

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FORMULATI PER IMPREGNAZIONE DI TESSUTI E DI MATERIALI PRE-IMPREGNATI DI DIVERSA NATURA

Luciano Toma, Roberto Romi

Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il termine “biocidi” (Direttiva 98/8/EC) racchiude una moltitudine di principi attivi (p.a.) sia chimici che biologici, anche molto diversi tra loro, e di loro preparati destinati alla eliminazione o al controllo di organismi nocivi. I Biocidi sono suddivisi in 23 gruppi, tra i quali rientrano gli insetticidi, gli acaricidi, i rodenticidi, gli antiparassitari per uso umano, i repellenti utilizzati per il controllo degli organismi infestanti in campo civile e di quelli d’interesse medico-sanitario (sostanzialmente artropodi e piccoli roditori). Fino ad oggi autorizzati dal Ministero della Salute come Presidi Medico-Chirurgici (PMC), nel nuovo ordinamento questi prodotti sono riuniti rispettivamente nei gruppi 14 (rodenticidi), 18 (insetticidi/acaricidi e antiparassitari) e 19 (repellenti e attrattivi).

Il trattamento dei materiali con principi attivi insetticidi o repellenti è una soluzione volta a ridurre al minimo il contatto tra uomo e artropodi ematofagi (soprattutto zanzare e zecche) vettori di agenti patogeni responsabili di malattie umane e degli animali domestici.

Indossare capi trattati oppure usare zanzariere e tende impregnate con insetticidi nelle abitazioni o comunque in locali dove si soggiorna a lungo, è una misura messa a punto in origine come misura di profilassi personale soprattutto contro la malaria e altre malattie trasmesse da zanzare (es. Febbre gialla, Dengue, West Nile) in zona di endemia, in seguito estesa ovunque vi fosse la necessità di proteggersi da artropodi vettori di agenti patogeni per l’uomo.

Sebbene questo tipo di presidi presto saranno di libera vendita anche in Italia, tuttavia il loro uso dovrebbe essere riservato a mestieri o situazioni di reale rischio (come ad es. per l’impregnazione di uniformi della Guardia Forestale a protezione dalle zecche) piuttosto che all’impiego generalizzato contro artropodi arrecanti solo fastidio.

Principi attivi: repellenza e irritabilità

Comunemente ci si riferisce all’impiego di questi prodotti in termini generali come “repellenti” ovvero molecole in grado di tenere lontani gli artropodi ematofagi ed evitare le loro punture. Sebbene l’obiettivo finale sia il medesimo, non tutti i prodotti per impregnazione sono repellenti. A questo proposito è opportuno ricordare che i p.a. repellenti consistono in molecole di origine naturale o di sintesi non insetticide, che esplicano la loro funzione evaporando dalla superficie trattata agendo sugli artropodi ematofagi nella loro fase di avvicinamento all’ospite sul quale effettuare il pasto di sangue. L’effluvio proveniente dall’evaporazione del repellente viene percepito dall’artropode in avvicinamento che ne risulta disorientato e confuso tanto da non

essere più in grado di localizzare l'ospite. Va da sé che più il prodotto evapora rapidamente e abbondantemente, maggiore risulta la sua efficacia.

In Italia sono registrati 4 p.a. dotati di una attività repellente apprezzabile e documentata: il DEET, il KBR o Icaridina, il Citriodiol e l'IR3535, di cui però solo il primo è stato già utilizzato per l'impregnazione di tessuti.

L'altro gruppo di prodotti che svolgono una azione simile sono alcuni Piretroidi di seconda e terza generazione (Permetrina, Deltametrina, Cypermetrina, ecc.), molecole di sintesi originate dal piretro naturale, caratterizzate da spiccata azione insetticida e lunga attività residua. Questi prodotti agiscono per contatto, esplicando una azione irritante sull'artropode che, confuso, spesso abbandona l'ospite prima ancora di aver assorbito la dose letale di insetticida. Comunque il semplice contatto con una superficie trattata impedisce al vettore di effettuare il pasto di sangue (per questo l'azione di questi piretroidi è definita anche "anti-feeding"). Efficacia e durata dell'attività insetticida/irritante nel tempo ne fanno degli ottimi candidati per il trattamento di tessuti e altri materiali impregnabili. La Permetrina è ad oggi il principale insetticida impiegato per questo tipo di uso (la Deltametrina ad es. è utilizzata solo per l'impregnazione di zanzariere da letto).

