



# Resumen

### **Antecedentes**

Se evaluó el efecto preventivo de las tabletas masticables de fluralaner (Bravecto®) contra la transmisión de Babesia canis por garrapatas Dermacentor reticulatus.

### **Conclusiones**

Una única administración oral de tabletas masticables de fluralaner previno eficazmente la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus* infectadas durante un periodo de 12 semanas.

# Palabras clave

Bravecto, Babesia canis, Babesiosis, Tabletas masticables, Fluralaner, Dermacentor reticulatus, Perro, Eficacia, Efecto preventivo, Garrapata, Enfermedad transmitida por garrapatas, Bloqueo de la transmisión

### Métodos

Dieciséis perros, analizados como negativos para *B. canis* por PCR e IFAT, fueron asignados a dos grupos de estudio. El día 0, los perros de un grupo (n = 8) fueron tratados una vez por vía oral con un comprimido masticable de fluralaner según las recomendaciones de la etiqueta y los perros del grupo de control (n = 8) permanecieron sin tratar. En los días 2, 28, 56, 70 y 84, los perros fueron infestados con 50 (±4) garrapatas *D. reticulatus* infectadas por *B. canis*, con recuentos de garrapatas in situ 48 ±4 h después de la infestación. Antes de cada infestación, se confirmó que las garrapatas *D. reticulatus* albergaban *B. canis* mediante un análisis de PCR. En el día 90, se contaron y retiraron las garrapatas de todos los perros. Se calculó la eficacia contra las garrapatas para cada punto de tiempo de evaluación. Después del tratamiento, todos los perros fueron examinados físicamente junto con la recogida de sangre para PCR cada 7 días, se recogieron muestras de sangre para IFAT cada 14 días y se midió la temperatura corporal rectal del perro tres veces por semana. A los perros que mostraban signos de babesiosis o eran positivos a la PCR, se les tomaba un frotis de sangre y, en caso de ser positivos, los perros eran rescatados y sustituidos por un perro de reemplazo. El efecto preventivo se evaluó comparando los perros infectados del grupo tratado con los perros infectados del grupo de control no tratado.

### Resultados

Todos los perros de control se infectaron con *B. canis*, como se confirmó por PCR e IFAT. Ninguno de los 8 perros tratados se infectó con *B. canis*, ya que la IFAT y la PCR fueron negativas durante todo el estudio hasta el día 112. El comprimido masticable fluralaner fue 100 % eficaz contra las garrapatas en los días 4, 30, 58 y 90, y se alcanzó una eficacia del 99.6 % y el 99.2 % en el día 72 y el día 86 después del tratamiento, respectivamente. Durante las 12 semanas de duración del estudio, se demostró un efecto preventivo del 100 % contra la transmisión de *B. canis*.





# Parásitos &Vectores

### **Antecedentes**

La babesiosis canina, causada por protozoos del género *Babesia* a través de la picadura de una garrapata vectora, es una enfermedad clínicamente importante transmitida por garrapatas. En Europa se han identificado hasta ahora cuatro especies de *Babesia* que afectan a los perros. *Babesia canis*, Babesia vogeli, *Babesia gibsoni y Babesia vulpes* sp. nov., anteriormente conocida como *Babesia microti*-like [1-3]. De estas especies, *B. canis* es la más ampliamente distribuida en Europa, coincidiendo con la distribución de su vector conocido *Dermacentor reticulatus*, la garrapata del perro. *B. vogeli* se encuentra con mayor frecuencia en la cuenca mediterránea, donde *Rhipicephalus sanguineus* es la especie de garrapata predominante. La especie *Babesia vulpes* sp. nov. parece estar centrada en el noroeste de España, mientras que la aparición de *B. gibsoni* es más esporádica [2, 4].

Babesia spp. son protozoos intracelulares que habitan en los glóbulos rojos del huésped. Los signos clínicos de la babesiosis en los perros varían desde una enfermedad leve y transitoria hasta una enfermedad aguda debida a una hemólisis grave que provoca rápidamente la muerte. Los hallazgos clínicos incluyen membranas mucosas pálidas, temperatura corporal elevada, anorexia, ictericia, pirexia y agrandamiento esplénico y hepático [2]. Sin embargo, la gravedad de la enfermedad depende de varios factores, como la especie de Babesia implicada, la edad y el estado inmunitario del perro y la presencia de otras enfermedades infecciosas [4].

La babesiosis canina es una de las enfermedades transmitidas por garrapatas más frecuentes en todo el mundo [5]. Debido al aumento del número de propietarios de animales de compañía, a que éstos viajan con ellos y a la capacidad de los artrópodos vectores para establecerse en nuevas localidades [6], las garrapatas y las enfermedades transmitidas por ellas se están extendiendo por todo el mundo y ya no se limitan a determinadas zonas.

Una vez que la garrapata infectada se ha adherido al perro, el riesgo de transmisión del patógeno de la garrapata al perro aumenta por la alimentación sostenida. En la mayoría de los sistemas de enfermedades transmitidas por garrapatas, tras la adhesión inicial de la garrapata, se requiere un periodo de alimentación de al menos 24 a 48 horas antes de que se produzca la transmisión de protozoos [7]. Para prevenir la transmisión del patógeno, es necesario matar a la garrapata infectada dentro de este periodo de tiempo. Para cuantificar la dinámica de transmisión de los

patógenos transmitidos por garrapatas, se han desarrollado modelos de garrapatas que bloquean la transmisión. Este modelo incluye un número suficiente de perros tratados para comprobar la duración de la actividad preventiva, además de un grupo de control no tratado en el que la mayoría de los perros se infectan con el patógeno transmitido por las garrapatas.

