

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of Azadirachtin on Terminating Eggs and Larvae of *Rhipicephalus sanguineus*

Natcha Thaboonruang<sup>1</sup> Nutjaree Rungrat<sup>1</sup> Pattaraporn Pakdeedindan<sup>1</sup> and Raneer Singh<sup>2\*</sup>

### Abstract

Recently, there have been many studies of alternative methods of tick control by using plant extraction substances that can replace the chemicals used. Neem is one compound among these plants whose main active ingredient is azadirachtin that has been shown to have acaricide and insecticide properties. This study aims to investigate the efficiency of an alcohol extract of neem that would inhibit tick egg hatching and terminate immature ticks. Neem leaves whose main active ingredient is an activator (azadirachtin) were extracted by 50% ethyl alcohol. The substance was prepared to be concentrated at 1%, 5%, 10%. Flumethrin 6% (Bayticol<sup>®</sup>) and distilled water were used as positive and negative controls. Each substance was put into 5 replications of petri dishes containing 50 tick eggs. Data were recorded as number of eggs hatching and death rate of immature hatched ticks for the duration of 2 weeks.

The results showed that 5% and 10% of neem extract could inhibit 55% and 78% egg hatching of ticks respectively. Only neem extract at 10%, however, could inhibit 50% of the immature ticks, which was comparable to Bayticol<sup>®</sup> (58.8±27.5).

In conclusion, neem extract is effective in eliminating ticks by inhibiting the egg hatch and terminating immature ticks. Neem extracts acts in a dose dependent manner in terminating immature ticks and inhibiting tick eggs hatching. Neem extract has a potential as a new alternative to be used in controlling ectoparasites which is also of benefit to the environment as it has low toxicity. However, further study is required for long-term use toxicity on animals and also for the more effective preparation of neem extract.

*KKU Vet J. 2014;24(2):169-174.*

<http://vmj.kku.ac.th>

**Keywords:** Neem extracts, Azadirachtin, *Rhipicephalus sanguineus*, Brown dog tick, Flumethrin

<sup>1</sup>The fifth year student, <sup>2</sup>Department of Phamacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. 40002.

\*Corresponding author E-mail: [sranee@kku.ac.th](mailto:sranee@kku.ac.th)

## ประสิทธิภาพของสาร Azadirachtin ในการยับยั้งการฟักของไข่ และตัวอ่อนของเห็บในสุนัข

ณัชชา ทาบุญเรือง<sup>1</sup> นุจารี รุ่งรัตน์<sup>1</sup> ภัทรพร ภักดีดินแดน<sup>1</sup> และ ราณี ชิงห์<sup>2\*</sup>

### บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการศึกษาจำนวนมากถึงทางเลือกอื่นเพื่อควบคุมการแพร่ของเห็บ โดยการใช้สารสกัดจากพืชที่สามารถทดแทนสารเคมีมาแทน สะเดาเป็นหนึ่งในพืชที่ได้มีการศึกษาสารสกัดสำคัญที่ได้คือ Azadirachtin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น acaricide และยาฆ่าแมลง ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสะเดาด้วยอัลกอฮอล์ ซึ่งอาจมีคุณสมบัติในการยับยั้งการฟักของไข่เห็บ และมีผลในการยับยั้งการเจริญของตัวอ่อนของเห็บซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในอนาคต ใบสะเดามีสารสำคัญคือ Azadirachtin ซึ่งได้จากการสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50% และสารสกัดที่ได้ถูกนำมาเตรียมในรูปความเข้มข้น 1% 5% และ 10% สารควบคุมคือ ฟูลมิทริล (ไบติคอล) 6% และน้ำกลั่น โดยใส่สารสกัดลงในจานทดลองที่มีไข่เห็บจำนวน 50 ฟอง และใส่สารแต่ละชนิดลงในจาน 50 มิลลิลิตรทำซ้ำ 5 ครั้งบันทึกข้อมูลจำนวนไข่ที่ฟักและอัตราการตายของตัวอ่อนที่ได้จากการสังเกต เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสะเดาที่มีความเข้มข้น 5% สามารถยับยั้งการฟักของไข่เห็บได้ 55% ขณะที่ความเข้มข้น 10% สามารถยับยั้งได้ 78% และยังพบว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้น 10% เท่านั้นที่สามารถยับยั้งความสมบูรณ์ของตัวอ่อนได้ 50% เมื่อเทียบกับกลุ่ม Bayticol<sup>®</sup> (58.8±27.5)

