

Valutazione dell'effetto repellente ed *anti-feeding* dell'olio d'aglio (*Allium sativum*) nei confronti dei flebotomi (Diptera: Psychodidae)

Laura VALERIO e Michele MAROLI

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

Riassunto. - È stato saggiato l'effetto protettivo e *anti-feeding* di un estratto d'olio d'aglio contro la puntura dei flebotomi (*Phlebotomus papatasi*). L'efficacia è stata studiata secondo due differenti procedure di laboratorio: 1) applicazione topica dell'olio d'aglio sul dorso della mano di volontari e valutazione della repellenza mediante lo "standard cage test", e 2) valutando la frazione di flebotomi che si nutriva su membrana artificiale trattata con il prodotto, rispetto al controllo non trattato. La protezione è stata del 97% circa alla diluizione più alta (1%) e del 40% a quella più bassa (0,005%). Tale efficacia è stata osservata sia nelle prove per applicazione topica nel "test cage" che nelle prove su membrana artificiale. I risultati ottenuti confermano precedenti osservazioni sull'effetto repellente dell'aglio contro vari gruppi di artropodi (acari ed insetti) di interesse sia sanitario che agrario.

Parole chiave: olio d'aglio, flebotomi, vettori di leishmaniosi, volontari, repellenti, protezione, controllo.

Summary (*Evaluation of repellent and anti-feeding effect of garlic oil (Allium sativum) against the bite of phlebotomine sandflies Diptera: Psychodidae*). - The repellent and anti-feeding effect of garlic oil was evaluated in laboratory conditions against the bite of *Phlebotomus papatasi* females. The effectiveness was evaluated by two different laboratory procedures: (i) topical application of garlic oil on five human volunteers, using the "standard cage test", and (ii) feeding sandflies on artificial membranes treated with the compound. Garlic oil showed a significant protection by topical application on the skin of volunteers, being the protection 97% and 40%, respectively at 1% and 0.005% dilution. Garlic oil showed also an anti-feeding effect when tested on the artificial membrane feeding apparatus; the anti-feeding effect was dose dependent, being 100% at 1%. The results of the present study confirm previous observations on the repellent effect of garlic oil against haematophagous arthropods.

Key words: garlic oil, sandflies, *Leishmania* vectors, human volunteers, protection, control.

Introduzione

È stato dimostrato che alcuni componenti dell'aglio (*Allium sativum*) hanno un effetto tossico e/o repellente contro vari gruppi d'artropodi d'interesse sia sanitario che agrario. Già dagli anni '50, è stato osservato che formulazioni ottenute dall'aglio avevano un effetto tossico sulle zecche [1]. Negli anni '70, Amonkar e Reeves [2] hanno dimostrato che l'estratto alcolico d'aglio e l'olio ottenuto per distillazione in corrente di vapore avevano un effetto larvicida (100%) su alcune specie di zanzare (*Culex stigmatosoma*, *C. tarsalis*, *Aedes aegypti*, *Ae. triseriatus*, *Ae. sierrensis*). Nel 1971, Amonkar e Banerji [3] hanno isolato ed identificato due specifici elementi dell'aglio (diallil-disolfato e diallil-

trisolfato) ad azione larvicida anche su *C. pipiens*. L'effetto repellente di una miscela composta dall'olio d'aglio (1%), petrolio (89%) e cera d'api (10%) è stato dimostrato contro la puntura di *Simulium indicum* e di *C. fatigans* [4]. In tale studio sono stati sufficienti 2 g della formulazione per proteggere 900 cm² di pelle per un periodo di 7-8 ore. Rahaman e Motoyama [5] hanno dimostrato poi che l'aglio possiede un effetto repellente, ma non insetticida, anche contro due coleotteri parassiti degli alimenti conservati (*Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*). L'effetto tossico dell'aglio sulla schiusa delle uova di *Ae. aegypti* è stato studiato anche da Jarial [6], che ha osservato come le larve di zanzara non riescono ad uscire dall'esocorion se le uova vengono immerse in precedenza per 2 giorni in una soluzione

acquosa contenente estratto d'aglio al 6%. In Svezia, Stjenberg e Berglund [7] hanno condotto di recente un interessante studio sull'effetto repellente dell'aglio assunto giornalmente da un gruppo di militari. Gli autori hanno dimostrato che un gruppo di 50 militari, operanti in aree infestate da zecche, era meno esposto alle punture se assumeva una capsula d'aglio (1200 mg/die) rispetto a quello di controllo, rappresentato da altrettanti militari che invece venivano trattati con un placebo.