En el presente estudio, los perros fueron tratados una vez por vía oral con tabletas masticables de fluralaner (Bravecto®). Fluralaner, un nuevo ectoparasiticida de la nueva clase de isoxazolina, ejerce su acción principal a través de la actividad alimentaria, con una duración de la eficacia de más de 12 semanas, lo que resulta en la muerte inmediata y persistente de las garrapatas y pulgas en los perros [8]. Como el fluralaner es un ectoparasiticida de acción sistémica, su eficacia depende de que las garrapatas se adhieran a la piel del huésped y comiencen a alimentarse, ingiriendo así el compuesto activo. Debido a la rapidez con la que mata a las garrapatas en las 12 horas siguientes a su adhesión [9], en el estudio descrito se probó el potencial del fluralaner administrado por vía oral para prevenir la transmisión de *B. canis*.

# **Métodos** Preparación del Estudio

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas (Lineamientos VICH GL9, Buenas Prácticas Clínicas, EMA, 2000), y cumplió con la Norma Nacional Sudafricana "SANS 10386:2008: The care and use of animals for scientific purposes" y se obtuvo la aprobación ética del Comité de Ética Animal de ClinVet (CAEC) antes del inicio del estudio. El estudio se llevó a cabo como un estudio de eficacia controlado negativo, parcialmente ciego y aleatorizado.

Se utilizaron 16 perros de razas mixtas (8 machos, 8 hembras) que dieron negativo en la prueba de ADN babesial por análisis de PCR y negativo en los anticuerpos de *B. canis* (IFAT) antes del tratamiento. Todos los perros incluidos tenían entre 1 y 8 años de edad y pesaban entre 13.2 y 26.9 kg. Cada perro gozaba de buena salud; no había sido tratado con ningún producto de control de parásitos en los 3 meses anteriores a un periodo de aclimatación de 7 días; no albergaba ninguna garrapata antes del tratamiento; y estaba identificado de forma única por un número de microchip.

Antes de la aleatorización, los perros fueron examinados

1MSD Animal Health Innovation GmbH, ZurPropstei, 55270 Schwabenheim, Alemania. La lista completa de información de los autores está disponible al final del artículo.





<sup>\*</sup>Correspondencia: janina.taenzler@msd.de



clínicamente y pesados. Los perros se clasificaron dentro del género según el peso corporal y se asignaron aleatoriamente a dos grupos de estudio (un grupo de tratamiento y otro de control) de 8 perros cada uno utilizando una lista de aleatorización generada por computadora.

Todos los perros se mantuvieron en el interior y se alojaron individualmente durante el curso del estudio. La temperatura en las instalaciones para perros oscilaba entre 15,1 y 27,9 °C y la humedad relativa entre 21,9 y 66,4%. Todos los perros fueron alimentados con un alimento seco estándar disponible en el mercado una vez al día y se les proporcionó agua potable ad libitum.

### **Tratamiento**

El día 0 (es decir, el día del tratamiento), los perros del grupo de tratamiento fueron tratados una vez por vía oral con tabletas masticables de fluralaner (Bravecto®), según las recomendaciones de la etiqueta. Cada perro recibió la mitad de su ración diaria de comida aproximadamente 20 minutos antes de la administración del tratamiento y el resto directamente después del tratamiento. La tableta masticable se administró colocándola en la parte posterior de la cavidad oral sobre la lengua para iniciar la deglución. Se observó continuamente a cada perro tratado durante 1 hora después de la administración para controlar si vomitaba o escupía el comprimido, lo que no ocurrió en ninguno de los 8 perros. Los perros del grupo de control no fueron tratados. Las observaciones específicas de salud en el día 0 se realizaron cada hora, hasta 4 horas después de la administración en todos los perros (tratados y no tratados).

# Infestaciones y valoraciones de garrapatas

Para cada infestación se utilizó un aislado de garrapata D. reticulatus (de origen europeo) infectado con B. canis. Se realizaron infestaciones de garrapatas en todos los perros los días 2, 28 (4 semanas), 56 (8 semanas), 70 (10 semanas) y 84 (12 semanas). Se tomó una muestra de garrapatas D. reticulatus (aproximadamente 50) de cada lote de garrapatas utilizado para cada infestación para determinar el porcentaje de infección con B. canis mediante análisis de PCR. En cada momento de infestación, cada perro fue infestado con 50 ( $\pm 4$ ) garrapatas adultas viables y no alimentadas de D. reticulatus (50 % hembras; 50 % machos). No se sedó a los perros para la infestación, pero durante cada infestación se colocó a cada perro en un contenedor de infestación que medía

90 × 80 × 70 cm (largo x ancho x alto) y se aplicaron manualmente las garrapatas en el pelaje del animal; a partir de entonces, los animales estuvieron sujetos durante aproximadamente 10 minutos. Durante este tiempo se volvieron a aplicar las garrapatas que se cayeron del animal. Después de 10 minutos se cerró la sujeción de la infestación, y al cabo de 4 h (±10 min) se liberó al perro en su jaula.

Se realizaron recuentos de garrapatas in situ en cada perro a las 48 ±4 h de cada infestación (es decir, los días 4, 30, 58, 72 y 86), pero no se retiraron las garrapatas. En el día 90, se retiraron y contaron todas las garrapatas restantes en cada perro. El personal que realizó la infestación de garrapatas, el recuento in situ de garrapatas y la retirada de garrapatas en el día 90 no conocía el estado de tratamiento de cada perro.

### Salud de los animales

Para vigilar de cerca a cada perro en busca de cualquier signo de babesiosis canina, cada perro fue examinado físicamente por un veterinario con un intervalo de 7 días hasta la finalización del estudio (es decir, los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 y 112). A partir del día 8 después del tratamiento, se midió la temperatura corporal rectal de cada perro tres veces por semana. Las observaciones generales de la salud, señalando al perro como normal o anormal, se realizaron una vez al día durante toda la duración del estudio (es decir, desde los 7 días anteriores al tratamiento hasta el día 112 después del tratamiento). Si se observaba que un perro era anormal o se medía una temperatura corporal rectal superior o igual a 39.4 °C, se realizaba un examen físico adicional por parte de un veterinario. Si durante este examen se observaban uno o más parámetros como anormales, se tomaba una muestra de sangre para realizar un frotis sanguíneo. El frotis de sangre se secó al aire y se tiñó con Diff- quick antes de la evaluación.