สรุปผลการทดลองได้ว่าสารสกัดสะเดามีประสิทธิภาพในการกำจัดเห็บโดยการยับยั้งการฟัก และยับยั้งความสมบูรณ์ของตัวอ่อน โดยการออกฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาเป็นแบบขึ้นอยู่กับความเข้มข้น (dose-dependent manner) ในการออกฤทธิ์ ดังนั้น สารสกัดสะเดาเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ควบคุมปรสิตภายนอกไม่มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมและมีความเป็นพิษต่ำ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาพิษของสารสกัดสะเดาเมื่อมีการใช้ในระยะเวลาในสัตว์ และรูปแบบการเตรียมสารสกัดสะเดาที่มีความคงตัวเพื่อให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มช. 2557;24(2):169-174.

<http://vmj.kku.ac.th>

คำสำคัญ: สารสกัดสะเดา *Azadirachtin* *Rhipicephalus sanguineus* เห็บน้ำตาลในสุนัข ฟูลมิทริล

<sup>1</sup>นักศึกษาระดับปริญญาโท คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup>ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

\*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ อีเมลล์: [srane@kku.ac.th](mailto:srane@kku.ac.th)

## Introduction

Brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) are the most widespread and well recognized as a vector of zoonotic diseases such as *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis* and many more [1]. Currently, brown dog ticks are considered as urban pests due to their high levels of infestation and their ability to parasitize other hosts including human. Eradication of ticks principally uses chemical products which are prepared in different forms such as shampoo, powder, topical, injection and oral drugs [2]. For instance, the topical chemical drug in which the main active substance is Fipronil, can cause irritation of the exposed area, hair loss and if dogs lick the exposed area, can have side effects e.g. salivation. Ivermectin injection is easier to use in animals that are difficult to restrain, however, the side effects and contraindications of using this drug in some breeds of dogs, e.g. Collie, and Old English Sheep dogs. In addition, this compound cannot be used in dogs less than 6 weeks of age. Most of these products cause high levels of residues that are host intoxicants in animals as well as in humans. It can also cause the development of resistance in ticks [3].

Recently, there are many studies of alternative methods of tick control by using plant extract substances that can replace the chemicals used. Neem is one among these plants extracts whose main active ingredient is azadirachtin that has shown to have acaricide and insecticide properties [4]. There are few studies of neem extract that has effect on fertility and survival of larvae when tested in *Rhipicephalus sanguineus* [5]. Thus, this study aims to investigate the efficiency of an alcohol extract of neem at concentrations of 1%, 5% and 10% that could inhibit tick egg hatching and terminate immature ticks that may be useful to apply in the future.

## Materials and Methods

### Extraction

The neem leaves were washed and sliced into small pieces, then put into a tray by spreading them in a thin layer. The leaves were dried in the incubator at 55°C and left in the incubator for 18-20 hours. Then the dried leaves were crushed and used. The neem alcohol extract was prepared in the laboratory by using crushed dried leaves mixed with 50% ethyl alcohol and stirred well. This mixture was stored in a jar with the cover sealed with paraffin for 3 days at room temperature. After this period, the extract was filtered and evaporated in an evaporator. The final product was in powder form which used to prepare dilutions of 1%, 5% and 10% [5].

### Experiments in Petri dishes

For the egg hatching test, 0-6 hr-old *R. sanguineus* eggs were used. Five replicate petri dishes were used for treated, positive and negative control samples. The tick eggs were placed in each petri dish with 50 eggs per plate. In treatment samples an aliquot of 50  $\mu$ L of neem extract compound preparation with concentrations at 1%, 5% and 10% were pipetted on to the base of the petri dishes. The solutions were distributed thoroughly on each treated dish. Flumethrin 6% (Bayticol<sup>®</sup>, Bayer Animal Health, Isando) and sterile water were served as positive and negative control, respectively. After that the petri dishes were sealed with paraffin and placed at room temperature. No death of larva and hatched tick eggs were observed and recorded once a day for 2 weeks.

