

Aleksandra Gliniewicz, Ewa Mikulak, Marta Przygodzka

METHODS OF TESTING REPELLENT EFFICIENCY AGAINST TICKS

METODY BADANIA REPELENTÓW PRZECIWKO KLESZCZOM

National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene
Laboratory of Medical Entomology and Pest Control

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
Samodzielna Pracownia Entomologii Medycznej i Zwalczania Szkodników

ABSTRACT

The use of repellents is the most important in the tick-bite protection. The tests of repellents efficiency shall give strict answer whether ticks are repelled effectively or not by a given agent. Methods of testing repellent efficiency can be divided in three groups: experiments without tick host and host stimuli; studies simulating host stimuli, methods of testing repellents on animals or human volunteers. Studies on protected human volunteers are the nearest practical conditions of repellent use. However, there is sometimes a need of testing products with unknown toxicity to man; in such circumstances their efficiency should be evaluated in experiments in simulated human body conditions but without a person.

Key words: repellents, ticks, tick-bite protection

STRESZCZENIE

Podstawą profilaktyki antykleszczowej jest stosowanie środków odstrasżających (repelentów). Badania repelentów powinny jednoznacznie odpowiadać na pytanie, czy kleszcze są odstrasżane przez dany preparat. Aktualnie stosowane metody badań można podzielić następująco: metody stosowane w nieobecności żywicieli i ich bodźców, metody wykorzystujące symulacje bodźców żywicieli, metody, w których wykorzystywani są żywiele kleszczy. Badania z wykorzystaniem odpowiednio zabezpieczonego człowieka jako przynęty są najbardziej odpowiadające praktycznym warunkom stosowania repelentów. Często zachodzi jednak potrzeba badania produktów o nieznanym toksyczności dla człowieka i wtedy ich aktywność powinna być oceniana w układach doświadczalnych symulujących warunki ciała człowieka, ale bez jego udziału.

Słowa kluczowe: repelenty, kleszcze, ochrona przed ukłuciem kleszczy

INTRODUCTION

All ticks around the world, which consist of over 900 species, (1) are obligatory, temporary ectoparasites of animals and humans. Since they are reservoirs and vectors for dangerous and often fatal diseases, they are considered a serious threat to the health and life of humans, pets and farm animals (2). Tick-borne diseases present in Europe include amongst others borreliosis, tick-borne encephalitis, human granulocytic anaplasmosis and they are transmitted by ticks of the *Ixodes ricinus* species. Ticks of the *Haemophysalis spp.* and *Hyalomma spp.* species can transmit Crimean–Congo hemorrhagic fever; *Ripicephalus sanguineus* can transmit borreliosis, Mediterranean fever, human babesiosis; *Dermacentor spp.* ticks can be carriers of borreliosis, tick fever, human babesiosis, tick-borne encephalitis.

WSTĘP

Wszystkie kleszcze żyjące na świecie, a jest ich ponad 900 gatunków (1) są obligatoryjnymi, czasowymi ektopasożytami zwierząt i ludzi. Ponieważ są one rezerwuarami i wektorami groźnych i nierzadko śmiertelnych chorób, uważa się je za poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka, zwierząt domowych i hodowlanych (2). Choroby odkleszczowe występujące w Europie to m.in. borelioza, odkleszczowe zapalenie mózgu, ludzka anaplazmoza granulocytarna – przenoszone przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus*. Kleszcze z rodzajów *Haemophysalis spp.* i *Hyalomma spp.* mogą przenosić gorączkę krymsko-kongijską; *Ripicephalus sanguineus* boreliozę, gorączkę śródziemnomorską, ludzką babeszjozę; kleszcze *Dermacentor spp.* mogą być przenosicielami boreliozy, gorączki kleszczowej, ludzkiej babeszjozy, odkleszczowego zapalenia mózgu.

Some of the mentioned diseases can be transmitted transstadially within the population, which means that immature ticks can also infect, because in order to go through the next stage of development, the tick has to drink the blood of the host in each stage. Hence, it is important to prevent a human (or an animal) from the tick attack.

The range of ticks extends annually to new areas. The simultaneous effect of all favourable factors is responsible for this phenomenon i.e.: global change in the form of global warming, environmental and economic impact (spatial management and reduction of pesticides and other chemicals), increase of wildlife as a result of its protection and relocation of ticks to new areas due to tourism and the development of means of transport (3). It is worrying that ticks are often found in urban areas: parks, squares, allotments, kitchen gardens and urban forests where they live on plants (grasses, low bushes) growing along the paths attended by animals and people. It is estimated that in urban areas the risk of human infection with tick-borne pathogens is as high as in forest areas (4).

The eradication of ticks in their natural habitat is extremely difficult. As it is often based on the use of only chemical methods, it is not inert to the environment (5, 6, 7).

Due to limited effectiveness and negative impact on the environment, the use of chemical insecticides to eradicate ticks is secondary to the prevention consisting of appropriate behavior, the use of impregnated clothing, and repellents against these arthropods. The use of tested repellents present on the market are fundamental in tick prevention (8).