# Sangre para serología (IFAT) y análisis PCR

Las muestras de sangre para el análisis del suero en busca de anticuerpos contra B. canis se recogieron con un intervalo de 14 días, a partir del día 14 después del tratamiento. Las IFAT se realizaron utilizando el kit comercial "Mega-Screen® FLUOBabesia canis". Todos los sueros se diluyeron a 1:80 y se registraron como positivos si se observaba fluorescencia específica, o negativos si no se observaba fluorescencia.







Las muestras de sangre para el análisis por PCR del ADN de B. canis se recogieron en tubos con EDTA de cada perro con un intervalo de 7 días. El ADN genómico total se aisló de las muestras de sangre entera utilizando un kit comercial de aislamiento de ADN genómico (GeneJet Genomic DNA Purification kit, Thermo Scientific). La PCR supuso el uso de los cebadores Babesia 2F (5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC-3') y B canis 2R (5'-CAGTGGTCACACCGTCG-3') con especificidad combinada para la región ITS1 del ADN de B. canis con el fin de amplificar una región objetivo de 302 pb [10]. Hasta 400 ng de ADN aislado sirvieron de plantilla para la amplificación por PCR de la región objetivo. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Un producto de PCR de aproximadamente 300 pb indicaba la presencia de la región objetivo en la muestra. Para verificar el éxito de la PCR en cada tubo individual, se incluyeron en cada corrida controles positivos, negativos y sin plantillas, así como controles internos de amplificación.

### Tratamiento de rescate

Se recogió una muestra de sangre para realizar un frotis sanguíneo de cada perro que presentaba una temperatura corporal rectal superior o igual a 39.4 °C, o con un resultado positivo en el análisis de PCR para ADN babesiano, o con signos clínicos de babesiosis observados durante la exploración física. Los perros confirmados como positivos a los protozoos B. canis por frotis de sangre fueron tratados de rescate y recibieron el tratamiento adecuado con diminazene (Berenil; MSD Animal Health) a una dosis de 1 mL/20 kg de peso corporal el primer día y con imidocarb (Forray 65; MSD Animal Health) a una dosis de 1.2 mL/20 kg de peso corporal el día siguiente. Un perro tratado como rescate siguió formando parte de todas las observaciones sanitarias (es decir, salud general, evaluación de la temperatura corporal rectal, examen físico) pero no fue sometido a posteriores infestaciones de garrapatas. Este perro fue trasladado de las instalaciones de alojamiento del estudio a un corral exterior expuesto a las condiciones ambientales, y alojado en grupo hasta la exclusión final del estudio. Antes del traslado, se eliminaron todas las garrapatas. Se tomaron muestras de sangre para PCR e IFAT y, tras la confirmación de una infección babesial por ambos métodos de análisis, este perro fue finalmente excluido del estudio.

### Perros de sustitución

Debido a los varios puntos de infestación de garrapatas previstos durante la duración del estudio (es decir, infestaciones de garrapatas en los días 2, 28, 56, 70 y 84), además de los 8 perros

primarios incluidos en el grupo de control, se incluyeron perros de reemplazo según fuera necesario, y para sustituir a los animales de este grupo rescatados por babesiosis. Antes de la inclusión en el estudio, un perro de reemplazo fue aclimatado durante 7 días antes de la primera infestación de garrapatas para ese animal. Durante este periodo, el perro fue sometido a pruebas negativas de *B. canis* mediante análisis de PCR e IFAT, y se realizó un examen físico por parte de un veterinario.

Los perros de reemplazo no fueron aleatorizados, pero siempre que fue posible el perro de reemplazo tenía el mismo sexo que el perro de control reemplazado.

### Evaluación de la eficacia

El análisis estadístico se realizó con el paquete de software SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU., versión 9.3). El perro individual fue la unidad experimental en todos los cálculos estadísticos. Los datos de cada punto temporal de recuento de garrapatas in situ se analizaron por separado.

El porcentaje de eficacia contra las garrapatas se calculó para el grupo de tratamiento en cada punto de tiempo de valoración utilizando medias geométricas con la fórmula de Abbott:

Eficacia (%) =  $100 \times (MC - MT)/MC$ , donde MC era el número medio de garrapatas vivas totales adheridas en los perros de control no tratados y MT el número medio de garrapatas vivas totales adheridas en los perros tratados. En caso de recuentos nulos, la media geométrica se calculó como sigue:

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

Se valoraron las diferencias significativas entre los recuentos logarítmicos de garrapatas vivas adheridas en el grupo tratado en cada punto temporal de evaluación y los recuentos logarítmicos del grupo de control no tratado. Los grupos de estudio se compararon mediante un modelo lineal mixto que incluía el grupo de estudio como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio. Se declaró el nivel de significación a dos caras cuando  $P \leq 0,05$ .

El porcentaje de efecto preventivo contra la transmisión de *B. canis* para el grupo de tratamiento se calculó como sigue: Efecto preventivo (%) = 100 × (TC - TT)/TC, donde TC es el número total de perros infectados en el grupo no tratado y TT es el número total de perros infectados en el grupo tratado. Se consideró que







un perro estaba infectado por *B. canis* si daba positivo en la prueba serológica de anticuerpos contra *B. canis* (IFAT) y positivo para el ADN de *B. canis* en la prueba de PCR.

