

COMUNICAZIONI

Sessione I

PROGRAMMA DI LOTTA ANTIMALARICA A OUAGADOUGOU (BURKINA FASO) - LIVELLI DI TRASMISSIONE DELLA MALARIA: DATI ENTOMOLOGICI

P. Rossi, L. Mancini, A. Belli e G. Sabatinelli

Ministero Affari Esteri, Dipartimento per la Cooperazione allo sviluppo -
Istituto di Parassitologia dell'Università degli studi di Roma "La Sapienza"

Riassunto - Vengono riportati i risultati delle attività di monitoraggio entomologico condotte nell'ambito della prima fase del Programma di Lotta alla Malaria nella città di Ouagadougou (Burkina Faso).

Summary - (Malaria Control programme in Ouagadougou (Burkina Faso) - Levels of malaria transmission: entomological data.) - Results from the entomological survey carried out in the first phase of the Malaria Control Programme in the city of Ouagadougou are reported.

Introduzione

Nell'ambito della prima fase del programma di lotta alla malaria nella città di Ouagadougou è stata eseguita una cartografia dei focolai larvali di Anopheles gambiae s.l. su tutto il territorio urbano ed è stata condotta un'inchiesta entomologica longitudinale con l'obbiettivo di determinare i livelli di trasmissione della malaria in zona urbana e di compararli a quelli delle zone rurali limitrofe. Tale studio è stato completato da un'indagine parassitologica i cui risultati vengono riportati da Sabatinelli et al. (1).

Ouagadougou, capitale del Burkina Faso (ex Alto Volta), è situata in una zona di savana sudaniana nel cuore dell'Africa Occidentale, ed è caratterizzata da un regime di precipitazioni annuo di circa 860 mm (media 1961 - 1970), distribuito in 70 giorni di piogge, da metà giugno a metà settembre. Nel 1984 la stagione delle piogge è stata piuttosto anomala, essendo iniziata in marzo e terminata in novembre, con un totale di soli 550 mm. La città, che si estende su un diametro di circa 12 km, è costituita per meno del 40% da quartieri lottizzati, dotati di infrastrutture viarie, idriche, fognarie ed elettriche, e per il restante 60% da quartieri non lottizzati, sorti spontaneamente negli ultimi anni a seguito di una forte immigrazione di masse rurali. Nella zona settentrionale della città è presente un grande bacino idrico, di cui solo un terzo è bonificato. Dati demografici ed etnici sono riportati da Sabatinelli et al. (1).

Materiali e metodi

Il monitoraggio delle alate è stato eseguito da marzo a novembre attraverso catture diurne al piretro (CPP), secondo gli standard O.M.S. (2), con frequenza mensile in stagione secca e quindicinale in stagione delle piogge in città. Sono stati scelti 5 quartieri della città rappresentativi di situazioni ecologiche differenti (Saint Camille, Nongremassm, Kologh Naba, Gounghin Nord e Saint Leon) e 3 villaggi situati nei dintorni di Ouagadougou (Pabre, Zaghtouli e Koubri). In ognuna di queste zone sono state stabilite 5 stazioni di cattura fisse, in case

abitate corrispondenti alla tipologia locale più comune. A causa di difficoltà logistiche le catture hanno avuto inizio in marzo nei quartieri e solo in luglio nei villaggi. Le femmine di Anopheles dopo identificazione, sono state contate e dissezionate per la ricerca degli sporozioti. Il coprifuoco tuttora in vigore non ci ha permesso di effettuare le catture notturne su uomo. Il Tasso d'Inoculazione Entomologica (T.I.E.) è stato quindi calcolato come numero di femmine Fed/abitante moltiplicato per l'indice sporoziotico.