ACTIVE SUBSTANCES USED IN TICK REPELLENTS

Repellents are chemicals applied to the surface of the skin or other surfaces (such as clothing) which discourage arthropods from entering or climbing on the human or animal body. The following active substances are used in the ticks' repellents: N-N-diethyl-m-toluamide (DEET); 3-(N-n-Butyl-N-acetyl) aminopropionic acid ethyl ester (IR3535); KBR3023 (icaridine) and natural substances of plant origin, e.g. geraniol, citriodiol, eucalyptus oil (2).

DEET is an active ingredient most commonly used as a repellent substance. In repellents it is most commonly used in concentrations ranging from 7 to 31.6%. It is considered a "gold standard" for other repellents. Out of the 20,000 compounds tested so far, none has been as versatile as DEET.

IR3535 is another active ingredient often used in repellents. It has been available in Europe since 1970 while in the USA since 1999. When it comes to prod-

Niektóre z wymienionych chorób mogą być w obrębie populacji kleszczy przenoszone transstadialnie, a więc młodociane stadia kleszczy również mogą zakażać, gdyż aby przejść kolejny etap rozwoju, kleszcz w każdym ze stadiów musi napić się krwi żywiciela. Ważne jest wobec tego, aby nie dopuścić do zaatakowania człowieka (lub zwierzęcia) przez kleszcza.

Zasięg występowania kleszczy z roku na rok rozszerza się na nowe tereny. Za to zjawisko odpowiedzialny jest efekt synchroniczny całego zespołu sprzyjających czynników – zmiany globalne w postaci ocieplenia klimatu, zmiany krajobrazowo-gospodarcze (gospodarowanie terenem i ograniczenie stosowania pestycydów i innych środków chemicznych), wzrost liczebności dzikich zwierząt, jako rezultat ich ochrony oraz zawlekanie kleszczy na nowe tereny w związku z turystyką i rozwojem środków transportu (3). Niepokojący jest fakt, że obecnie kleszcze są często spotykane na terenach zurbanizowanych: w parkach, na skwerach, ogródkach działkowych i przydomowych oraz lasach miejskich, gdzie bytują na roślinach (trawy, niskie krzewy) rosnących przy ścieżkach, którymi uczęszczają zwierzęta i ludzie udający się na spacer. Szacuje się, że na terenach miejskich zagrożenie zakażenia ludzi patogenami przenoszonymi przez kleszcze jest tak samo wysokie jak na obszarach leśnych (4).

Zwalczanie występowania kleszczy w naturalnym środowisku jest wyjątkowo trudne, a ponieważ często oparte jest na wykorzystaniu wyłącznie metod chemicznych, nie jest obojętne dla tego środowiska (5, 6, 7).

W związku z ograniczoną skutecznością i ujemnymi skutkami dla środowiska, stosowanie chemicznych insektycydów do zwalczania kleszczy jest drugorzędne w stosunku do profilaktyki polegającej na odpowiednim zachowaniu, stosowaniu impregnowanej odzieży oraz preparatów odstraszaających te stawonogi zwanych repelentami. Podstawą profilaktyki antykleszczowej jest stosowanie przebadanych i dostępnych w sprzedaży repelentów (8).

SUBSTANCJE CZYNNIE STOSOWANE W ŚRODKACH ODSTRASZAJĄCYCH KLESZCZE

Repelenty to środki lub substancje odstraszaające stosowane na powierzchnię skóry lub inne powierzchnie np. odzież, które powodują zniechęcenie stawonogów do wchodzenia i wspinania się na ciało człowieka lub zwierzęcia. W preparatach do odstraszania kleszczy, w różnych stężeniach, stosowane są następujące substancje aktywne: N-N-dietylo-m-toluamid (DEET); ester etylowy kwasu 3-(N-n-butylo-N-acetylo)aminopropionowego (IR3535); kwas 1-piperidynokarboksylowy KBR3023 (ikarydyna) oraz substancje naturalne pochodzenia roślinnego, np. geraniol, citriodiol, olejek eukaliptusowy (2).

ucts licensed in Poland, it is used most commonly in concentrations of 7-20%. It is effective not only against ticks, but also against mosquitoes, tse-tse flies (*Glossinae*), horseflies (*Tabanidae*), black flies (*Simuliidae*) and wasps (*Vespula*).

A common ingredient in repellents is also ikaridine, synthesized in 1980 and available on the market since 2000. In formulations it is most commonly found in concentrations of 10-20%.

At present it is also believed that also natural substances possess the properties of repellents. These include the oils: anise, bergamot, camphor, cinnamon oil, clove, coconut, eucalyptus, geranium, lavender, lemon, nutmeg, orange blossom, wild mint, pine, thyme and oil of lemon eucalyptus. Plant oils are generally less effective and provide an acceptable level of protection for a shorter period of time than for example DEET. It is widely believed that compounds of plant origin are more user-friendly and harmless. Increasing the concentration of oils can boost efficiency, but their high concentrations can cause skin irritation. Many herbal products also exhibit properties toxic to vertebrates, for example eugenol is a substance which irritates eyes and skin and it proved to be a mutagen; citronellol irritates the eyes and it is also a mutagen. Moreover, it negatively affects the reproductive and nervous system. (8).