### Resultados

No se observaron efectos adversos relacionados con el tratamiento en ninguno de los 8 perros tratados por vía oral con fluralaner durante el periodo de observación de 12 semanas tras el tratamiento. En total, se incluyeron 19 perros de reemplazo (10 machos y 9 hembras) en el grupo de control a lo largo del estudio, asegurando que en cada punto de tiempo de infestación por garrapatas, el grupo de control estuviera formado por 8 animales, lo que fue posible para todos los puntos de tiempo de infestación, excepto el último del día 84. Para la provocación de garrapatas en el día 84, sólo se disponía de 6 animales de control, de los cuales dos resultaron positivos por frotis sanguíneo y análisis de PCR en el día 85 y fueron tratados de nuevo, de modo que para el recuento de garrapatas in situ en el día 86 el grupo de control estaba formado por 4 animales. Por lo tanto, el cálculo de la eficacia para el día 86 y el día 90 se calculó con 4 perros de control. Los recuentos medios de garrapatas y la eficacia detallada contra las garrapatas se muestran en la Tabla 1. Se alcanzó una eficacia contra las garrapatas en cada punto de tiempo de valoración de entre el 99.2 y el 100 % tras un único tratamiento oral con fluralaner.

Ninguno de los perros tratados con Bravecto® tabletas masticables desarrolló signos clínicos de babesiosis. Los perros del grupo de control desarrollaron signos clínicos que hacían referencia a la babesiosis, como membranas mucosas pálidas, temperatura corporal rectal superior o igual a 39.4 °C, comportamiento general deprimido/sin ánimo, ganglios linfonodos agrandados y bazo agrandado.

Se midió la temperatura corporal rectal de cada perro tres veces por semana. En 19 de los 27 perros de control se midió la temperatura corporal rectal por encima o igual a 39.4 °C en al menos un momento del estudio. En el grupo tratado, en 1 de 8 perros se midió la temperatura corporal rectal por encima o igual a 39.4 °C una vez 17 días después del tratamiento. No se confirmó que esta temperatura corporal rectal elevada estuviera relacionada con una infección por *B. canis*, ya que los resultados de los análisis de sangre (frotis de sangre, PCR e IFAT) de este animal fueron negativos para *B. canis* durante todo el periodo del estudio (véase la Tabla 2).

En cada punto de tiempo de infestación, entre el 12 y el 16% de las garrapatas estaban infectadas por *B. canis* mediante análisis de

PCR. El modelo de infección se consideró válido ya que todos los perros del grupo de control no tratado estaban infectados con *B. canis*, tal y como se confirmó como positivo para *B. canis* por frotis de sangre; para el ADN babesial por análisis de PCR; y para los anticuerpos de *B. canis* por IFAT después de la primera o posterior infestación de garrapatas. Ninguno de los perros tratados se infectó con *B. canis* durante toda la duración del estudio, como se confirmó por la ausencia de anticuerpos contra *B. canis* en el IFAT y un resultado negativo para el ADN babesial por análisis de PCR en cualquiera de los puntos de tiempo de análisis de sangre programados hasta 4 semanas después de la última infestación de garrapatas (ver Tabla 2).

**Tabla 1** Recuentos medios de garrapatas y eficacia contra las garrapatas tras un tratamiento oral único con fluralaner tabletas masticables

Día 4	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	18.6/0.0 100 <sup>b</sup>
Día 30	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	18.8/0.0 100 <sup>b</sup>
Día 58	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	12.7/0.0 100 <sup>b</sup>
Día 72	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	22.2/0.1 99.6 <sup>b</sup>
Día 86	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	23.0/0.2 99.2 <sup>b</sup>
Día 90	Recuento medio de garrapatas <sup>a</sup> (control / tratado) (n) Eficacia (%).	22.3/0.0 100 <sup>b</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Media geométrica de garrapatas vivas adheridas

**Tabla 2** Número de perros con aumento de la temperatura corporal rectal (RBT) y número de perros con resultados positivos para *B. canis* mediante frotis de sangre, PCR e IFAT.

Grupo de estudio		Frotis de sangre [POS]	PCR [POS]	IFAT [POS]
Control no tratado (n)	19/27	27/27	27/27	27/27
Grupo de tratamientoª (n)	<sup>a</sup> 1 <sup>b</sup> /8	0/8	0/8	0/8

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Tratamiento oral con tabletas masticables de fluralaner





<sup>&</sup>lt;sup>b</sup>Los recuentos logarítmicos de garrapatas del grupo tratado fueron significativamente diferentes (p < 0.0001) de los recuentos logarítmicos del grupo de control no tratado.

 $<sup>^{\</sup>mathrm{b}}$  Un perro tuvo una RBT de 39.8 °C una vez 17 días después del tratamiento



Se logró un efecto preventivo del 100 % contra la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus* infectadas tras un único tratamiento oral con fluralaner (véase la tabla 3).

### Discusión

El bloqueo de la transmisión de patógenos (efecto preventivo) a los perros a través de la picadura de garrapatas vectoras se ha convertido en una demanda creciente de los propietarios de mascotas y los veterinarios en la evaluación de la capacidad de los compuestos antigarrapatas. La babesiosis canina es una de las enfermedades transmitidas por garrapatas más significativas y eminentes desde el punto de vista clínico [5], por lo que se utilizó como modelo de estudio para determinar la capacidad de fluralaner para prevenir la transmisión de *B. canis* por garrapatas D. reticulatus infectadas. Los protozoos de B. canis infectan los glóbulos rojos, causando una enfermedad de leve a grave con diferentes severidades en los signos clínicos hasta la muerte, si no se trata. Por esta razón, los perros del grupo de control no tratado fueron inmediatamente tratados de rescate después de haber dado positivo en el frotis de sangre. Para estos perros tratados de rescate, se incluyeron perros de reemplazo, con el fin de mantener un número suficiente de al menos 6 perros en el grupo de control para el análisis estadístico, como se requiere en el lineamiento para evaluar la eficacia de los parasiticidas para el tratamiento, prevención y control de las infestaciones por pulgas y garrapatas en perros y gatos [11].