Risultati

Il censimento dei focolai larvali di A. gambiae s.l., condotto durante tutto l'anno, ci ha permesso di tracciare la cartografia di questi ultimi e di precisarne la natura, l'estensione e la durata. Sono stati recensiti su tutta la superficie urbana oltre 200 focolai temporanei, cioè presenti solo durante la stagione delle piogge. In particolare sono state individuate ampie zone di acque stagnanti, comprendenti numerosissime piccole raccolte d'acqua, come ad esempio il canale S. Camille. I bacini idrici non bonificati presenti nella parte settentrionale della città sono risultati importanti aree di focolai larvali semi-permanenti. Le cave di argilla utilizzate per la costruzione di mattoni, sparse su tutta la fascia periferica urbana, costituiscono altresì un ambiente estremamente favorevole allo sviluppo delle larve di A. gambiae s.l., soprattutto in stagione secca.

A. gambiae s.l. è risultato il solo vettore di malaria in zona urbana, mentre in zona rurale anche A. funestus è risultato positivo alla ricerca degli sporozioti. In totale, attraverso le CPP sono state catturate 6.678 femmine di A. gambiae s.l., delle quali 4.272 dissezionate per la ricerca degli sporozioti. L'analisi degli indici entomologici elaborati sulla base dei dati raccolti da marzo a novembre 1984 mostra una notevole eterogeneità nei livelli di trasmissione della malaria fra i quartieri della città. Per quello che riguarda la densità (espressa come numero medio di femmine di A. gambiae s.l./camera) i valori minimi sono stati rilevati nei quartieri lottizzati di Gounghin Nord e Saint Leon (media del periodo considerato, rispettivamente 1.1 e 0.9). I valori più elevati (15.3) sono stati registrati nei due quartieri di Kologh Naba e Nongremassm, posti ai margini dei bacini idrici. E' da notare che in questi due quartieri le densità sono risultate elevate già a partire dai mesi di aprile e maggio (17.2 in aprile a Kologh Naba e 9.6 in maggio a Nongremassm), ed hanno raggiunto i massimi valori stagionali rispettivamente in giugno con 38.2 ed in luglio con 52.0 femmine/camera. Nel quartiere di S. Camille sono stati registrati valori intermedi (7.8), con un rapido aumento da maggio a giugno (da 1.6 a 14.4). I valori medi di densità riscontrati nei villaggi sono comparabili a quelli di alcuni dei quartieri campione (44.4 a Pabre e 20.5 a Zaghtouli), ad eccezione di Kouabri dove la densità media raggiunge 114.0 (massimo registrato 269.7 in agosto).

Per quanto riguarda gli indici sporoziotici le prime positività sono state osservate in maggio nel quartiere di Kologh Naba (1.5%). L'andamento si è poi mostrato discontinuo durante la stagione delle piogge, con valori oscillanti attorno all'1%. Sono stati registrati due picchi, uno nel mese di agosto (4.2% a S. Camille) ed uno in ottobre, quest'ultimo corrispondente ai valori massimi registrati nella stagione (3.6% a S. Camille, 5.6% a Nongremassm e 11.5% a Kologh Naba). Nessuna positività è stata riscontrata nei quartieri di Gounghin Nord e S. Leon durante tutto il periodo preso in esame.

Il Tasso d'Inoculazione Entomologica Cumulativo, ossia il numero di punture infettanti ricevute da ogni abitante durante il periodo in esame (marzo - novembre), è zero per i due quartieri centrali, mentre risulta di 5 punture infettanti per abitante a Nongremassm ed a S. Camille e di 15 a Kologh Naba. Nei villaggi tale indice, calcolato a partire da luglio, è risultato di 418 a Kouabri (pari a più di 3 punture infettanti/uomo/notte), 91 a Pabre e 74 a Zaghtouli.

Discussione

L'analisi dei dati raccolti mostra che A. gambiae s.l. è il solo vettore della malaria in città. I livelli globali di trasmissione risultano in zona urbana inferiori rispetto alle zone rurali limitrofe. Cio' sembra dovuto soprattutto ai più alti indici sporozoitici osservati nei villaggi. I valori estremamente elevati di densità/camera di femmine di A. gambiae s.l. rilevati nel villaggio di Koumbri determinano il T.I.E.C. eccezionalmente alto che vi è stato calcolato.