In the 1970s, the first pyrethroids were synthesized – those are pyrethrum-like compounds of similar chemical structure and insecticidal properties, but characterized by increased stability. Nowadays, they are part of many insecticides, an example being a compound such as permethrin used for the impregnation of clothing (military uniforms, clothing for employees working in forests, hunters) against ticks. Permethrin has a short-term repellent effect and long-lasting activity against ticks. Among various methods of impregnating clothing with permethrin, using polymeric carriers at elevated temperatures proved to be the most effective method. Research addressing this issue was carried out by M. Faulde et al. (9). Soldiers volunteered to participate in the research and, dressed in permethrin-impregnated uniforms, spent 36 hours in habitats with large numbers of ticks. The tests showed that wearing permethrin-impregnated clothing significantly reduced the risk of attack and bites by ticks. Out of 138 *Ixodes ricinus* ticks collected during the study, only 6 were recorded on volunteers wearing permethrin-impregnated clothing, whereas 132 ticks were found on volunteers wearing non-impregnated clothing. The repellent efficacy on clothing was determined at 95.5% (9). Similar studies were conducted by F. Dusbabek (10) and M. Faulde with their teams (11).

DEET jest substancją aktywną najczęściej stosowaną jako składnik repelentów. W repelentach najczęściej stosowany jest w stężeniach od 7 do 31,6%. Uważany jest za „złoty standard” dla innych repelentów. Na 20 000 przebadanych do tej pory związków żaden nie okazał się tak uniwersalny jak DEET.

Kolejną często wykorzystywaną w repelentach substancją aktywną jest IR3535. W Europie dostępny jest od 1970 r., w USA od 1999 r. W preparatach zarejestrowanych w Polsce występuje najczęściej w stężeniu 7-20%. Jest skuteczny nie tylko w stosunku do kleszczy, ale także komarów, much tse-tse (*Glossinae*), much końskich (*Tabanidae*) i meszek (*Simuliidae*) oraz os (*Vespula*).

Często spotykanym składnikiem repelentów jest też ikarydyna, zsyntetyzowana w 1980 r., dostępna na rynku od 2000 r. W preparatach najczęściej spotykana w stężeniu 10-20 %.

Współcześnie uważa się, że właściwości repelentów mają również także substancje naturalne. Wśród nich wymienia się olejki: anyżkowy, bergamotowy, kamforę, olejek cytrynowy, goździkowy, kokosowy, eukaliptusowy, geraniowy, lawendowy, cytrynowy, muszkatołowy, z kwiatów pomarańczy, mięty polnej, sosnowy, tymiankowy, a także olejek cytonellowy z eukaliptusa cytrynowego. Olejki roślinne są ogólnie mniej skuteczne i zapewniają akceptowalny stopień ochrony przez krótszy okres czasu niż np. DEET. Popularne jest przekonanie, że związki pochodzenia roślinnego są bardziej przyjazne i nieszkodliwe dla użytkownika. Zwiększenie stężenia olejków może zwiększać skuteczność, ale wysokie ich stężenia mogą powodować podrażnienia skóry. Wiele produktów roślinnych wykazuje także właściwości toksyczne dla kręgowców, np. eugenol jest substancją podrażniająca oczy oraz skórę i okazał się mutagenem; citronellol podrażnia oczy i również jest mutagenem, wpływa też negatywnie na rozrodczość i układ nerwowy. (8).

W latach siedemdziesiątych zsyntetyzowano pierwsze pyretroidy – związki o podobnej do pyretrum budowie chemicznej i właściwościach owadobójczych, ale charakteryzujące się większą trwałością. Obecnie wchodzi one w skład wielu preparatów owadobójczych. Przykładem takiego związku jest permetryna, stosowana do impregnacji odzieży (mundury wojskowe, odzież służbowa pracowników lasu, myśliwych) przeciwko kleszczom. Permetryna wykazuje krótkotrwałe działanie odstraszające oraz długotrwałe działanie kleszczobójcze. Wśród różnych metod impregnacji odzieży permetryną najbardziej skuteczna okazała się metoda z wykorzystaniem nośników polimerowych w podwyższonej temperaturze. Badania w tym kierunku przeprowadzili M. Faulde i wsp. (9). W testach udział wzięli ochotnicy – żołnierze, którzy przez 36 godzin przebywali w siedliskach o dużej liczbie kleszczy, ubrani w mundury zaimpregnowane permetryną. Wykazano, że noszenie odzieży zaimpre-

FACTORS AFFECTING REPELLENT EFFICIENCY

Preparations used to repel ticks exhibit different efficiencies depending on the active ingredient and the used formulation. The protection period that the repellent can provide varies. It depends on the chemical properties of the compound, the environmental features, the characteristics of the potential host and the tick species. Besides factors related to the chemical structure of the active ingredient and the properties of the formulation, factors such as temperature, air humidity, skin condition factors such as thickness, abrasions, minor injuries, sweat glands and dependent sweating intensity (e.g. strong sweating can shorten the protection period.) are also important. It is also significant to adhere to the rules of repellent use placed on labels. For example, when using various cosmetics or protective creams, the repellent is used at the end.

The ideal repellent for ticks should be low-toxic to humans and effective, it should fully support the protection and limitation of the spread of diseases whose vectors are those arthropods.

TESTING THE REPELLENTS' EFFICACY

Thanks to their availability and easy use, repellents are the most commonly used group of tick protection chemicals. This is why they should be carefully selected. Repellent studies should unambiguously answer the question whether or not the ticks are repelled by a given preparation.

