

Untersuchung der Wirksamkeit von Chrysamed Repellent Spray auf Zecken (*Ixodes ricinus*)

Prüfbericht

Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Daten	3
Ziele der Untersuchung	3
Zusammenfassung	3
Material und Methodik	4
Ergebnisse	7
a) Verhalten der Zecken	7
b) Zeitlicher Verlauf des Versuchs	9
Diskussion	10
Literatur	10

Allgemeine Daten

Prüfauftrag:	28.04.2008
Auftraggeber:	Chrysamed Vertrieb GmbH Karl-Emminger-Straße 14-16, A-5020 Salzburg, Österreich
Auftragnehmer:	IS Insect Services GmbH, Haderslebener Str. 9, D-12163 Berlin, Deutschland
Testmanager:	Dr. Hans Dautel
Prüfmittel:	Kontrolle: Filterpapier, unbehandelt Probe: Chrysamed Repellent
Erhalt der Proben:	19.06.2008
Prüfung:	01.-08.07.2008
Bericht:	30.09.2008

Ziel der Untersuchung

Untersuchung der zeckenrepellierenden Wirksamkeit von Chrysamed Repellent Spray im Moving-Object Bioassay.

Zusammenfassung

Chrysamed Repellent wurde im Moving-Object Bioassay auf die repellierende Wirkung gegen *Ixodes ricinus* Zecken untersucht. Dabei schreckte das Chrysamed Repellent ca. 90% der Nymphen von *I. ricinus* ab. Der repellierende Effekt war überwiegend bei Kontakt der Zecke mit dem Repellent nachweisbar. Auf kurze Distanz von 1-2 mm war eine geringer abschreckende Wirkung feststellbar, nicht jedoch auf größere Distanzen.

Material und Methodik

Zecken. Wirtssuchaktive, hungrige Nymphen der Zecke *Ixodes ricinus* wurden im Berliner Forst gefangen und an einem Außenstandort bei 90 % rel. Luftfeuchte, natürlicher Temperatur und Photoperiode gehalten. Die Zecken wurden einen Tag vor Testbeginn an Raumbedingungen (20 °C; Photoperiode: 14L:10D) akklimatisiert.

Testprinzip. Der MO-Bioassay wurde im Prinzip wie in Dautel et al. (1999) sowie Dautel (2004) beschrieben, durchgeführt. Dabei nähert sich eine einzelne Zecke einer langsam rotierenden, erwärmten vertikalen Trommel auf einem horizontalen Glasstab. Die Zecke wird durch die Wärme der Trommel angezogen und wechselt auf diese über. Dies geschieht analog ihrem natürlichen Verhalten, wenn sie sich im Freiland, auf einem Busch oder Grashalm wartend, an einem vorbeilaufenden Wirbeltier festhält. Wenn die Oberfläche der Trommel mit einem zu prüfenden Repellent behandelt wird, kann ein möglicher Repellenteffekt detektiert werden durch a) eine reduzierte Anzahl von Zecken, die sich in Richtung Trommel bewegen oder b) eine reduzierte Anzahl von Zecken, die auf die Trommel überwechseln oder c) durch eine erhöhte Anzahl von Zecken, die sich von der behandelten Trommeloberfläche abfallen lassen. Auf diese Weise ist es möglich, sowohl eine Repellenz zu detektieren, die auf eine gewisse Distanz wirkt, als auch reine Kontaktrepellenz.

Temperatur und Luftfeuchte. Temperatur bzw. rel. Luftfeuchte des Versuchsraumes wurden mittels Datenlogger (175-H2, Testo AG) protokolliert und lagen während der Versuche bei $21,9 \pm 0,9^\circ\text{C}$ und $41,8 \pm 2,1\%$ r.F. Die Oberflächentemperatur der Probe auf der Trommeloberfläche wurde vor dem Versuchsdurchlauf jeder fünften Zecke berührungslos mittels Infrarotthermometer (TM – 908, Lutron, Conrad Elektronik) gemessen und lag stets zwischen $35,0^\circ\text{C}$ und $36,0^\circ\text{C}$.

Maße der Apparatur. Die aus Messing bestehende Trommel hatte einen Außendurchmesser von 10 cm und eine Höhe von 20 cm. Die erhöhte Landefläche für die Zecken war 5×10 cm groß und zwischen 1 und 3 mm über die Trommeloberfläche erhöht, mit der höchsten Erhebung in der Mitte. Dies stellte sicher, dass sich die Zecke nur im Zentrum der Fläche festhalten konnte und nicht am Rand, von dem aus sie die behandelte Probe schnell hätte verlassen können. Die kürzeste Distanz zwischen Glasstab und erhöhter Landefläche auf der Trommel betrug 1-1,5 mm. Die Trommel

rotierte mit einer Periode von 5,1 s. Dies entspricht einer Geschwindigkeit der Trommeloberfläche von 6,2 cm/s relativ zur Zecke.