All'interno della città la situazione riguardante i livelli di trasmissione della malaria è estremamente eterogenea. Si possono infatti distinguere quartieri nei quali essa sembra assente (Gounghin Nord e S. Leon) e quartieri nei quali la trasmissione della malaria presenta livelli piuttosto elevati. Nei quartieri più colpiti notiamo ulteriori differenze riguardanti la durata della trasmissione che raggiunge almeno sei mesi a Kologh Naba e Nongremassm, mentre è di circa tre mesi a S. Camille. Queste eterogeneità epidemiologiche sono da mettere in relazione alla presenza nelle zone oggetto d'indagine di differenti tipi di focolai larvali di A. gambiae s.l.: focolai temporanei e di piccole dimensioni nei quartieri centrali e lottizzati, aree estese di focolai larvali semipermanenti adiacenti i quartieri situati ai margini dei bacini idrici, ed estese zone di focolai temporanei nei quartieri non lottizzati come S. Camille. In città, dunque, la malaria sembra avere una distribuzione di tipo "focale", caratterizzata da livelli di trasmissione diversi osservati in zone relativamente vicine una all'altra (es. Gounghin Nord e Kologh Naba), che indica una scarsa mobilità del vettore in zona urbana. Questo aspetto della biologia di A. gambiae s.l. è stato oggetto di uno studio specifico, i cui risultati vengono presentati da Sabatinelli et al. (4). La conferma, infine, delle eterogeneità dei livelli di trasmissione della malaria evidenziate dalla presente inchiesta entomologica, è stata fornita da un'inchiesta protozoologica condotta in agosto - settembre nelle stesse zone prese da noi in esame (1).

BIBLIOGRAFIA

1. SABATINELLI, G., BOSMAN, A., LAMIZANA, L., ROSSI, P. 1985. Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso). Livelli di trasmissione della malaria: dati protozoologici. Annali Ist. Sup. San. stesso vol.
2. MOLINEAUX, L. e GRAMICCIA, G. 1980. Le projet Garki. Organisation mondiale de la Santé, Genève.
3. JEPSON, W.F., MDUTTA, A. & COURTOIS, C. 1947. The malaria problem in Mauritius: the bionomics of Mauritius anophelines. Bull. ent. Res. 38: 177.
4. SABATINELLI, G., ROSSI, P., BELLI, A. 1985. Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso). Dispersione di Anopheles gambiae s.l. in zona urbana. Annali Ist. Sup. San. stesso vol.

PROGRAMMA DI LOTTA ANTIMALARICA A OUAGADOUGOU (BURKINA FASO) - LIVELLI DI TRASMISSIONE DELLA MALARIA: DATI PROTOZOLOGICI

G. Sabatinelli (a), A. Bosman (a), L. Lamizana (b) & P. Rossi (a)

- (a) Ministero Affari Esteri, Dipartimento per la Cooperazione allo Sviluppo - Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma "La Sapienza"
(b) Ministère de la Santé Publique du Burkina Faso, Ouagadougou

Riassunto. - Vengono presentati i risultati di una indagine malariologica condotta su gruppi di bambini tra 0 e 5 anni, nella città di Ouagadougou e zone rurali limitrofe, durante la stagione delle piogge 1984.

Summary (Malaria control programme in Ouagadougou (Burkina Faso) - Levels of malaria transmission: protozoological data). - Results of a malariological survey carried out on a group of children 0-5 years old in the city of Ouagadougou and neighbouring rural zones during the 1984 rainy season are reported.