Due to the test conditions, the currently used methods can be divided into the following:

1. Methods used in the absence of hosts and their stimuli
2. Methods that simulate host stimuli
3. Methods in which hosts are used

The first group methods are mostly repeatable and relatively easy to standardize. These are also relatively cheap and technically uncomplicated procedures. This includes, for example, the method of examining repellents on paper (filter paper) in Petri dishes. This method consists of applying the repellent on one half of the surface of the filter paper placed in the dish while leaving the other half untreated. During this experiment, the number of ticks on the repellent-treated and on the untreated half is compared. The ticks are placed in the center of the dish on an untreated circular surface. The ticks have a choice: they can either enter the surface treated with a chemical or on the untreated surface.

Another method out of this group is the use of negative ticks geotropy and their ability to attack hosts: the repellent is smeared all over the ends of sticks or strips of material that are further placed vertically so that the

gnowanej permetryną w znacznym stopniu zmniejszyło ryzyko ataku i ukłucia przez kleszcze. Na 138 kleszczy *Ixodes ricinus*, odłowionych w czasie badania, tylko 6 odnotowano u ochotników noszących odzież zaimpregnowaną permetryną, zaś 132 kleszcze znaleziono na ochotnikach noszących odzież niezaimpregnowaną. Skuteczność repelentną odzieży określono na 95,5 %. (9). Podobne badania prowadzili *F. Dusbabek* (10) i *M. Faulde* z zespołami (11).

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA SKUTECZNOŚĆ REPELENTÓW

Preparaty stosowane do odstraszenia kleszczy wykazują różną skuteczność w zależności od zastosowanej substancji aktywnej i formulacji. Okres ochrony, jaką może zapewnić repelent jest różny. Zależy on od właściwości chemicznych związku, cech środowiska, cech potencjalnego żywiciela oraz gatunku kleszcza. Poza czynnikami związanymi z budową chemiczną substancji aktywnej i z właściwościami formulacji ważne są również czynniki takie jak: temperatura, wilgotność powietrza oraz czynniki związane z kondycją skóry: jej grubość, otarcia, drobne zranienia, ilość gruczołów potowych i uzależniona od tego intensywność pocenia się (np. silne pocenie się może skrócić okres ochrony). Istotne jest również stosowanie się do zasad korzystania z repelentu zamieszczanych na etykietach. Na przykład w przypadku stosowania różnych kosmetyków, kremów ochronnych, repelent stosuje się na końcu.

Idealny repelent odstraszący kleszcze powinien charakteryzować się niewielką toksycznością dla człowieka oraz skutecznym działaniem, powinien w pełni wspomagać ochronę i ograniczanie rozprzestrzeniania się chorób, których wektorami są te stawonogi.

BADANIA SKUTECZNOŚCI DZIAŁANIA REPELENTÓW

Repelenty poprzez swą dostępność i łatwość stosowania stanowią najpowszechniej używaną grupę środków chroniących przed kleszczami. Tym bardziej więc powinny być starannie dobierane. Badania repelentów powinny jednoznacznie odpowiadać na pytanie, czy kleszcze są odstraszone przez dany preparat.

Ze względu na warunki badania skuteczności aktualnie stosowane metody można podzielić następująco:

1. Metody stosowane w nieobecności żywicieli i ich bodźców
2. Metody wykorzystujące symulacje bodźców żywicieli
3. Metody, w których wykorzystywani są żywiele kleszczy

Metody z pierwszej grupy są w większości w wysokim stopniu powtarzalne i stosunkowo łatwe do standaryzacji. Są to też procedury stosunkowo tanie

ticks climb upward towards the treated surface. The repellent properties of the preparation are evaluated on the basis of comparing the number of ticks entering the treated and the untreated surface.

Both methods of repellent testing are used for screening the comparison of the activity of different active substances but they have less value as methods for testing the effectiveness of repellents.

The flagging method (12) consists in collecting ticks from their natural environment with a white flannel flag treated and untreated with the repellent in subject. Sheets of material are dragging over grass and low bushes on the measured surfaces for a set time. Then the ticks attached to it are counted. In this method it is difficult to clearly compare the number of ticks collected from the treated and untreated flags, since the ticks may be unevenly forming the so-called out-breaks, which can significantly affect the results.

In comparative studies conducted with DEET-impregnated flag by K. Ogawa et al. (2016) (13) and with the same repellent used by volunteers, they found that in the first case the repellent efficiency was 99.7%, in the second case it was lower and reached 84, 0%.

All methods used without the host and without the stimuli emitted by him may also lead to an overestimation of the repelling properties of the tested substance. In addition, in the flagging method the person covering the plants with the flag may be exposed to tick attacks.

The second group of methods include methods that use stimuli emitted by the host without their physical presence.

These include olfactometric methods of repellent testing, whereby ticks have the option of following the scent of the host or the mixed odor of the host and the repellent. The comparison of the number of ticks attracted by the host and repellent odor with solely the host's odor illustrates the effectiveness of the repellent.

Another variant of the olfactometer test is to place the ticks in the air stream with repellent and without repellent. Here it is also possible to compare the number of ticks that go towards the source of "clean air" or to the repellent-filled air.