Applikation der Mittel. Die Proben wurden in der Standardmenge von 1,6 mg/cm² appliziert. Dies entspricht den Vorgaben der US Environmental Protection Agency für Tests an Probanden (EPA). Um die erforderliche Menge zu applizieren, wurde die Probe mit einem Reagenzglaszerstäuber auf je 150 cm² Filterpapier aufgesprüht. Mittels Rückwägung wurde die genau applizierte Menge ermittelt. Diese betrug 1,63 mg/cm². Das Filterpapier wurde danach in die erforderliche Größe von 10x5 cm zugeschnitten. Pro Test wurden drei solcher Streifen für jeweils 10 Zecken verwendet.

Testdurchführung. Für jeden Test sowie für die Kontrolle wurden jeweils 30 Zecken verwendet, die den Versuch einzeln nacheinander durchliefen. Die Kontrolle wurde mit einem unbehandelten Filterpapier durchgeführt und diente der Verifizierung einer ausreichenden Wirtssuchaktivität. Ein Test wird standardmäßig nur dann durchgeführt, wenn mindestens 70 % der Kontrollzecken auf die Trommel überwechseln und sich von dort nicht fallen lassen. Es wurden stets nur solche Zecken verwendet, die aus dem Glasbehälter kletterten, in dem sie aufbewahrt wurden. Die Zecken wurden mit ihrer Vorderseite in Richtung Trommel zeigend in einer Entfernung von 1-1,5 cm von der Stabspitze auf dem Glasstab abgesetzt. Sobald die Zecke loslief und die 1 cm Markierung überschritt, wurde der Versuch gestartet und nachfolgend notiert, ob die Zecke:

- a) zur Stabspitze in Richtung Trommel lief oder nicht,
- b) dort angekommen, (I) auf die Trommel überwechselte, (II) auf der Stabspitze verweilte, (III) wieder von der Spitze zurücklief oder (IV) sich vom Glasstab fallen ließ,
- c) auf der Trommel angekommen, (I) dort verweilte, (II) von der Probe herunterlief oder (III) sich abfallen ließ.

Jede Zecke wurde je Verhaltensschritt a) bis c) für maximal 2 min. beobachtet. Zecken, die innerhalb dieser Zeiträume nicht weiterliefen, wurden aus dem Versuch genommen.

Probe. Die zu testende Probe wurde von der Chrysamed Vertrieb GmbH zur Verfügung gestellt. Die Probe wurde bis Versuchsbeginn bei Raumtemperatur (ca. 20-22 °C) und Dunkelheit gelagert.

Statistik. Eine Gesamtrepellenz relativ zur Kontrolle wurde für jeden Test berechnet, indem sämtliche Zecken aufsummiert wurden, die (I) nicht Richtung Trommel liefen, (II) nicht zur Trommel überwechselten und (III) von der Probe auf der Trommel abfielen. All diese Zecken wurden als repelliert betrachtet. Die Gesamtrepellenz wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$R = 100 - p_i/p_k * 100,$$

wobei R die Gesamtrepellenz ist, p_i der Prozentsatz nicht repellierter Testzecken und p_k der Prozentsatz nicht repellierter Kontrollzecken.

Relative Häufigkeiten, d.h. die Anteile der Zecken, die zur Trommel überwechselten, wurden mittels G-Test verglichen, wobei stets die konservative Yate's Korrektur angewendet wurde (Sokal & Rohlf, 2000). Die G-Tests wurden in der Tabellenkalkulation von Excel 2007 geschrieben und durchgeführt.

Zeitparameter wurden mittels Oneway ANOVA miteinander verglichen. Der letztgenannte Test wurde in Statistica vs. 8.0 (Statsoft GmbH) durchgeführt. Bei Signifikanz wurde als post-hoc Test der HSD-Test (Honest Significant Difference-Test) für ungleichen Stichprobenumfang nach Tukey durchgeführt.

Ergebnisse

a) Verhalten der Zecken

Tabelle 1 zeigt die Anzahl Zecken, die bestimmte Verhaltensschritte im MO-Bioassay durchliefen.

Im ersten Verhaltensschritt (Zahl der Zecken, die zur Stabspitze in Richtung Trommel laufen) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Probe und der Kontrolle (Tab. 1: G-Wert: 0; $P > 0,05$).

Im zweiten Verhaltensschritt dagegen wechselten signifikant weniger Zecken auf die mit der Probe behandelte Oberfläche der Trommel über als auf die Kontrolle (G-Wert: 24,0; $P < 0,001$).

Im dritten Verhaltensschritt (Verhalten der Zecken auf der Trommel) ließen sich 66,7% der Zecken von der Probe abfallen, während von der Kontrolle keine einzige Zecke abfiel. Im Vergleich zur Kontrolle war dieser Wert (G-Wert: 15,8; $P < 0,001$) hochsignifikant.

Insgesamt schreckte die Probe 89,3 % der Zecken ab, ein Werte der gegenüber der Kontrolle ebenfalls hochsignifikant ist (G-Wert: 44,3; $P < 0,001$).

Tab. 1: Anzahl der Zecken, die im Moving-Object Bioassay verschiedene Verhaltensschritte durchliefen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind grau hinterlegt.

