher concentration of repellent. Similar results were obtained by Schreck et al (17).

Our results suggested that product containing 20% Icaridin do not repel *Dermacentor reticulatus* ticks efficiently (R value in 4 hour did not exceeded 85%). Similar efficacy of 20% Icaridin was reported by Semmler et al. (18) in the period of 4-5 hours after application for the tick species *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus sanguineus*. The other used repellent with 5.8% Icaridin and geraniol was slightly longer effective: for 6 hours against the same tick species.

Otherwise, Büchel et al. (13) reported that the application of 10% of Icaridin solution resulted in complete protection time: for *Ixodes scapularis* nymph that was 5 h and 8 h for *Ixodes ricinus* nymph respectively.

DYSKUSJA

Celem pracy było zbadanie wrażliwości kleszczy *Dermacentor reticulatus* na repelenty zawierające różne substancje aktywne. Kleszcz ten jest drugim co do częstości wykazywanym kleszczem po *Ixodes ricinus* (8, 9) w Europie Centralnej. Jego występowanie zmienia się w zależności od klimatu, proporcji ziemi uprawnej i nieużytków, terenów leśnych. *Dermacentor reticulatus* charakteryzuje się cechami bardzo dobrego wektora: posiada duże możliwości reprodukcyjne, zdolność do przeżywania i rozprzestrzeniania się w różnorodnych środowiskach. Ponadto może być gospodarzem i przenosicielem wielu patogenów, np. *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* (s. l.), *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* (ssp. *holarctica*), *Bartonella henselae*, *Salmonella typhimurium* (3, 10,11).

Zapobieganie chorobom przenoszonym przez kleszcze w dużej mierze zależy od stosowania indywidualnych środków ochrony: oglądania ciała po pobycie w środowisku bytowania kleszczy oraz stosowania środków odstraszających – repelentów o skuteczności dostosowanej do czasu przebywania na zewnątrz (12). Substancje aktywne występujące najczęściej w środkach odstraszających to: DEET (N-N-dietylo-m-toluamid), IR3535 (ester etylowy kwasu 3-(N-n-butylo-N-acetylo)aminopropionowego, Ikarydyna (kwas 1-piperidynokarboksylowy), PMD (p-mentan-3,8-diol), także SS220 (1S,2S-2-metylopiperidynylo-3-cyklohekseno-1-karboksyamid) oraz AI3-37220 (racemiczny 2-metylopiperidynylo-3-cykloheksano-1-karboksyamid). Większość preparatów - repelentów występujących na rynku zawiera jedną z pierwszych trzech substancji wspomnianych powyżej lub ich kombinację.

W pracy przedstawiono zróżnicowanie efektu repellentności preparatów w zależności od kompozycji środka odstraszającego. Produkty, które zawierały różne substancje aktywne, odstraszały kleszcze *Dermacentor reticulatus* w niejednakowym stopniu. Po 90 minutach od aplikacji repelent A (DEET 30%), D (DEET 30%, IR3535 20%, geraniol 0,1%) i repelent G (IR3535 12%) wykazywały 100% ochrony przed kleszczami, a skuteczność produktu C (Ikarydyna 20%) wyniosła 95%. Po 4 godzinach skuteczność produktów A i D była wciąż wysoka (odpowiednio 90% i 95%) w porównaniu z pozostałymi repelentami, których skuteczność spadała. Produkt A (zawierający 30% DEET) wykazał najlepszą skuteczność w odstraszaniu kleszczy *Dermacentor reticulatus*: po 7 godzinach od aplikacji nadal odstraszał 90% kleszczy. Nieco słabiej działał preparat D (zawierający DEET 30 %, IR3535 20% i 0,1% geraniolu): po tym czasie obserwowano 60% kleszczy nie-wkraczających na skórę pokrytą tym produktem. Produkty C i G wykazywały widoczne działanie odstraszające kleszcze tylko w granicach do 4 godzin, lecz było ono wyraźnie słabsze, odpowiednio: 85% i 40%. Wartości te nie mieściły się w kryterium skutecznego działania repelentu zawartego w wytycznych Unii Europejskiej (7).

Dautel (19) mentioned in his article, that important problem in the research and development of new tick repellents is the lack of standardized testing method. Early discovery of repellents was directed on rapidly identify broad-spectrum, non-irritating, non-plasticizing repellents that exhibited long-lasting efficacy, and little thought was given to developing a standardized testing method.

It should be taken into consideration that all active ingredients used in biocidal products dedicated against ticks were further synthesized as repellents against mosquitoes. Their use against ticks was connected with the necessity of protecting people against tick borne diseases similarly as they protect against mosquito borne diseases. None of mentioned above active ingredient was synthesized as tick repellent; its ability to repel ticks was discovered in later tests.