In letteratura non esistono dati sull'effetto repellente e/o tossico nei confronti dei flebotomi, piccoli insetti ematofagi, unici vettori delle leishmaniosi, siano esse zoonotiche che antroponotiche.

Nella presente ricerca è stato studiato l'effetto repellente e/o *anti-feeding* (inibizione del pasto di sangue) dell'olio d'aglio nei confronti dei flebotomi (Diptera: Psychodidae).

Materiali e metodi

Insetti utilizzati

I flebotomi utilizzati nel presente studio derivano da una colonia di *Phlebotomus papatasi* mantenuta in laboratorio presso l'ISS (Insettario, Reparto di Malattie Infettive trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Dipartimento MIPI) secondo metodiche precedentemente descritte [8, 9]. La colonia di *P. papatasi* è stata allestita con femmine gravide raccolte in una camera da letto nel centro di Roma [10].

Protocollo sperimentale

L'effetto repellente ed *anti-feeding* dell'olio d'aglio è stato valutato con due diverse metodiche standard di laboratorio. La prima, nota come *cage test* [11], prevede l'utilizzo di volontari, la seconda, *membrane feeding*, utilizza una membrana di pollo per far assumere un pasto di sangue ai flebotomi [12].

Cage test. - Sono stati arruolati 5 volontari ai quali è stato fatto divieto di usare profumi e/o colonie prima delle prove. Per ogni prova sono state impiegate 40 femmine di *P. papatasi*, d'età compresa fra 4-6 gg dallo sfarfallamento e a digiuno dal pasto di sangue. Le prove sono state condotte in condizioni standard di temperatura (24-25 °C), luminosità (illuminanza di 430 lux) ed umidità relativa (70-80% UR). Prima d'ogni prova, per ogni volontario è stato valutato il grado di attrazione verso i flebotomi. Ognuno si è sottoposto alla puntura dei flebotomi, introducendo la mano non trattata nella gabbia per 5 minuti, e registrando gli atterraggi di poche frazioni di secondo (*landing*, L) e i tentativi di puntura (*probing*, P). L'attrazione è stata calcolata come la mediana di tre repliche, ciascuna di cinque minuti

d'esposizione. L'efficacia dell'olio poi è stata valutata trattando con 15 µl del prodotto un'area del dorso della mano (4x3 cm) e proteggendo la parte non trattata con un guanto di lattice inerte. Ciascun volontario ha esposto la superficie trattata per 5 minuti: al tempo 0, a 30 e 60 minuti dopo il trattamento.

Membrane feeding. - A femmine di *P. papatasi*, d'età uniforme (4-6 giorni), è stata data la possibilità di nutrirsi di sangue attraverso una membrana di pollo trattata con 15 µl d'olio d'aglio a diverse concentrazioni. Ogni unità di *membrane feeding* (UMF) era costituita da un sistema riscaldante e da una camera (Ø 3,5 cm; 3 ml di volume) contenente sangue defibrinato di coniglio sulla quale era fissata la membrana di pollo. La UMF riscaldata a 36 °C veniva inserita poi per un'ora all'interno della gabbia contenente oltre 40 femmine di *P. papatasi*. Al termine della prova veniva registrato: a) il numero di femmine che avevano compiuto il pasto di sangue, b) il numero di femmine *knocked-down* (tramortite) entro la prima ora dall'esposizione, c) il numero dei morti (nutrito e non) entro le 24 ore.

Prove preliminari per diluire l'olio d'aglio concentrato (Aglio Plus Sinergix®, F.A.ZOO srl) sono state condotte con olio di mais. Tale diluente si è rivelato inadatto, giacché anche minime quantità d'olio (15 µl) applicate sul dorso della mano o sulla membrana risultavano adesive per i flebotomi. Pertanto, è stato utilizzato l'isopropanolo comunemente impiegato nei saggi sugli insetti per diluire principi attivi naturali e di sintesi. Saggiato da solo, l'isopropanolo è risultato inerte essendo la media dei P (32,0) simile a quella dei P del controllo bianco (35,7). Sono state saggiate le seguenti diluizioni: 1%; 0,1%; e 0,01%; 0,005%.