Fluralaner es el primer compuesto administrado por vía oral que produce una actividad sistémica con una eficacia de más de 12 semanas contra garrapatas y pulgas [8, 12]. Hasta 2014, los compuestos para el control de las garrapatas en perros estaban disponibles en forma de tópicos spot-on, sprays o collares que mostraban su eficacia para matar garrapatas a través de la alimentación de sangre y/o la exposición/repelencia por contacto [13]. En los estudios de velocidad de muerte de Wengenmayer et al. [9],

**Tabla 3**. Efecto preventivo contra la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus*.

	Control no tratado	Grupo de tratamientoª
Infectados (n)	27/27	0/8
No infectados (n)	0/27	8/8
Infectados (%)	100	0
Prevención (%)	-	100
Valor P	-	0.0002

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Tratamiento oral con tabletas masticables de fluralaner

se demostró que el fluralaner administrado por vía oral empieza a matar las garrapatas presentes en el perro a partir de las 4 h (89.6 %), mostrando una eficacia garrapaticida casi completa en las 12 h siguientes al tratamiento durante todo el periodo de eficacia de 12 semanas. Estos resultados se confirman en este estudio por los excelentes resultados de eficacia contra las garrapatas (véase la tabla 1). Dado que el fluralaner ejerce su acción primaria a través de la actividad alimentaria, el efecto protector del fluralaner es menos evidente. La eficacia del fluralaner depende de que las garrapatas se adhieran a la piel del huésped y comiencen a alimentarse, ingiriendo así el compuesto activo antes de ser eliminadas [8]. El tiempo de transmisión de B. canis a partir de garrapatas infectadas de *D. reticulatus* es dado por Heile *et al.* [14] con 48-72 h después de la adhesión de la garrapata. La adhesión de la garrapata a la piel del hospedador inicia la maduración de los esporozoitos localizados en las glándulas salivales de la garrapata. Unos días después de la adhesión de la garrapata, la transmisión del patógeno a través de la saliva de la garrapata provoca la infección del huésped [15]. Debido a su rápido efecto garrapaticida, fluralaner impidió eficazmente la transmisión de B. canis de garrapatas D. reticulatus infectadas a los perros (Tabla 3). Las tabletas masticables de fluralaner demostraron una eficacia contra las garrapatas de entre el 99.2% y el 100% a lo largo de las 12 semanas de duración del estudio.

Un ingrediente activo con un intervalo de retratamiento más largo, como el fluralaner, reduce el riesgo de fracaso del tratamiento como consecuencia del escaso cumplimiento por parte del propietario de las recomendaciones de tratamiento mensuales. El cumplimiento por parte del propietario es un componente importante para el éxito del control y la prevención de las infestaciones por garrapatas durante la temporada de garrapatas. Este estudio ha demostrado que el tratamiento con fluralaner en tabletas masticables no sólo es eficaz contra las garrapatas y protege al perro contra la transmisión de patógenos, sino que además sigue siendo eficaz durante las 12 semanas siguientes al tratamiento. Por otra parte, además de su eficacia contra *D. reticulatus*, fluralaner es eficaz durante el mismo periodo de tiempo contra otras garrapatas y pulgas que pueden infestar concomitantemente a estos animales [12, 16].







### **Conclusiones**

La administración oral única de tabletas masticables de fluralaner (Bravecto™) a perros previno la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus* infectadas en un 100 % durante 12 semanas. Se logró una eficacia contra las garrapatas de entre el 99.2 y el 100 % durante las 12 semanas de duración del estudio. El largo intervalo de retratamiento de las tabletas masticables de fluralaner ofrece más comodidad que los tratamientos mensuales de control de garrapatas, con una ventaja potencial de cumplimiento.

# **Intereses contrapuestos**

JL trabaja en ClinVet y todos los demás autores de este artículo son empleados de MSD Slud Animal. El estudio se llevó a cabo como parte de un programa de investigación para evaluar el potencial de fluralaner para inhibir la transmisión de patógenos a los hospederos después de la fijación de garrapatas tras el tratamiento con fluralaner oral.

### Contribuciones de los autores

El diseño del estudio, el protocolo y el informe del estudio fueron preparados por JT, JL, AH y RR. JL y su equipo en ClinVet fueron responsables de la fase animal, la recogida de datos y los cálculos estadísticos. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final.

### **Agradecimientos**

Los autores desean agradecer a todo el personal de ClinVet su ayuda y contribución a este estudio.

# **Detalles del autor**

1MSD Animal Health Innovation GmbH, Zur Propstei, 55270 Schwabenheim, Alemania. 2ClinVet International, Uitsigweg, Bainsvlei, 9338 Bloemfontein, Free State, Sudáfrica.

### Recibido

13 de abril de 2015, **Aceptado:** 29 de mayo de 2015

### Referencias

- 1. Matijatko V, Torti M, Schetters TP. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? Trends Parasitol. 2012;28:99–105.
- 2. Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats-expanding parasitological and clinical spectra. Vet Parasitol. 2011;181:48–60.
- 3. Baneth G, Florin-Christensen M, Cardoso L, Schnittger L. Reclassification of Theileria annae as Babesia vulpes sp. nov. Parasit Vectors. 2015;8:207.
- 4. Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasit Vectors. 2009;2 Suppl 1:54.
- 5. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. Parasitology. 2004;129(Suppl):3–14.
- 6. Irwin PJ. It shouldn't happen to a dog... or a veterinarian: clinical paradigms for canine vector-borne diseases. Trends Parasitol. 2014;30:104–12.
- 7. Little SE. Changing paradigms in understanding transmission of canine tick-borne diseases: the role of interrupted feeding and intrastadial

transmission. Mazara del Vallo, Sicily, Italy: 2nd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium 2007, p. 30-4.