Esperienze passate e situazione in Italia

La Permetrina impregna i tessuti in modo molto persistente aderendo alle fibre del tessuto così da trasferirsi sulla pelle in quantità minima e tale da resistere a diversi lavaggi. Negli Stati Uniti e in alcuni Paesi europei sono da tempo in commercio prodotti spray a base di Permetrina per l'impregnazione di equipaggiamento da campeggio o per escursioni in aree a rischio. Questi prodotti sono stati concepiti sulla scia di preparati già da tempo utilizzati dall'esercito degli Stati Uniti per l'impregnazione delle uniformi da combattimento delle truppe che operano in scenario tropicale (Permanone = Permetrina 8%). In Italia, per proteggere le truppe in missione di pace all'estero dalle punture di zanzare e zecche, l'Istituto Farmaceutico Militare ha messo a punto e prodotto un kit ad uso individuale per l'impregnazione di uniformi e/o zanzariere da letto (2) regolarmente registrato come PMC. Nei saggi effettuati dopo l'impregnazione, la Permetrina rimaneva attiva anche dopo 4 lavaggi nelle lavanderie da campo. L'Esercito ha anche adottato concentrati emulsionabili commerciali, sempre a base di Permetrina (6-20%) per il trattamento impregnante di tende da campo (0,5 g/m²) da effettuarsi mediante l'impiego di pompe a pressione costante, che assicuravano da 3 e 6 mesi di protezione.

La più recente tecnica di impregnazione consiste nella creazione di un nuovo prodotto che nasce da un processo chimico che fissa la molecola di insetticida alla fibra di un tessuto sintetico tanto da renderla stabile (3). Per quanto esposto, mentre la Permetrina in queste condizioni esplica completamente la sua azione insetticida quasi azzerando l'eventuale assorbimento cutaneo, le prove condotte con molecole di DEET hanno dato esito negativo perché il prodotto, impossibilitato ad evaporare, perde ogni potere repellente.

Sempre nell'ambito dei materiali trattati, attualmente in Italia in esistono solo pochi prodotti commerciali di libera vendita (quindi non registrati come PMC). Tali prodotti sono per la gran parte braccialetti impregnati con repellenti di origine naturale, quali l'estratto di citronella, il geraniolo, il Neem, e altri, che nei casi migliori assicurano una modesta attività repellente in un'area di limitata estensione intorno al punto di applicazione (polso o caviglia).

Normativa

Il Regolamento (UE) 528/2012 del Parlamento Europeo del 22 maggio 2012, fa riferimento alla problematica in questione al Capo XIII, articolo 58 “Immissione sul mercato di articoli trattati” (1).

Il presente riferimento normativo si applica esclusivamente agli articoli trattati che non sono di per sé biocidi e non si applica agli articoli il cui trattamento è limitato alla disinfezione o fumigazione (locali o contenitori usati per il magazzinaggio o il trasporto) con p.a. senza attività residua. Gli articoli impregnati sono immessi sul mercato unicamente se tutti i principi attivi con cui sono stati trattati o che essi contengono, sono iscritti nell’elenco stilato conformemente all’articolo 9, paragrafo 2, per il tipo di prodotto e per l’uso pertinente, oppure nell’Allegato I.

In linea generale, la valutazione che viene effettuata è relativa al rischio sanitario e/o ambientale legato al principio attivo presente nel prodotto biocida nonché a quello di eventuali altre sostanze coformulanti (sarà effettuata per ciascuna di esse nel caso fossero presenti). In particolare saranno valutati il tipo e l’entità del rischio legato all’uso corrente proposto per il prodotto biocida oltre a scenari realistici del tipo “nella peggiore delle ipotesi” compresi gli aspetti connessi con la produzione e lo smaltimento dello stesso.

In base a tali riferimenti normativi appare chiaro che il biocida non è l’articolo trattato in se, ma solo il p.a. utilizzato per l’impregnazione, di cui va valutata l’efficacia in un particolare tipo di formulato come questo.