Introduzione

L'inchiesta protozoologica, oggetto della presente nota, è stata condotta assieme ad uno studio entomologico longitudinale (1) al fine di raccogliere dati di base per un programma di lotta antimalarica nella città di Ouagadougou. Scopo del lavoro è stato quello di determinare la prevalenza dell'infezione in differenti zone della città durante il periodo di massima trasmissione, di confrontare la situazione malariologica tra zona urbana e zona rurale limitrofa e verificare le correlazioni tra gli indici protozoologici e gli indici entomologici osservati nelle stesse zone.

La città di Ouagadougou, capitale del Burkina Faso (ex Alto-Volta), conta una popolazione di circa 407.000 abitanti dei quali solo il 33 % vive in aree lottizzate, dotate di infrastrutture. Il tasso bruto di mortalità (stima 1976) è del 22 ‰, quello di natalità del 46 ‰ ed il 50 % della popolazione ha meno di 20 anni. Il tasso di accrescimento a Ouagadougou è del 10 % annuo anche a causa della forte immigrazione urbana. Nel dipartimento di Ouagadougou l'etnia prevalente è quella Mossi (40 %). Considerando tutta la popolazione del Burkina Faso le percentuali delle emoglobinopatie AS ed AC sono rispettivamente 11.26 % e 18.74 % (2). Dati sulla climatologia e geografia della zona di studio sono forniti da Rossi et al.(1).

Materiali e Metodi

L'inchiesta protozoologica è stata effettuata dal 27 agosto al 13 settembre 1984, su 2.117 soggetti di età compresa tra 0 e 5 anni residenti negli stessi quartieri (Kologh Naba, Nongremassm, St.Camille, Gounghin Nord e St.Leon) e villaggi (Zaghtouli, Pabrè e Kouabri) oggetto dello studio entomologico longitudinale (1). È stato inoltre preso in considerazione il quartiere Tanghin.

Durante l'inchiesta sono stati utilizzati questionari per raccogliere, per ciascun bambino, dati, oltre che sull'identità personale, sulla mobilità, eventuale chemioprolifassi e chemioterapia eseguita, utilizzazione di zanzariere ed insetticidi, durante i due mesi di luglio ed agosto che hanno preceduto l'inchiesta. Per ogni soggetto è stata effettuata goccia spessa e striscio secondo gli standards O.M.S. e l'esame parassitologico è stato effettuato su 100 campi di goccia spessa a 1000 X. L'indice di densità parassitaria (IDP) e l'indice di densità parassitaria positiva (IDPP) sono stati calcolati secondo la metodologia adottata nel progetto Garki (3). Il gruppo di età 0-5, ritenuto particolarmente utile ai fini della presente inchiesta per la sua bassa mobilità, è stato ulteriormente analizzato in base ai sottogruppi 0-11 mesi, 12-23 mesi e 2-5 anni.