- 8. Bravecto EPAR summary for the public. European Medicines f. Agency. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\_GB/document\_linrary/EPAR\_-\_Summary\_for\_the\_public/veterinary/002526/WC500163861.pdf].
- 9. Wengenmayer C, Williams H, Zschiesche E, Moritz A, Langenstein J, Roepke R, et al. The speed of kill of fluralaner (Bravecto) against Ixodes ricinus ticks on dogs. Parasit Vectors. 2014;7:525.
- 10. Beugnet F, Halos L, Larsen D, Labuschagne M, Erasmus H, Fourie J. The ability of an oral formulation of afoxolaner to block the transmission of Babesia canis by Dermacentor reticulatus ticks to dogs. Parasit Vectors. 2014;7:283.
- 11. Marchiando AA, Holdsworth PA, Green P, Blagburn BL, Jacobs DE. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for evaluating the efficacy of parasiticed for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. Vet Parasito. 2007;145:332-44.
- 12. Rohdich N, Roepke RK, Zschiesche E. A randomized, blinded, controlled and multicentered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto (fluralaner) against Frontline (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. Parasit Vectors. 2014;7:83.
- 13. Blagburn BL, Dryden MW. Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2009;39:1173–200.
- 14. Heile C, Heydorn AO, Schein E. Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794)–distribution, biology and vector for Babesia canis in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2006;119:330–4.
- 15. Uilenberg G. Babesia-a historical overview. Vet Parasitol. 2006;138:3-10.
- 16. Williams H, Young DR, Qureshi T, Zoller H, Heckeroth AR. Fluralaner, a novel isoxazoline, prevents flea (Ctenocephalides felis) reproduction in vitro and in a simulated home environment. Parasit Vectors. 2014;7:275.









Una dosis **protege 3 veces más** que los productos mensuales.







# Protección fácil, rápida y de larga duración



2015 Taenzler et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la

que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite adecuadamente la obra original. La renuncia a la Dedicación de Dominio Público de Creative Commons (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/)

Licencia de Atribución de Creative Commons (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0),

se aplica a los datos puestos a disposición en este artículo, a menos que se indique lo contrario.

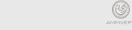






Apto para cachorrosa partir de las 8 semanas de vida





MSD





# Resumen

# **Antecedentes**

Se evaluó el efecto preventivo de la solución spot-on de fluralaner contra la transmisión de *Babesia canis* por garrapatas *Dermacentor reticulatus*.

### **Conclusiones**

Una única administración tópica de la solución spot-on de fluralaner previno eficazmente la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus* infectadas durante un periodo de 12 semanas.

# Palabras clave

Solución Spot-on de Bravecto®, *Babesia canis*, Babesiosis, Fluralaner, *Dermacentor reticulatus*, Perro, Eficacia, Prevención de la transmisión, Spot-on

### Resultados

Dieciséis perros, con resultados negativos para B. canis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y prueba de inmunofluorescencia (IFAT), fueron asignados a dos grupos de estudio. El día 0, los perros de un grupo (n = 8) fueron tratados una vez por vía tópica con una solución spot-on de fluralaner (Solución Spot-on Bravecto®) según las recomendaciones de la etiqueta y los perros del grupo de control (n = 8) permanecieron sin tratar. En los días 2, 28, 56, 70 y 84, todos los perros fueron infestados con  $50 (\pm 4)$  garrapatas D. reticulatus que albergaban B. canis, con recuentos de garrapatas in situ  $48 \pm 4$  h después de cada infestación. En el día 90, se retiraron las garrapatas de todos los perros y se contaron. Antes de cada infestación, se confirmó la presencia de B. canis en el respectivo lote de garrapatas mediante PCR, y se encontró que entre el 12 y el 16% de las garrapatas estaban infectadas con B. canis. La eficacia contra las garrapatas fue del 99.5 y el 99.3 % en los días 4 y 58 después del tratamiento, respectivamente, y del 100 % en todos los demás días. Se incluyeron perros de sustitución para cualquier perro de control infectado por B. canis (en total 19). Todos los perros de control (n = 27) se infectaron con B. canis, como se confirmó por PCR, realizada cada 7 días, y por IFAT, realizada cada 14 días después del tratamiento. Ninguno de los ocho perros tratados se infectó con B. canis, ya que dieron negativo por PCR e IFAT durante todo el estudio hasta el día 112. Al comparar los perros infectados del grupo tratado con los perros infectados del grupo de control no tratado, se demostró un efecto preventivo del 100% contra la transmisión de B. canis.





# Parásitos &Vectores

# **Hipótesis**

El fluralaner mata rápidamente a las garrapatas en las 12 horas siguientes a su adhesión [1], y ya se ha demostrado la prevención de la transmisión de *Babesia canis* mediante el tratamiento oral con comprimidos masticables de fluralaner [2]. Recientemente, se ha comercializado una nueva formulación de fluralaner como Solución Spot-on Bravecto® [3]. Por lo tanto, se probó el potencial del fluralaner administrado tópicamente para prevenir la transmisión de *B. canis*.

# Métodos y preparación del estudio

Se aplicó la misma metodología descrita por Taenzler et al. [2] para investigar la prevención de la transmisión de *B. canis* mediante el tratamiento tópico con fluralaner y, por lo tanto, los métodos y el montaje del estudio se resumen brevemente a continuación. Se obtuvo la aprobación ética del Comité de Ética Animal de ClinVet (CAEC) antes de iniciar el estudio.

### Detalles de los animales

Dieciséis perros sanos de raza mixta (ocho machos, ocho hembras; de 1 a 8 años, de 13.8 a 26.9 kg) que resultaron negativos para *B. canis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prueba de inmunofluorescencia (IFAT), fueron asignados aleatoriamente a dos grupos de estudio de ocho perros cada uno. Los perros fueron alojados individualmente en el interior y alim entados con una vezal día con un alimento seco estándar disponible en el mercado; se les proporcionó agua potable ad libitum.