Verhaltensschritt	Kontrolle	Probe
Laufen zur Stabspitze	30	29
Kein Laufen	0	1
% Laufen	100,0	96,7
G-Wert		0
Signifikanz		P > 0,05
Wechsel auf die Trommel	28	9
Kein Wechsel	2	20
% Wechsel	93,3	31,0
G-Wert		24,0
Signifikanz		P < 0,001
Abfallen vom Filterpapier	0	6
Kein Abfallen	28	3
% Abfallen	0,0	66,7
G-Wert		15,8
Signifikanz		P < 0,001
Zusammenfassung:		
Nicht repelliert	28	3
Repelliert	2	27
G-Wert		44,3
Signifikanz		P < 0,001
Repellenz*		89,3 %

Laufen zur Stabspitze: Anzahl der Zecken, die bis zur Stabspitze in Richtung Trommel liefen.

Wechsel auf die Trommel: Anzahl der Zecken an der Stabspitze, die auf die Trommel übergingen.

Abfallen von der Probe: Anzahl der Zecken, die von der Trommel abfielen.

Repelliert: Anzahl der Zecken, die nicht zur Stabspitze liefen und/oder nicht auf die Trommel überwechselten und/oder von der Trommel abfielen.

*: Gesamtrepellenz berechnet nach der im Methodenteil angegebenen Formel.

Probe: Chrysamed Repellent

b) Zeitlicher Verlauf des Versuchs

Tabelle 2 zeigt die jeweilige Zeitdauer, welche die Zecken für bestimmte Verhaltensschritte benötigten. Hinsichtlich der Zeiten, welche die Zecken benötigten, um zur Stabspitze zu laufen, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Probe und Kontrolle (t-Wert: 0,31; FG=27; P=0,76).

Dagegen benötigten die Zecken zum Überwechseln auf die Trommel bei der Probe signifikant mehr Zeit als bei der Kontrolle (t-Wert: -2,27; FG=39; P<0,05).

Umgekehrt verhielt es sich mit den Aufenthaltszeiten der Zecken auf den Filterpapieren. Hier hielten sich die Zecken für signifikant kürzere Zeit auf dem mit Repellent behandelten Filterpapier auf, als auf der Kontrolle (t-Wert: 2,46; FG=35; P<0,05).

Tab. 2: Zeiten [s], welche die Zecken für verschiedene Verhaltensschritte benötigten. SD: Standardabweichung. 95% Konf.: 95%iges Konfidenzintervall des Mittelwertes. n: Anzahl der Zecken.

Parameter	n	Mittelwert	SD	95% Konf. Mittelwert	Min/Max
Zeitdauer [s] bis zum Erreichen der Stabspitze					
Kontrolle	30	7,2	5,7	5,1 – 9,3	2,6/25,6
Probe	29	6,8	5,1	4,8 – 8,7	1,9/21,3
Zeitdauer [s] vom Erreichen der Stabspitze bis zum Überwechseln auf die Trommel*					
Kontrolle	29	2,9	2,5	2,0 – 3,9	0,5/11,8
Probe	12	12,9	4,9	0,0 – 27,9	1,2/85,5
Aufenthaltszeit [s] auf dem Filterpapier auf der Trommel					
Kontrolle	28	20,5	17,6	13,6 – 27,3	8,3/92,0
Probe	9	5,7	5,0	1,9 – 9,6	1,2/14,0

*: Hier wurden auch die Zeiten derjenigen Zecken mitgezählt, die sich im Verlauf des Überwechselns abfallen ließen.

Diskussion

Das Chrysamed Repellent zeigte im MO-Bioassay mit nahezu 90% abgeschreckter Zecken einen ausgeprägten Repellenteffekt. Ein Fernwirkung über >1 cm war zwar nicht erkennbar, allerdings erwies sich das Mittel bereits auf kürzere Distanz als repellierend, denn der Großteil der Zecken ging gar nicht erst auf die Trommel über. Auch die Zeitdauer bis zum Überwecheln war im Vergleich zur Kontrolle signifikant verzögert. Von den Zecken, die auf die Trommel übergangen ließen sich ca. 70% von der behandelten Oberfläche abfallen. Dieser Repellenteffekt äußerte sich auch in einer signifikant kürzeren Verweildauer der Zecken auf der Trommeloberfläche.

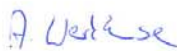
Literatur

Dautel, H. (2004). Test systems for tick repellents. Mini Review. International Journal of Medical Microbiology 293, Supplement 37: 182-188.

Dautel, H., Kahl, O., Siems, K., Oppenrieder, M., Müller-Kuhr, L., Hilker, M. (1999). A novel test system for the detection of tick repellents. Entomologia Experimentalis et Applicata 91: 431-441.

Sokal, R.R. Rohlf, F.J. (2000). Biometry, 3rd ed. Freeman, New York.

IS INSECT SERVICES GmbH
Haderslebener Str. 9 • 12163 Berlin
Telefon/Fax: 030 - 820 96 555
www.insectservices.de



Berlin, den 30.09.2008

Dipl. Biol. Anita Werkhausen



Dr. Hans Dautel