Risultati

Su 2.117 soggetti esaminati l'indice plasmodico totale (IP tot.) è risultato del 29.4 %. L'IP per le differenti specie ha dato i seguenti valori: Plasmodium falciparum 29 %, P.malariae 1.37 %, P.ovale 0.5 %. L'indice gametocitico (IG) risulta del 7.5 % e P.falciparum è presente nel 98.6 % delle infezioni. L'IP aumenta progressivamente con l'età mentre per l'IG si osserva un aumento significativo tra le classi di età 0-11 e 12-23 mesi. L'esame globale dei bambini tra 0 e 5 anni nei 6 quartieri campione di Ouagadougou dà un IP tot. pari al 16 % mentre in zona rurale, come media dei tre villaggi, l'IP tot. raggiunge il 62%. Tale differenza è altamente significativa con una probabilità inferiore all'uno per mille. Tra i tre villaggi sono state riscontrate notevoli differenze nella prevalenza della malaria. I valori più alti dell'IP sono stati osservati nei villaggi di Koubri (87.9 %) e di Pabrè (74.6 %). E' da notare che nel villaggio di Zaghtouli, ove è stato rilevato un IP più basso (50.9 %), viene praticata una estesa copertura chemioprolifattica che raggiunge l'81.5 %. Anche in città sono state rilevate notevoli differenze di prevalenza tra i diversi quartieri campione. I valori più elevati dell'IP tot. sono stati osservati nei quartieri di Nongremassm (26.4 %), Tanghin (21.8 %), Kologh Naba (20.3 %) e St. Camille (15.6 %). I valori dell'IP tot. sono significativamente più bassi a Gounghin Nord (9.5 %) ed a St.Leon (3 %). Differenze significative negli indici protozoologici sono emerse anche su distanze assai brevi tra 3 gruppi di bambini abitanti nel quartiere di Kologh Naba in tre zone contigue poste a distanze crescenti (100-350 m, 400-600 m, 800-1050 m) dal margine di un bacino idrico ove sono localizzati i focolai larvali di Anopheles gambiae s.l. Questi dati mostrano che l'IP tot. e l>IDP diminuiscono in maniera significativa in funzione dell'allontanamento dai focolai larvali, mentre l>IDPP varia in maniera inversa. Si è anche proceduto ad una analisi della correlazione tra gli indici plasmodici e gli indici entomologici relativi alla prima metà del mese di agosto (1). La correlazione tra l'IP tot. ed il tasso di inoculazione entomologico (TIE) è significativa ($P < .05$) sia che si consideri il campione globale 0-5 anni, sia trattando separatamente le diverse classi di età. Questa correlazione è molto più alta nella classe di età 0-11 mesi ($P < .01$) e decresce progressivamente nelle classi 12-23 mesi e 2-5 anni ($P < .05$). L>IDP di P.falciparum è risultato correlato significativamente con le densità per camera di femmine di Anopheles gambiae s.l. ($P < .05$) ed ancor più con l'indice sporozoitico ($P < .01$).

Discussione

L'analisi dei risultati mette in evidenza notevoli differenze della prevalenza della malaria nelle zone studiate. La più alta prevalenza nella zona rurale rispetto alla città, sembra essere dovuta essenzialmente agli alti tassi di

inoculazione entomologica (1).

L'influenza della chemioprolifassi è evidente nel villaggio di Zaghtouli che, pur avendo un TIE superiore a quello di Pabrè, con una copertura chemioprolifattica che raggiunge l'81.5 %, presenta un IG ed un IP nettamente inferiore ($P \ll .001$). Tra i 6 quartieri campione della città di Ouagadougou si sono messe in evidenza zone a bassa ed alta prevalenza della malaria. Queste differenze sono in stretta relazione con i differenti tassi di inoculazione entomologica rilevati negli stessi quartieri, livelli influenzati in maniera determinante dal numero, estensione e persistenza dei focolai larvali di A.gambiae s.l.(1). Infatti i più alti indici protozoologici (15.6-26.4 %) sono stati rilevati nei quartieri Kologh Naba, Tanghin, Nongremasém e St.Camille nei quali lo studio entomologico (1) ha messo in evidenza alti tassi di inoculazione entomologica (5-15 punture infettanti/uomo per il periodo marzo-novembre). Invece nei quartieri lottizzati del centro città, St.Leon e Gounghin Nord, ove non sono state riscontrate positività per sporozoitii, sono stati rilevati gli indici plasmodici più bassi (3-9.5 %). L'analisi dei 3 sottocampioni di Kologh Naba, mette in evidenza il carattere focale della trasmissione malarica a Ouagadougou, probabilmente dovuto alla scarsa dispersione di A.gambiae s.l. osservata nello stesso quartiere (4). Le variazioni degli indici parassitologici tra le 3 zone nel quartiere sembrano infatti dovute all'allontanamento dai focolai larvali e quindi ai differenti gradi di esposizione cui sono sottoposti i gruppi di bambini esaminati. Differenze su distanze molto brevi sembrano peraltro una caratteristica dell'area urbana in quanto analisi statistiche compiute in sottocampioni dei villaggi non hanno mostrato differenze significative.