During the "moving object assay", the ticks are exposed individually on a stick to a heated, rotating drum on which a piece of filter paper soaked with a repellent is placed. In this situation, the behavior of the tick is observed, which, placed on a stick simulating a blade of grass, can attach (or not) to the warm drum imitating the host. H. Dautel et al. (14) compared the results obtained with a "moving object assay" with the results obtained during ticks exposure on skin of volunteers. According to the authors, results from the "moving object assay" method did not differ significantly from those obtained with the human bait.

i nieskomplikowane technicznie. Należą tu np. metoda badania repelentów na papierze (bibule) w szalkach Petriego. W tej metodyce połowa powierzchni bibuły umieszczonej w szalce jest pokryta repelentem, druga połowa – nie. Podczas doświadczenia porównuje się liczbę kleszczy, które znajdują się na medium traktowanym i nietraktowanym repelentem. Kleszcze umieszczone są w środku szalki, na nietraktowanej kolistej powierzchni. Z niej kleszcze mają wybór: mogą wejść na powierzchnię potraktowaną środkiem odstrasżającym, bądź na powierzchnię niepotraktowaną tym środkiem.

Inną metodą z tej grupy jest wykorzystywanie przy badaniu repelentów ujemnego geotropizmu kleszczy i ich zdolności napadania na żywicieli: repelentem smaruje się końce pałeczek lub pasków materiału, które ustawia się pionowo tak, aby kleszcze wspinały się po nich w górę, w kierunku potraktowanej powierzchni. Właściwości odstrasżające preparatu oceniane są na podstawie porównania liczby kleszczy wchodzących na potraktowaną repelentem powierzchnię i powierzchnię niepotraktowaną.

Obie omówione metody badania repelentów wykorzystywane są do badań typu skryning, porównywania aktywności różnych substancji czynnych, natomiast mają mniejszą wartość jako metody badania skuteczności produktów odstrasżających.

Metoda flagowania (12) polega na odławianiu kleszczy ze środowiska naturalnego flagą z białej flaneli potraktowaną i niepotraktowaną badanym repelentem. Płatami materiału omiata się trawę i niskie zarośla na wymierzonych powierzchniach przez ustalony czas, a następnie zlicza się przyczepione do niej kleszcze. W tej metodzie trudno jest jednoznacznie porównać liczby kleszczy zbierane z flagi traktowanej i nietraktowanej, ponieważ kleszcze mogą występować nierównomiernie, tworząc tzw. ogniska, co znacząco może wpływać na wyniki.

K. Ogawa i wsp. (2016) (13) w badaniach porównawczych prowadzonych metodą impregnowanej DEET flagi oraz gdy tego samego repelentu używali ochotnicy stwierdzili, że w pierwszym przypadku skuteczność odstrasżania wynosiła 99,7%, w drugim – była niższa i osiągnęła 84,0%.

Wszystkie metody stosowane bez żywiciela oraz bez bodźców emitowanych przez niego mogą także prowadzić do zbyt pozytywnej oceny właściwości odstrasżających badanej substancji. Ponadto, w metodzie flagowania osoby omiatające flagą roślinność mogą być narażone na ataki kleszczy.

Druga grupa metod to metody wykorzystujące bodźce emitowane przez żywicieli bez ich fizycznej obecności.

Należą tu olfaktometryczne metody badania repelentów, w których kleszcze mają do wyboru podążanie w kierunku zapachu żywiciela lub mieszanego zapachu żywiciela oraz repelentu. Porównanie liczby

However, the methods in this group require the use of specialized equipment, ergo they are not widespread.

The third group of methods - using hosts' in experiments- is the most widespread despite many difficulties. The experiment should be conducted on an appropriate number of volunteers, which would ensure a proper analysis of the results; however, it is not easy to find a sufficient number of them (the obstacles may include financial resources and the time needed to do field work). Sometimes such experiments are performed on animals instead of on humans, but in this case it may be feared to ignore the species difference between hosting organisms. Both types of tests, performed either on animals or on humans, are at risk of contracting tick-borne diseases.

In laboratory tests, there are greater opportunities for the protection of human volunteers. One way is to use licensed, pathogen-free laboratory-grown ticks. Another way is to use such volunteer protection measures to ensure 100% certainty that the tick will not move uncontrollably on the skin or on the clothes of the volunteer. However, despite the fact that the ticks are strictly controlled under these conditions, allergic reactions of animals or humans to these arthropods cannot be excluded. Laboratory testing ensures that environmental conditions are controlled to a greater extent than in natural tick biotopes, and it allows the same standardized number of ticks to be used in successive repetitions.

Testing the repellents on volunteers can be done for example by the following methods:

- method of testing repellent on the finger and on the outer part of the hand,
- method of examining a repellent on the lower leg
- the arena method, in which the laboratory simulates the natural habitat of ticks.

The first two research methods involve the exposure of ticks on properly prepared surfaces of the human body (finger and hand or lower leg). A part of the skin surface is treated with a repellent, the boundary between the treated and untreated skin to which the ticks are released is marked appropriately. Ticks can also be placed on a copper plate attached to the skin. The plate is in this study an area untreated with a repellent and it covers the contoured surface around it. Ticks that enter the treated area are considered not to be repelled.