L'effetto repellente ed *anti-feeding* dell'olio d'aglio è stato calcolato secondo le formule:

$$a) ER = 100 - \frac{\text{media delle mediane di P di VT} \times 100}{\text{media delle mediane di P di VC}}$$

dove ER: effetto repellente; P: *probing*; VT: volontario trattato; VC: volontario controllo.

$$b) E A-F = 100 - \frac{\% \text{ flebotomi nutriti su MT} \times 100}{\% \text{ flebotomi nutriti su MC}}$$

dove E A-F: effetto *anti-feeding*; MT: membrana trattata; MC: membrana controllo.

Risultati e discussione

I valori di attrazione dei volontari arruolati nei confronti dei flebotomi sono risultati variabili da individuo a individuo, con valori medi d'attrazione compresi fra un minimo di 17,7 ed un massimo di 27,2.

Tuttavia di tale variazione si è tenuto conto nella valutazione dell'effetto protettivo dell'olio d'aglio, poiché la protezione esercitata da ciascuna concentrazione d'olio è stata calcolata in base al rispettivo controllo eseguito immediatamente prima della prova.

I valori di protezione esercitata dalle quattro concentrazioni scalari d'olio d'aglio, nei confronti di *P. papatasi* nei 5 volontari sono riportati nella Fig. 1. La protezione è risultata essere dipendente dalla concentrazione dell'olio. All'aumentare della concentrazione è corrisposta un'evidente diminuzione del numero dei P.

In questa prima serie di prove sono stati osservati valori di repellenza molto vicini per le concentrazioni 0,1% e 1% (Fig. 1). Pertanto, nelle prove successive di *membrane feeding* è stata saggiata solo la diluizione

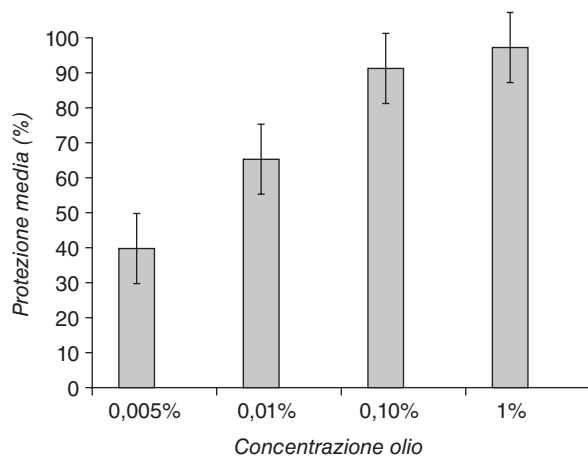


Fig. 1. - Protezione dell'olio d'aglio nei confronti di *P. papatasi*.

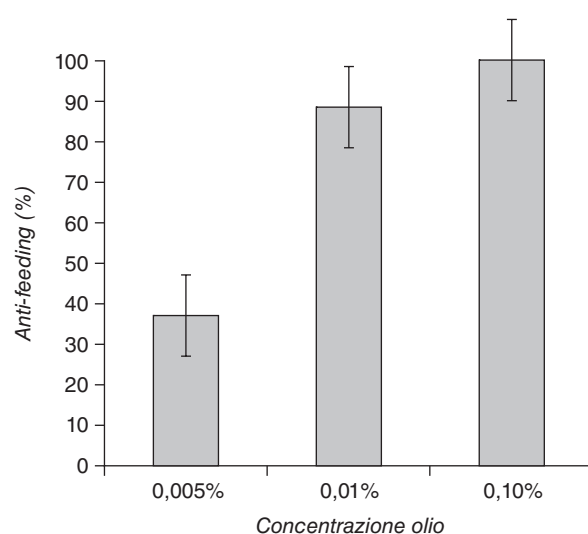


Fig. 2. - Effetto *anti-feeding* dell'olio d'aglio nei confronti di *P. papatasi*, valutato su membrana di pollo.