Many methods of evaluation efficacy both repellent biocidal products and active ingredients on different tick species (20) do not result in unambiguous answer what products are the best repellents against ticks. According to Semmler et al (18) results of testing the repellent activity of compounds against ticks may vary with respect to the length of protection depending on: the mode of testing, the formulation of the product (several additives may reduce evaporation of active ingredient from the skin), the concentration of the active ingredient, the developmental stage of the tick species, the fitness of the stage, the tick species tested, and the amount of the product that is applied on the skin.

CONCLUSIONS

1. The most efficient repellent products against *Dermacentor reticulatus* ticks in our study were: Product A – containing 30% DEET and D – containing 30% DEET, 20% IR3535 and 0.1% geraniol.
2. Biocidal products containing 20% Icaridine and 12% IR3535 acted efficiently against *Dermacentor reticulatus* ticks until 90min.
3. Action should be undertaken to standardization of testing tick repellent efficiency methods so as results could be comparable.

Acknowledgments

The authors thank the Military Institute of Hygiene and Epidemiology in Warsaw, Poland, for the financial support for this study.

Pomimo tego, że DEET jest uważany przez wielu autorów za „złoty standard” związku odstraszaającego stawonogi, w piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących jego działania na kleszcze *Dermacentor reticulatus*. Prezentowana praca jest więc prawdopodobnie pierwszym doniesieniem dotyczącym wrażliwości tego stawonoga na DEET.

Buchel i wsp. (13) stwierdzili, że zastosowanie 20% DEET powodowało całkowite odstraszenie kleszczy *Ixodes ricinus* i *I. scapularis* odpowiednio po 4 i 4,5 godzinach. Żakowska (14) po zastosowaniu 7% DEET uzyskała 74% odstraszenia nimf *Ixodes ricinus*. Testując inne produkty zawierające 25% DEET i <1% permetryny oraz 25% DEET i <0,01% deltametryny autorka ta uzyskała 98% ochrony przed kleszczami *Ixodes ricinus*. W naszych badaniach produkt zawierający 30% DEET, 20% IR3535 i 0,1% geraniolu odstraszał kleszcze *Dermacentor reticulatus* w pełni efektywnie – 90% i powyżej do 6 godzin po aplikacji (Ryc. 1).

Zastosowanie produktu G zawierającego 12% IR3535 było w pełni skuteczne do 90 minut od aplikacji, następnie jego skuteczność obniżała się do 40% w czwartej godzinie eksperymentu. Bissinger i Roe (15), którzy testowali skuteczność produktu zawierającego 19,6% IR3535 w stosunku do kleszczy *Amblyomma americanum* i *Dermacentor variabilis* na bawełnianej materii stwierdzili skuteczność rzędu 90% w czasie 3 – 5 godzin po aplikacji. Carroll i wsp. (16) badali aktywność DEET, ikarydyny i IR3535 w stosunku do kleszczy *Amblyomma americanum*. Autorzy ci stwierdzili, że lotion zawierający 10% IR3535 był znacząco mniej skuteczny niż inne formy użytkowe zawierające więcej IR3535 lub inne substancje aktywne. Podobne wyniki uzyskali Schreck i wsp. (17). Wyniki uzyskane w naszej pracy pokazały, że produkt zawierający 20% Ikarydyny był skuteczny w stosunku do kleszczy *Dermacentor reticulatus* po 4 godzinach od aplikacji w 85%. Zbliżone rezultaty (4 – 5 godzin po aplikacji) uzyskali Semmler i in. (18) dla 20% ikarydyny w stosunku do kleszczy *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus* i *Rhipicephalus sanguineus*. Inny stosowany przez tych autorów repellent zawierający 5,8% ikarydyny i geraniol był skuteczny dłużej – ok. 6 godzin w stosunku do kleszczy z tych samych gatunków. Buchel i wsp. (13) z kolei donosili, że aplikacja 10% roztworu ikarydyny zabezpiecza całkowicie przed atakiem nimf *Ixodes scapularis* przez 5 godzin, a przed nimfami *Ixodes ricinus* – chroni przez 8 godzin.

Dautel (19) stwierdził, że problemem w opracowywaniu i testowaniu nowych repellentów jest brak wystandaryzowanych procedur ich testowania. Wcześniejsze badania nad substancjami o cechach repellentów były prowadzone bardziej w kierunku określenia ich spektrum działania na gatunki stawonogów i czasu odstraszenia, a nie rozwijania standardowych technik badania skuteczności. Należy zwrócić także uwagę, że wszystkie