In the arena method, the surface simulating the tick environment is laid with grass or dry leaves. Repellent is applied on a band or on the skin above socks of a volunteer who stands on such prepared experimental field. Ticks entering the field treated with the chemical are considered not to be repelled.

kleszczy przyciąganych przez zapach żywiciela i repelentu w stosunku do zapachu samego żywiciela obrażuje skuteczność repelentu.

Innym wariantem badania za pomocą olfaktometru jest umieszczenie kleszczy w strumieniu powietrza z repelentem i bez repelentu. Tu również można porównywać liczbę kleszczy, które skierują się w stronę źródła „czystego powietrza” lub do powietrza z repelentem.

Podczas badania typu „moving object assay” (MO assay, test poruszającego się obiektu) kleszcze są ekspozowane pojedynczo na pałeczce w kierunku podgrzewanego, obracającego się bębna, na którym umieszcza się bibułę nasączoną repelentem. W tej sytuacji obserwuje się zachowanie kleszcza, który umieszczony na pałeczce symulującej źdźbło trawy, może przyczepić się (lub nie) do ciepłego bębna, imitującego żywiciela. *H. Dautel* i wsp. (14) porównywali rezultaty uzyskane w teście „moving object assay” z wynikami uzyskanymi podczas ekspozycji kleszczy na skórze ochotników. Wg autorów, wyniki uzyskane metodą „moving object assay” nie różniły się znacząco od uzyskanych z przynętą ludzką.

Metody z tej grupy wymagają jednak użycia specjalistycznego sprzętu, nie są więc szeroko rozpowszechnione.

Trzecia grupa metod – wykorzystujących w doświadczeniach żywicieli, mimo wielu trudności, jest najbardziej rozpowszechniona. Doświadczenie powinno być prowadzone na odpowiedniej liczbie ochotników, co zapewniłoby prawidłową analizę wyników; jednak nie jest łatwo znaleźć wystarczającą ich liczbę (barierą mogą tu być środki finansowe oraz czas potrzebny do wykonania doświadczenia w terenie). Niekiedy doświadczenia takie prowadzi się na zwierzętach zamiast na ludziach, jednak w takim przypadku może zachodzić obawa nieuwzględnienia różnicy gatunkowej pomiędzy organizmami gospodarzy. Oba rodzaje testów zarówno te wykonywane na zwierzętach, jak i na ludziach wykonywane w terenie obarczone są ryzykiem zachorowania na choroby przenoszone przez kleszcze.

W badaniach wykonywanych w warunkach laboratoryjnych są większe możliwości ochrony ludzi – ochotników. Jednym ze sposobów jest użycie kleszczy z certyfikowanej hodowli laboratoryjnej, wolnych od patogenów. Innym sposobem jest zastosowanie takich środków ochrony ochotnika, aby zapewnić 100% pewności, że kleszcz nie będzie poruszał się w niekontrolowany sposób po powierzchni skóry lub ubraniu ochotnika. Jednak mimo tego, że kleszcze będą ściśle kontrolowane w tych warunkach, niewykluczone są reakcje alergiczne zwierząt lub ludzi na te stawonogi.

Prowadzenie badań w warunkach laboratoryjnych zapewnia kontrolowanie warunków środowiskowych w większym stopniu, niż przy doświadczeniach wykonywanych w naturalnym biotopie występowania kleszczy oraz umożliwia stosowanie w kolejnych powtórzeniach takiej samej, wystandaryzowanej liczby kleszczy.

For several years the WHO standard test for determining the repelling capacity of mosquito repellents (15) is adopted for testing tick-repelling products.

In this method, the volunteer's forearm is treated with a repellent and the ticks are released onto the surface from the area around the wrist, where the boundary between the treated and the untreated surface is marked. Ticks which move on the skin treated with a repellent are counted and considered not repelled.

Ticks used for this method should be free from pathogens (i.e. come from laboratory-controlled growth).

FIELD AND LABORATORY METHODS

The ideal conditions for testing repellents would be if in an environment it is possible to compare the attractiveness of volunteers treated and not treated with a repellent. However, because of the risk of tick-borne diseases, such studies are not conducted. The described methods do not always produce comparable results, but generally, studies involving an adequately protected human as bait are most relevant to the practical use of repellents. Often, however, there is a need to study products of unknown toxicity to a human and then their activity should be evaluated in experimental systems that simulate human body conditions but without human involvement.

Attempts to compare the results of the tests with and without human participation were undertaken by several teams. For example, T. Kroeber et al. (16) compared the results obtained by the ticks exposure method on the lower leg treated with a repellent and on a surface of the same size heated glass plate also treated with the same repellent. The effective dose (ED75) quantity for 8 repellents out of 9 was several times higher after the tick exposure on the volunteer skin compared to the exposure on the heated glass plate.