Valutazione dell’efficacia degli articoli trattati

Per la valutazione dell’efficacia si seguono in linea di massima le linee guida della *World Health Organization* (WHO) (4) che a tutt’oggi rappresentano lo standard per condurre saggi mirati e riproducibili. Tuttavia, va ricordato che gli standard WHO sono stati concepiti e messi a punto in aree malariche per la necessità di impregnare le tende e le zanzariere con insetticida e che dunque i saggi hanno come target zanzare del genere *Anopheles*; questo richiede modifiche per adattarli agli artropodi vettori locali e in particolare alle zecche.

Saggi di laboratorio

Valutazione dell’attività insetticida dei piretroidi

In base a tali protocolli la concentrazione di p.a. (Permetrina) deve essere contenuta entro il 25% del contenuto dichiarato (certificato da analisi chimica fornita dal produttore). I saggi di efficacia sono test di contatto forzato da condursi su campioni di tessuto trattati e asciugati a 30°C, secondo lo standard WHO. Il primo test condotto subito dopo l’impregnazione e la prima asciugatura, serve a costruire una retta di regressione basata su mortalità e tempi di esposizione: la percentuale di mortalità è data dal numero di organismi esposti che non si siano ripresi dall’abbattimento dovuto al contatto forzato (knock down) dopo 24h di ricovero in ambiente non trattato. I tempi di esposizione possono variare da pochi secondi a diversi minuti, l’importante è ottenere almeno 3 o 4 punti di sopravvivenza che permettano di costruire la retta e quindi ottenere i valori di TL50 e TL 90 (ovvero dei tempi di esposizione che uccidono mediamente il 50% e il 90% di mortalità tra gli organismi esposti. IL valore di TL90 fungerà da riferimento per i test seguenti qualora si volesse dimostrare l’attività residua del p.a. nel tempo e/o dopo ripetuti lavaggi. Ad ogni test successivo al primo, gli artropodi saranno esposti ad un

solo tempo discriminante pari al valore di TL90 del primo test, che fungerà da valore soglia per l'efficacia (% mortalità $\geq 90\%$). Gli organismi elettivi per questi saggi sono *Culex pipiens* e *Aedes albopictus* per le zanzare e *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus* per le zecche: si utilizzano femmine adulte a digiuno per tutte le specie (anche grosse ninfe per le zecche), sottoponendo al contatto forzato almeno 10-15 zanzare e 5 zecche per ogni porzione di tessuto. Ogni saggio va condotto con 3 repliche di porzioni trattate più un controllo condotto su una porzione non trattata dello stesso tessuto, con gli stessi tempi di esposizione.

Valutazione dell'attività residua dopo lavaggio o invecchiamento

La valutazione dell'attività residua dopo il lavaggio viene effettuata su campioni di tessuto impregnato, di trattato di 25 cm di lato. Questi campioni vengono lavati singolarmente in beakers da 1 litro, contenenti 0,5 litri di acqua distillata alla temperatura di 30°C con aggiunta di sapone di Marsiglia in ragione di 2 g/L, mantenendo in agitazione per 10 minuti a 155 movimenti al minuto. Quindi il campione viene sciacquato due volte per 10 minuti in acqua distillata nelle stesse condizioni di agitazione e asciugato a temperatura ambiente; per la valutazione dell'attività residua nel tempo i campioni vengono conservati al buio. Per testare l'efficacia dopo eventuali lavaggi multipli o periodi d'invecchiamento si ripete la tessa procedura riportata nel paragrafo precedente.

Valutazione dell'attività irritante o repellente

Qualora si vogliano valutare su tessuti trattati altre caratteristiche dei piretroidi diverse dall'attività insetticida, come ad esempio il potere irritante (cioè quando l'artropode si allontana prima di aver assorbito la dose letale del p.a.), l'effetto "anti-feeding" (cioè quando l'artropode non riesce ad effettuare il pasto di sangue) oppure l'attività di un repellente, si dovrà ricorrere ad un altro tipo di prova detta "tunnel" test. L'apparato per l'esperimento (conosciuto anche come "olfattometro") è costituito da un tubo (tunnel) lungo 60 cm e largo 25 cm che unisce due gabbie di medie dimensioni (es. 40 cm di lato): quella a monte del tubo che conterrà gli artropodi di cui testare il comportamento e quella valle un animale esca opportunamente contenuto a 1/3 della lunghezza del tunnel è posto un setto che sorregge un campione quadrato di 20 cm di lato di tessuto trattato, forato con 12-16 buchi di 1 cm di diametro che gli artropodi devono necessariamente attraversare per raggiungere l'esca. Parallelamente sarà messo in funzione un secondo apparato tunnel che porta nel setto separatore un campione dello stesso tessuto non trattato che fungerà da sistema di controllo.