0,1%. Anche in questo caso l'effetto *anti-feeding* esercitato dall'olio d'aglio è stato dipendente dalla concentrazione, essendo appena inferiore del 40% alla concentrazione minima saggiata (0,005%) e del 100% a quella massima (0,1%) (Fig. 2).

In base a quanto osservato i nostri dati sembrano confermare precedenti risultati sull'effetto repellente dell'aglio contro vari gruppi d'artropodi (acari ed insetti) d'interesse sia sanitario che agrario. Contrariamente a quanto riportato in letteratura sull'effetto insetticida di alcuni componenti dell'aglio nei confronti di specie di zanzare, nel nostro studio non è stato evidenziato un effetto tossico significativo sui flebotomi venuti a contatto con l'olio d'aglio. Tale fenomeno è stato osservato anche da Rahaman e Motoyama [5] che hanno dimostrato che l'aglio ha un effetto repellente, ma non insetticida, contro due coleotteri parassiti degli alimenti conservati (*Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*).

Questi risultati di laboratorio se confermati dalla sperimentazione di campo indicano che l'olio d'aglio potrebbe costituire un metodo alternativo agli insetticidi di sintesi nella prevenzione della leishmaniosi. Specifici studi sull'eventuale protezione dell'olio d'aglio somministrato al cane (unico serbatoio di *Leishmania*) con la dieta giornaliera, potrebbero contribuire a definire il metodo d'impiego di questa misura protettiva contro i vettori di leishmaniosi in Italia [13-15].

Rigraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare i volontari arruolati per le prove del *cage-test*. Gli autori dichiarano che il protocollo di studio è stato conforme al profilo etico raccomandato dal Comitato Etico dell'Istituto Superiore di Sanità.

Ricevuto il 27 gennaio 2005.

Accettato l'8 giugno 2005.

BIBLIOGRAFIA

1. Reznik PA, Imbs YG. Ixodid ticks and phytoncides. *Zool Zh*, 1965;44:1861-64 [In russo], citato in *Rev Appl Entomol* 1968;6:17.
2. Amonkar SV, Reeves EL. Mosquito control with active principle of garlic, *Allium sativum*. *J Econ Entomol* 1970;63(4):1172-5.
3. Amonkar SV, Banerji A. Isolation and characterization of larvicidal principle of garlic. *Science* 1971;174(16):1343-4.
4. Bruyan M, Saxena BN, Rao KM. Repellent property of oil fraction of garlic, *Allium sativum* Linn. *Indian J Exp Biol* 1974;12:575-6.
5. Rahman GKMM, Motoyama N. Repellent effect of garlic against stored product pests. *J Pest Sci* 2000;25(3):247-52.
6. Jarial MS. Toxic effect of garlic extracts on the eggs of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a scanning electron microscopic study. *J Med Entomol* 2001;38(3):446-50.

7. Stjernberg L, Berglund J. Garlic as an insect repellent. *J Am Med Assoc* 2000;284(7):831.
8. Maroli M, Fiorentino S, Guandalini E. Biology of a laboratory colony of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1987;24:547-51.
9. Killick-Kendrick M, Killick-Kendrick R. The initial establishment of sandfly colonies. Proceedings of the First International Symposium on phlebotomine sandflies. Rome 4-6 September 1991. *Parassitologia* 1991;33:315-20.
10. Maroli M, Bettini S. Past and present prevalence of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Italy. *Parasite* 1997;4:273-6.
11. World Health Organization. (2000). *Repellents and toxicants for personal protection*. Geneva: WHO; 2000 (WHOPES/CDS/GCDPP/200.5) p. 49.
12. Maroli M. The artificial feeding of laboratory reared palearctic sandflies (Diptera: Psychodidae) for studies on the transmission of disease agents. *Ann Parasitol Hum Comp* 1985;60:631-4.
13. Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Atzeni MC. Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80:458-9.
14. Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L. Natural infection of sandfly *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1987;81:596-8.
15. Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L, Ready PD, Smith DF, Aquino C. Natural infections of phlebotomine sandflies with Trypanosomatidae in central and south Italy. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988;82:227-8.