CRITERIA FOR ASSESSING THE REPELLENT EFFICIENCY

Many methods, especially those used for screening tests, are based on the determination of the concentrations of the chemical agent or substances that are effective: e.g. ED (effective dose) 75, ED80; ED80 values; 90; 95 or ED100. However, methods of evaluating the duration of the repellents are of practical importance, as such information is sought by the user on the label of preparations available on the market. According to the criteria in the European Union guidelines (17) repellents against ticks should have an efficacy of $\geq 90\%$ in the determined time of action. Methodology recommended by the US Environmental Protection Agency (18), indicates the effectiveness criterion of

Badania repelentów na ochotnikach mogą być wykonywane np. następującymi metodami:

- metoda badania repelentu na palcu i zewnętrznej części ręki,
- metoda badania środka odstrasającego na podudziu
- metody arenowe, podczas których w laboratorium symuluje się naturalne środowisko występowania kleszczy.

Dwie pierwsze metody badawcze polegają na ekspozycji kleszczy na odpowiednio przygotowanych powierzchniach ciała ludzkiego (palcu i ręce lub podudziu). Część powierzchni skóry traktowana jest repelentem, odpowiednio oznaczona jest granica pomiędzy skórą traktowaną a nietraktowaną, na którą wypuszcza się kleszcze. Kleszcze też mogą być umieszczane na miedzianej płytce przymocowanej do skóry. Płytką jest w tym badaniu obszarem nietraktowanym repelentem, który nakłada się na obrysowaną powierzchnię wokół niej. Kleszcze, które wejdą na powierzchnię traktowaną, uważane są za nieodstraszone.

W metodzie arenowej powierzchnię symulującą środowisko występowania kleszczy wyklada się trawą lub suchymi liśćmi. Repelent jest aplikowany na opaskę lub ciało nad skarpetkami ochotnika, który stoi na tak przygotowanym polu doświadczalnym. Kleszcze wkraczające na traktowane repelentem pole uważane są za nieodstraszone.

Od kilku lat do badania produktów odstrasających kleszcze stosowana jest metoda badania repelentności adoptowana do kleszczy, której podstawą jest standardowy test WHO określania zdolności odstraszenia preparatów antykomarowych (15).

W metodzie tej przedramię ochotnika traktowane jest środkiem odstrasającym, a kleszcze wypuszczane są na tę powierzchnię z okolicy przy nadgarstku, gdzie zaznacza się narysowaną linią granicę na skórze pomiędzy powierzchnią traktowaną i nietraktowaną. W doświadczeniu zlicza się kleszcze, które przemieszczają się na skórę posmarowaną repelentem i traktuje się je jako nieodstraszone. Kleszcze do badań tą metodą powinny być wolne od patogenów (pochodzić z badanej hodowli laboratoryjnej).

METODY TERENOWE A LABORATORYJNE

Idealnym układem do badania repelentów byłaby sytuacja, gdyby w środowisku, gdzie bytują kleszcze można było porównać atrakcyjność dla nich ochotnika potraktowanego i niepotraktowanego repelentem. Ze względu jednak na zagrożenie chorobami odkleszczowymi, takie badania nie są prowadzone. Opisane metody nie zawsze dają porównywalne wyniki, ale ogólnie badania z wykorzystaniem odpowiednio zabezpieczonego człowieka jako przynęty najbardziej odpowiadają praktycznym warunkom stosowania repelentów. Często zachodzi

95%. However, in both cases the guidelines are based on laboratory tests. This is not ambiguous with the statement that so tested repellents will have the same effectiveness in the field. American studies have also reported that the use of repellents on the skin or clothing of people who have lived in ticks habitat can reduce borreliosis by 20% (19).

SUMMARY

Due to the complexity of the parasite (tick) - the host (vertebrate) system, the results of tests made by means of various methods are often difficult to compare. The results of repellence obtained by various laboratory methods can be overestimated; for this reason, studies on repellents are most valuable in conditions most similar to their actual application.

REFERENCES

1. Nowak- Chmura M, Przegląd historii badań nad kleszczami w Europie Środkowej, In: Fauna kleszczy (Ixodida) Europy Środkowej. Ed. A Oleśkiewicz, Kraków, Wydaw Nauk Uniw Pedagog , 2013: 8-12.
2. Cisak E, Wójcik – Fatla A, Zajac V, et al. Repellents and acaricides as personal protection measures in the prevention of tick-borne diseases. *Annals Agric Environ Med*, 2012; 19: 625-630.
3. Gliniewicz A, Karbowski G, Mikulak E et al. Impact of climate change on medically important ticks in Europe and their control. In: *Climate change impacts on urban pests*. Ed.: P Dhang , Boston, 2017, 111-126
4. Maetzel D, Maier WA, Kampen H. Borrelia burgdorferi infection prevalences in questing Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitol Res* 2005, 95: 5–12
5. Schulze TI, Jordan RA, Hung RW, et al. Efficacy of Granular Deltamethrin Against Ixodes scapularis and Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae) Nymphs. *J Med Entomol* 2001; 38(2): 344–346.
6. Ostfeld RS, Price A, Hornbostel VL, et al. Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *BioScience* 2006; 56:383-394.
7. Solberg VB, Neidhardt K, Sardeli MR, et al. Field evaluation of two formulations of cyfluthrin for control of Ixodes dammini and Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1992; 29: 634-638.
8. Brooke W, Bissinger R, Roe M. Tick repellents: Past, Present and Future, *Pest Bioch Physiol* 2010; 96: 63-79.

jednak potrzeba badania produktów o nieznannej toksyczności dla człowieka i wtedy ich aktywność powinna być oceniana w układach doświadczalnych symulujących warunki ciała człowieka, ale bez jego udziału.