L'esperimento si protrae per alcune ore di giorno o di notte a seconda della specie da saggiare, a $T = 26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 70-75%. Il confronto e la significatività tra quanto accade nel tunnel trattato e in quello non trattato consentirà di valutare l'idoneità o meno del tessuto trattato.

Artropodi impiegati a digiuno:

- a) zanzare, da 25-50 femmine di 5-8 giorni di età;
- b) flebotomi, 20-30 femmine di 3-5 giorni di età;
- c) zecche, 10-20 esemplari tra grosse ninfe o femmine adulte.

Valutazione per piccoli articoli indossabili trattati con p.a. repellenti (braccialetti e simili)

Un prodotto in materiale impregnato con un p.a. repellente (inserito in Allegato I), proposto per la protezione individuale dalle zanzare, per esempio, richiede ovviamente una opportuna prova per dimostrarne l'efficacia nei termini che si vogliono riportare in etichetta. In questi casi

si esegue un semplice test del tipo “arm in cage”, comunemente utilizzato per valutare l’efficacia dei repellenti per uso topico.

Test di campo

Per la dimostrazione dell’efficacia verso artropodi ematofagi volanti o striscianti, sia di prodotti contenenti un p.a. insetticida sia irritante che repellente, saranno richiesti saggi di campo. L’efficacia di tessuti trattati, intesa come inibizione dell’attività trofica su ospite, deterrenza e mortalità, deve essere provata in situazioni reali; il materiale trattato e la specie dell’artropode, orientano diversamente di volta in volta il tipo e le modalità con cui condurre l’esperimento. A tutt’oggi la prova di campo più informativa e affidabile rimane quella dell’uomo esca, comunemente in uso per la valutazione dei repellenti per uso topico verso insetti volanti (zanzare) e per quella dell’efficacia di alcuni tipi di trattamenti adulticidi. Coppie di volontari (uno che indossa indumenti trattati, l’altro non trattati) vengono esposti in spazi aperti all’aggressione da parte delle zanzare o altri insetti ematofagi. Si conta e si paragona il numero di “atterraggi” sui due soggetti nell’unità di tempo. Il test va ripetuto almeno 3 volte con soggetti diversi. Il test di campo per le zecche si basa sul medesimo principio solo che i due volontari sono itineranti in un’area densamente infestata. Si contano e confrontano le zecche rimaste attaccate ai soggetti dopo la “passeggiata”. Necessarie diverse repliche.

Considerazioni e conclusioni

Alla luce di quanto esposto, si vuole sottolineare che, sebbene i materiali impregnati siano trattati con p.a. insetticidi o repellenti di cui sia nota l’efficacia, prodotti nuovi di questo tipo andranno valutati secondo i criteri standard qui presentati in via generale. Qualunque affermazione specifica riferita all’efficacia del prodotto su un determinato animale target andrà supportata da un test mirato che giustifichi quanto riportato in etichetta. Si tratta infatti di prodotti la cui efficacia può variare in base al tipo di materiale di supporto e agli usi per cui sono destinati e agli organismi target per cui sono concepiti; ovviamente questi aspetti dovranno soddisfare i criteri di tutela della salute umana e dell’ambiente come previsto dal Regolamento.

Bibliografia

1. Communication and Information Resource Centre for Administrations, Businesses and Citizens (CIRCABC). *Manual of decisions for implementation of directive 98/8/EC concerning the placing on the market of biocidal products*. Brussels: European Commission; 2014.
2. Romi R, Peragallo M, Sarnicola G, Dommarco R. Impregnation of uniforms with permethrin as a mean of protection of working personnel exposed to contact with hematophagous arthropods. *Annali di Igiene* 1997;9(4): 313-9.
3. Romi R, Lo Nostro P, Bocci E, Ridi F, Baglioni P. Bioengineering of a cellulosic fabric for insecticide delivery via grafted cyclodextrin. *Biotechnol Prog* 2005;21(6):1724-30.
4. World Health Organization. *Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets*. Geneva: WHO; 2005. (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11)