### Statistical analysis

Data were compared between the groups by using one-way ANOVA and Post-Hoc tests (Multiple comparisons). The statistical significance was considered at the level of 95% confidence. All the data results were represented as mean $\pm$ SD.

## Results

After 2 weeks of experiment the results showed that 5% and 10% neem extract had efficiency in the elimination of ticks, which can inhibit 55% and 78% egg hatching (Table 1). Only 10% of neem extract, however, can inhibit 50% of the immature ticks, which was comparable to Bayticol<sup>®</sup> (Table 1).

**Table 1.** Mean $\pm$ SD percentages of hatched tick eggs and dead larvae in replicate petri dishes loaded with 50 eggs each after treatment with various concentrations of neem which was extracted by ethyl alcohol in comparison with positive and negative controls.

Substances	% Egg hatching (mean $\pm$ SD)	% Death of larvae (mean $\pm$ SD)
1% neem extract	100 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
5% neem extract	45.20 $\pm$ 7.82 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
10% neem extract	22.20 $\pm$ 15.00 <sup>c</sup>	49.20 $\pm$ 33.41 <sup>b</sup>
Sterile water	92.00 $\pm$ 11.31 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
6% Bayticol	36.00 $\pm$ 22.84 <sup>b,c</sup>	58.81 $\pm$ 27.46 <sup>b</sup>

P < 0.05 for statistical significant between groups (a, b, c)

## Discussion

Effective tick control requires suppression of egg and larval production and also elimination of adults. Azadirachtin may effectively control ticks [5-7]. The results of this study showed the neem leaves extract effectively inhibited egg hatch, however, the concentration of 10% was the minimum dose needed to terminate the tick larvae which is comparable to the commonly used chemical (Flumethrin or Bayticol®) in that 64% can inhibit egg hatch and 58.81% can kill the larvae. Recently, the study by Denardi et al. (2010) reported that the aqueous extracts of neem caused the changes in cells of the reproductive system of *R. sanguineus* especially in the oocytes which also support the current results.

In conclusion, neem extracts are effective in eliminating ticks by inhibiting egg hatch and terminating immature ticks. The results showed that the neem extract acts in a dose dependent manner in terminating immature ticks and inhibit tick egg hatching. Neem extract has the potential as a new alternative in controlling ectoparasites which also may have a benefit to the environment as it has low toxicity.

## Acknowledgements

We would like to thank Dr. Jareerat Aium-saad for her assistance and guidance for the neem extract processes.

## References

1. Denardi SE, Bechara GH, de Oliveira PR, Camargo-Mathias MI. Azadirachta indica A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp Parasitol.* 2010; 126: 462-470.
2. Centers for Disease control and prevention. Life cycle of hard ticks that spread disease. Online Resources, Inc.2012. [cited 2013 June 25]. Available from: [http://www.cdc.gov/ticks/life\\_cycle\\_and\\_hosts.html](http://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html)
3. Mulla MS, Su T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J Am Mosq Control Assoc.* 1999; 15: 133-152.
4. Nation Research Council. Neem, A tree for solving global problems. National Academy Press, Washington DC; 1992. p. 108.
5. Guerrini VH, Kriticos, CM. Effects of azadirachtin on Ctenocephalides felis in the dog and the cat. *Vet Parasitol.*1998; 74: 289-297.

6. Giglioti R, Forim MR, Oliveira HN, Chagas ACS, Ferrezini J, Brito LG, et al. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol.* 2011; 181: 309-315.
7. Landau SY, Provenza FD, Gardner DR, Pfister JA, Knoppel EL, Peterson C. Neem tree (*Azadirachta indica* Juss.) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol.* 2009; 165: 311-317.