Próby porównania wyników uzyskanych w wyniku testu z udziałem ludzi jako przynęty oraz bez ich udziału podejmowane były przez kilka zespołów. Przykładowo T. Kroeber i wsp. (16) porównali wyniki uzyskane metodą ekspozycji kleszczy na powierzchni podudzia potraktowanej repelentem oraz powierzchni o takiej samej wielkości podgrzewanej szklanej płyty, również potraktowanej tym samym środkiem odstraszającym. Wartości efektywnej dawki (ED75) dla 8 repelentów spośród 9 były kilkukrotnie wyższe po ekspozycji kleszczy na skórze ochotnika w porównaniu z ekspozycją na podgrzanej płycie szklanej.

KRYTERIA OCENY SKUTECZNOŚCI REPELENTÓW

Wiele metod, zwłaszcza tych stosowanych do badań skryningowych, bazuje na wyznaczaniu stężeń badanego środka lub substancji, które działają efektywnie: np. ED (dawka efektywna, *effective dose*) 75, ED80; ED80; 90; 95 lub ED100. Jednak praktyczne znaczenie mają przede wszystkim metody oceniające okres działania środków odstraszających, gdyż takiej informacji poszukuje użytkownik na etykietach preparatów dostępnych na rynku. Wg kryteriów zawartych w przewodnikach Unii Europejskiej (17) repelenty przeciwko kleszczom powinny wykazywać skuteczność $\geq 90\%$ w deklarowanym czasie działania. Metodą rekomendowaną z kolei przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (Environmental Protection Agency) (18), za kryterium skuteczności podaje 95% odstraszania. W obu przypadkach jednak przewodniki mówią o testach laboratoryjnych. Nie jest to więc jednoznaczne ze stwierdzeniem, że w terenie tak przetestowane repelenty będą miały taką samą skuteczność. W badaniach amerykańskich stwierdzono również, że stosowanie repelentów na skórę lub ubranie u osób, które przebywały na terenach bytowania kleszczy może ograniczyć zachorowania na boreliozę o 20% (19).

PODSUMOWANIE

Ze względu na złożoność systemu pasożyt (kleszcz) – żywiciel (kręgowiec) wyniki badań wykonanych różnymi metodami są często trudne do porównania. Rezultaty odstraszania uzyskiwane różnymi metodami laboratoryjnymi mogą być zawyżone; z tego względu największą wartość mają badania repelentów w warunkach jak najbliższych ich rzeczywistemu zastosowaniu.

9. Faulde M, Scharninghausen J, Tisch M. Preventive of perethrin - impregnated clothing to *Ixodes ricinus* ticks and associated *Borrelia burgdorferi s.l.* in Germany. *Int JoMed Microbiol*, 2008; 298, Supl 1: 231-324.
 10. Dusbábek F, Rupeš V, Šimek P, et al. Enhancement of permethrin efficiency in acaricide-attractant mixtures for control of the fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae) *Exper Appl Acarol*, 1997; 21: 293-305.
 11. Faulde MK, Uedelhoven WM, Malerius M, et al. Factory-based permethrin impregnation of uniforms: residual activity against *Aedes aegypti* and *Ixodes ricinus* in battle dress uniforms worn under field conditions, and cross-contamination during the laundering and storage process. *Military medicine* 2006; 171: 472-477.
 12. Garbouri SS, Jaenson TGT, Palsson K. Repellency of Mygga Natural Spray (para-menthane-3,8-diol) and RB86 (neem oil) against the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the field in east – central Sweden. *Exp Appl Acarol* 2006; 40 (3 – 4): 271 -7.
 13. Kohei Ogawa, Osamu Komagata, Toshihiko Hayashi, et al. Field and laboratory evaluations on the efficacy of DEET repellent against *Ixodes* ticks, *Jpn J Infect Dis* 2016; 69:131-134.
 14. Dautel H, Dippel C, Werkhausen A, et al. Efficacy testing of several *Ixodes ricinus* tick repellents: Different results with different assays, *Tick and Tick-borne diseases*, 2013; 4: 256-263.
 15. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin, 2009: WHO/HTM/NTD/WHOPEP/2009.4
 16. Kroeber T, Bourquin M, Guerin PM. A standardised in vivo and in vitro Test method for evaluating tick repellents, *Pest Biochem Physiol*, 2013; 107: 160 – 168.
 17. Product type 18 – insecticides, Acaricides and Products to control other arthropods and Product type 19 – repellents and attractants (only concerning arthropods) , In: *Guidance on the Biocidal Products Regulation*. 2017, Version 1.0, 2: 182-238
 18. www.epa.org
 19. Vazquez M, Muehlenbein C, Carter M et al. Effectiveness of personal protective measures to prevent Lyme disease, *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 210-216
- Received: 14.06.2017
 Accepted for publication: 18.08.2017
 Otrzymano: 14.06.2017r.
 Zaakceptowano do publikacji: 18.08.2017 r.
- Adres do korespondencji:**
Address for corespondence:
 Dr Aleksandra Gliniewicz
 Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
 Samodzielna Pracownia Entomologii Medycznej i Zwalczania Szkodników
 ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa
agliniewicz@pzh.gov.pl