REFERENCES

- Nowak-Chmura M., Siuda K. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann. Parasitol* 2012;58:125-155.
- Siuda K. Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. II. Systematyka i rozmieszczenie. Monografie Parazytologiczne vol. 12, 1993, ed. Polish Parasitological Society, Warsaw.
- Földvári G., et al. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & Vectors* 2016;9:314-342
- Aubry C., et al. Bacterial agents in 248 ticks removed from people from 2002 to 2013. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(3):475-481.
- Földvári G., Rigo K., Lakos A. Transmission of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;76:387-9.
- Estrada-Pena A., Jongejan F. Tick feeding on humans: a review on records on human-biting Ixodidea with special reference to pathogen transmission. *Exp. Appl. Acarol.* 1999;23:685-715.
- PT18 – insecticides, acaricides and other Biocidal Products against Arthropods + PT19 Repellents & Attractants (arthropods), in: Guid. On Biocidal Products Regulation (efficacy) Ver.3.0, 30 April 2018, ECHA, EU: 188 - 237
- Medlock JM, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. *Parasit Vectors* 2013; 6:1
- Karbowiak G. The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick – its expansion to new areas and possible causes. *Ann Parasitol* 2014;60:37-47.
- Mierzejewska E J, et al. Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasites Vector* 2015;8:490.
- Wójcik-Fatla A, et al. Potencjalna rola kleszczy z gatunków *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* w krążeniu pasożytniczych pierwotniaków: *Theileria spp.*, *Babesia spp.* i *Toxoplasma gondii* w środowisku naturalnym. *Med. ogólna i n. zdr.* 2016;22(3):165-168
- Cisak E, et al. Repellents and acaricides as personal protection measures in the prevention of tick-borne diseases. *Annals of Agric. Envir. ed.* 2012;19(4): 625-630.
- Büchel K., et al. Repellent efficacy of DEET, Icaridin, and EBAAP against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs (Acari, Ixodidae). *Ticks Tick-Borne Dis.* 2015;6:494-498.
- Žáková A. Activity of the tick *Ixodes ricinus* monitored in a suburban park in Brno, Czech Republic, in association with the evaluation of selected repellents. *J Vector Ecol* 2013; 38: 295-300.
- Bissinger B., Roe M. Tick repellents: Past, present and future. *Pestic. Biochem. Phys.* 2010;96:63-79.
- Carroll J.F., Benante J.P., Kramer M., Lohmeyer K.H, Lawrence K. Formulations of deet, picaridin, and IR3535 applied to skin repel nymphs of the lone star tick (Acari: Ixodidae) for 12 hours. *J Med Entomol.* 2010;47(4): 699-704
- Schreck C E, Fish D, McGovern T P. Activity of repellents applied to skin for protection against *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc* 1995;11:136-140.
- Semmler M, et al. Comparison of the tick repellent efficacy of chemical and biological products originating from Europe and the USA. *Parasitol Res* 2011;108: 899-904.
- substancje występujące w repelentach przeciwko kleszczom były wcześniej dedykowane głównie odstraszeniu komarów, a ich stosowanie przeciwko kleszczom wynikało z przyczyn znalezienia wśród dotychczas znanych repelentów takich, które uchronią ludzi przed chorobami przenoszonymi przez kleszcze podobnie, jak chronią przed chorobami przenoszonymi przez komary. Żadna z wymienionych powyżej substancji aktywnych nie została zsyntetyzowana docelowo jako związek do odstraszenia kleszczy; właściwość ta została stwierdzona w dalszych badaniach. Wielość stosowanych metodyk oceny działania repelentnego preparatów i substancji aktywnych w stosunku do różnych gatunków kleszczy (20) nie sprzyja uzyskaniu jednoznacznej odpowiedzi na pytanie: „jakie produkty najskuteczniej odstraszą kleszcze”. Wg Semmlera i wsp. (18) na różnice w działaniu produktów komercyjnych wpływają: zastosowana substancja aktywna, jej stężenie, forma użytkowa (niektóre komponenty powodują mniejsze odparowywanie substancji aktywnej ze skóry), ilość aplikowanej substancji aktywnej. Nie bez znaczenia jest także sposób prowadzenia doświadczenia, gatunek i stadium rozwojowe kleszcza i jego stan biologiczny.

WNIOSKI

- Najbardziej skutecznymi repelentami w stosunku do kleszczy *Dermacentor reticulatus* okazały się produkty: A - zawierający 30% DEET oraz D – zawierający 30% DEET, 20% IR3535 i 0,1% geraniolu.
- Produkty zawierające 20% ikarydiny oraz 12% IR3535 odstraszały kleszcze z gatunku *Dermacentor reticulatus* skutecznie przez 1,5 godz. (90 min).
- Istnieje potrzeba podjęcia działań w celu standaryzacji badań skuteczności repelentów tak, aby jednolita metodyka umożliwiała porównywanie wyników.

19. Dautel H. Test systems for tick repellents. *Int. J. Med. Microbiol* 2004; 293, Suppl. 37:182-188.

20. Gliniewicz A, Mikulak E, Przygodzka M., 2017. Methods of testing repellent efficiency against ticks. *Przegl. Epidemiol.* 2017;71 (3):457-465

Received: 20.11.2018

Accepted for publication: 17.02.2019

Otrzymano: 20.11.2018 r.

Zaakceptowano do publikacji: 17.02.2019 r.

Address for correspondence:**Adres do korespondencji:**

Dr Aleksandra Gliniewicz

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-PZH

Ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Tel. 22 54 21 331

e-mail: agliniewicz@pzh.gov.pl