# **Tratamiento**

El día 0 (es decir, el día del tratamiento), los perros del grupo de tratamiento fueron tratados una vez por vía tópica con una solución spot-on de fluralaner según las instrucciones de la etiqueta del fabricante. No hubo evidencia de una mala dosificación, como derrame o escurrimiento/goteo, en ningún animal tratado. Los perros del grupo de control no fueron tratados.

# Infestaciones de garrapatas y valoraciones

En los días 2, 28, 56, 70 y 84, todos los perros fueron infestados con  $50 \pm 4$  garrapatas *D. reticulatus* adultas y no alimentadas (origen europeo, proporción de sexos 1:1). Antes de cada infestación, se

confirmó la presencia de B. canis mediante PCR utilizando 50 garrapatas del lote respectivo. Los recuentos de garrapatas in situ se realizaron  $48\pm4$  horas después de cada infestación. En el día 90, se retiraron y contaron todas las garrapatas restantes en cada perro.

### Salud de los animales

Tras el tratamiento, el estado de salud de cada animal se controló mediante exámenes físicos con un intervalo de 7 días y se midió la temperatura corporal rectal de cada perro tres veces por semana. Las observaciones generales de salud, en las que se señalaba al perro como normal o anormal, se realizaban una vez al día a partir de los 7 días anteriores al tratamiento hasta el día 112 después del mismo. Si se observaba que un perro era anormal o la temperatura corporal rectal era superior o igual a 39.4°C, se realizaba un examen físico adicional.

## Análisis de sangre

Si uno o más parámetros durante el examen físico eran anormales, se realizaba un frotis de sangre. Las muestras de sangre para el análisis del suero en busca de anticuerpos contra *B. canis* (IFAT) y para la detección del ADN de *B. canis* (PCR) se recogieron con un intervalo de 14 días y con un intervalo de 7 días después del tratamiento, respectivamente [2].

# Tratamiento de rescate y sustitución

Los perros confirmados como positivos a *B. canis* por frotis sanguíneo fueron tratados de rescate con imidocarb y diminazeno [2] y siguieron formando parte de todas las observaciones sanitarias, pero no fueron sometidos a posteriores infestaciones por garrapatas. Se realizó la PCR y la IFAT en las muestras de sangre y, tras la constatación de una infección babesial mediante ambos análisis, estos perros fueron finalmente excluidos del estudio.

**Tabla 1.** (pg. 3) Recuentos medios de garrapatas y eficacia contra las garrapatas tras un tratamiento tópico único con solución spoton de fluralaner.

1MSD Animal Health Innovation GmbH, ZurPropstei, 55270 Schwabenheim, Alemania. La lista completa de información de los autores está disponible al final del artículo.





<sup>\*</sup>Correspondencia: janina.taenzler@msd.de



Día 4	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	18.6/0.1 99.5 <sup>b</sup>
Día 30	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	18.8/0.0 100 <sup>b</sup>
Día 58	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	12.7/0.1 99.3 <sup>b</sup>
Día 72	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	22.2/0.0 100 <sup>b</sup>
Día 86	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	23.0/0.0 100 <sup>b</sup>
Día 90	Recuento medio de garrapatasª (control / tratado) (n) Eficacia (%).	22.3/0.0 100 <sup>b</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Media geométrica de garrapatas vivas adheridas

Los perros de control positivos a *B. canis* fueron sustituidos por un perro de reemplazo negativo a *B. canis* para asegurar un número suficiente de perros de control para las infestaciones/conteo de garrapatas. En total, se utilizaron 19 perros de sustitución (diez machos y nueve hembras); por tanto, en el grupo de control se incluyeron un total de 27 perros.

### Evaluación de la eficacia

El análisis estadístico se realizó con el paquete de software SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, versión 9.3). La unidad experimental fue el perro individual. El porcentaje de eficacia contra las garrapatas se calculó para el grupo de tratamiento en cada punto de tiempo de valoración utilizando medias geométricas con la fórmula de Abbott:

Eficacia (%) =  $100 \times (MC - MT)/MC$ , donde MC es el número medio de garrapatas vivas totales adheridas en los perros de control no tratados y MT el número medio de garrapatas vivas totales adheridas en los perros tratados. Los recuentos transformados en logaritmos (xi = ln(xi + 1)) de las garrapatas vivas adheridas se utilizaron para confirmar el cálculo de la eficacia.

**Tabla 2**. Número de perros con aumento de la temperatura corporal rectal (RBT) y número de perros que dieron positivo a *B. canis* mediante frotis de sangre, PCR e IFAT.

Grupo de estudio		Frotis de sangre [POS]	PCR [POS]	IFAT [POS]
Control no tratado (n)	19/27	27/27	27/27	27/27
Grupo de tratamientoª (n)	1 <sup>b</sup> /8	0/8	0/8	0/8

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Tratamiento tópico con solución spot-on de fluralaner

**Tabla 3**. Efecto preventivo contra la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus*.

	Control no tratado	Grupo de tratamiento
Infectados (n)	27/27	0/8
No infectados (n)	0/27	8/8
Infectados (%)	100	0
Prevención (%)	-	100
Valor P	_	0.0002

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Tratamiento tópico con solución spot-on de fluralaner

Se valoraron las diferencias significativas entre los recuentos transformados logarítmicamente de garrapatas vivas en el grupo tratado en cada momento de la evaluación, en comparación con los recuentos transformados con log del grupo de control no tratado, utilizando un modelo lineal mixto que incluía el grupo de estudio como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio. El nivel de significación de dos caras se declaró cuando p  $\leq 0.05$ .

El porcentaje de efecto preventivo contra la transmisión de B. canis para el grupo de tratamiento se calculó como sigue: Efecto preventivo (%) =  $100 \times (TC - TT)/TC$ , donde TC es el número total de perros infectados en el grupo no tratado y TT es el número total de perros infectados en el grupo tratado. Se consideró que un perro estaba infectado por B. canis si daba positivo tanto en la IFAT como en la PCR. Los grupos de estudio se compararon mediante la prueba exacta de Fisher.

### Resultados

No se observaron acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento en ninguno de los ocho perros tratados una vez por vía tópica con fluralaner. Se alcanzó una eficacia contra las





 $<sup>^{</sup>b}$ Los recuentos de garrapatas del grupo tratado fueron significativamente diferentes (P<0.0001) de los recuentos del grupo de control no tratado

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup>Grupo de control: seis perros disponibles para la infestación, dos perros dieron positivo a *B. canis* en el día 85 y fueron excluidos, el cálculo de la eficacia se basó en cuatro perros.

 $<sup>^{\</sup>mathrm{b}}$ Se midió una temperatura superior o igual a 39,4  $^{\mathrm{o}}$ C, pero no se confirmó que estuviera relacionada con una infección por *B. canis*, ya que la PCR y la IFAT fueron negativas durante todo el estudio.



garrapatas en cada punto de tiempo de valoración entre el 99.3 y el 100 % (Tabla 1). En cada punto de tiempo de infestación, se encontró que entre el 12 y el 16 % de las garrapatas estaban infectadas con B. canis por análisis de PCR. El modelo de infección se consideró válido ya que los 27 perros de control no tratados estaban infectados con B. canis, como se confirmó como positivo para B. canis por frotis de sangre, para el ADN babesial por análisis de PCR, y para los anticuerpos contra B. canis por IFAT después de la primera o posterior infestación de garrapatas (Tabla 2). Además, los perros del grupo de control desarrollaron signos clínicos que hacían referencia a la babesiosis, como membranas mucosas pálidas, temperatura corporal rectal superior o igual a 39.4 °C, comportamiento general deprimido/sin ánimo, linfonodos agrandados y bazo agrandado. En total, se incluyeron 19 perros de reemplazo (diez machos y nueve hembras) en el grupo de control a lo largo del estudio, garantizando que en cada punto de tiempo de infestación por garrapatas, el grupo de control estuviera formado por ocho animales, lo que fue posible para todos los puntos de tiempo de infestación, excepto el último, el día 84. Para la exposición a las garrapatas en el día 84, sólo se disponía de seis animales de control, de los cuales dos resultaron positivos por frotis sanguíneo y análisis de PCR en el día 85 y fueron tratados de nuevo, de modo que para el recuento de garrapatas in situ en el día 86 el grupo de control estaba formado sólo por cuatro animales. Por lo tanto, el cálculo de la eficacia para el día 86 y el día 90 se calculó con cuatro perros de control.

Ninguno de los perros tratados con la solución spot-on de fluralaner desarrolló ningún signo clínico referente a la babesiosis. Se midió un aumento de la temperatura corporal rectal en 1 de los 8 perros tratados, pero no se confirmó que estuviera relacionado con una infección por *B. canis*, ya que tanto la PCR como la IFAT fueron negativas durante todo el estudio. Ninguno de los perros tratados se infectó con *B. canis* durante toda la duración del estudio, como se confirmó por la ausencia de anticuerpos a *B. canis* en la IFAT y un resultado negativo de ADN babesial por análisis de PCR en cualquiera de los puntos de tiempo de análisis de sangre programados hasta 4 semanas después de la última infestación de garrapatas (Tabla 2). Se logró un efecto preventivo del 100% contra la transmisión de *B. canis* por garrapatas *D. reticulatus* infectadas tras un único tratamiento tópico con fluralaner (Tabla 3).

### **Intereses contrapuestos**

JL trabaja en ClinVet y todos los demás autores de este artículo son empleados de MSD Animal Health. El estudio se llevó a cabo como parte de un programa de investigación para evaluar el potencial de fluralaner para inhibir la transmisión de patógenos a los hospedadores tras la adhesión de garrapatas después del tratamiento con fluralaner tópico.

### Contribuciones de los autores

El diseño del estudio, el protocolo y el informe del estudio fueron preparados por JT, JL, AH y RR. JL y su equipo en ClinVet fueron responsables de la fase animal, la recogida de datos y los cálculos estadísticos. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final.

# Agradecimientos

Los autores desean agradecer a todo el personal de ClinVet su ayuda y contribución a este estudio.

### Detalles del autor

1MSD Animal Health Innovation GmbH, ZurPropstei, 55270 Schwabenheim, Alemania. 2ClinVet International, Uitsigweg, Bainsvlei, 9338 Bloemfontein, Free State, Sudáfrica.

Recibido: 23 de noviembre de 2015 Aceptado: 30 de marzo de 2016

Publicado en línea: 31 de mayo de 2016

### Referencias

- 1. Wengenmayer C, Williams H, Zschiesche E, Moritz A, Langenstein J, Roepke RK, Heckeroth AR. The speed of kill of fluralaner (BravectoTM) against Ixodes ricinus ticks on dogs. Parasit Vectors. 2014;7:525.
- 2. Taenzler J, Liebenberg J, Roepke RK, Heckeroth AR. Prevention of transmission of Babesia canis by Dermacentor reticulatus ticks to dogs treated orally with fluralaner chewable tablets (BravectoTM). 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









Una dosis **protege 3 veces más** que los productos mensuales.



garrapata.





# Protección fácil, rápida y de larga duración



2015 Taenzler et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la

Licencia de Atribución de Creative Commons (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite adecuadamente la obra original. La renuncia a la Dedicación de

Dominio Público de Creative Commons (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) se aplica a los datos puestos a disposición en este artículo, a menos que se indique lo contrario.