La stretta relazione tra gli indici entomologici di trasmissione e la prevalenza della malaria negli stessi quartieri e villaggi, è stata messa in evidenza da un coefficiente di correlazione significativo soprattutto nella classe di età 0-11 mesi e ciò conferma l'importanza dello studio della prevalenza della malaria in questa classe di età per valutare il rischio di infezione plasmodiale in una determinata zona.

La situazione epidemiologica osservata non è risultata essere stata influenzata in maniera significativa dalla mobilità di una frazione della popolazione esaminata.

BIBLIOGRAFIA

1. ROSSI, P., MANCINI, L., BELLI, A. & SABATINELLI, G. 1985. Programma di lotta antimalarica nella città di Ouagadougou (Burkina Faso) - Livelli di trasmissione della malaria: dati entomologici. Annali Ist. Sup. San. stesso vol.
2. BROUSSAL, G., NACOLMA, O. & SAWADOGO, A. 1982. Hemoglobinoses et Drepanocytose en Haute-Volta. Presses Africaines, Ouagadougou.
3. MOLINEAUX, L. & GRAMICCIA, G. 1980. Le projet Garki. Organisation mondiale de la Santé, Genève.
4. SABATINELLI, G., ROSSI, P. & BELLI, A. 1985. Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso) - Dispersione di Anopheles gambiae s.l. in zona urbana. Annali Ist. Sup. San. stesso vol.

PROGRAMMA DI LOTTA ANTIMALARICA A OUAGADOUGOU (BURKINA FASO):
IL COMPLESSO ANOPHELES GAMBIAE NELLA CITTA' DI OUAGADOUGOU E VILLAGGI LIMITROFI

V.Petrarca, G.Petrangeli, P.Rossi e G.Sabatinelli

Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza" e Ministero degli Affari Esteri: Dipartimento Cooperazione allo Sviluppo

Riassunto. - Vengono descritte la distribuzione e i polimorfismi da inversioni di An.arabiensis e Anopheles gambiae s.s. nella città di Ouagadougou (Burkina Faso) e in quattro villaggi limitrofi.

Summary. - The distribution and inversion polymorphisms of Anopheles arabiensis and An.gambiae s.s. are described in samples from Ouagadougou (Burkina Faso) and from four villages in the neighbourhood of the town.

Introduzione

Nell'ambito del programma di lotta contro la malaria nella città di Ouagadougou (Burkina Faso-ex Alto Volta) sono state effettuate catture di alate di Anopheles gambiae s.l. in diversi quartieri della città e in quattro villaggi distanti non più di 35 km dalla città stessa. Parte di questo materiale (femmine semigravide) è stato utilizzato per osservazioni citotassonomiche oggetto della presente nota.

Come è noto l'esame dei cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche di femmine semigravide permette l'identificazione precisa delle specie criptiche del complesso gambiae attraverso l'osservazione di inversioni paracentriche specie-specifiche fissate allo stato omozigote sui cromosomi sessuali. Gli stessi preparati consentono l'osservazione di polimorfismi cromosomici particolarmente comuni in queste specie (1).

Materiale e Metodi

L'attività di campionamento è stata condotta prevalentemente durante la stagione delle piogge 1984. Le catture sono state effettuate all'interno delle abitazioni mediante spruzzamento di piretro nelle prime ore del pomeriggio. Le zanzare sono state fissate in loco in Carnoy etanolo-acetico e spedite a Roma dove sono state esaminate citologicamente. In alcune stazioni di cattura (i quartieri di Kologh Naba, Tanghin, St.Camille, St.Léon e i villaggi di Nioko II e Pabré) è stata effettuata una sola cattura nel mese di agosto mentre nelle altre (quartiere Nongremassm e villaggi Zagtouli e Koubri) sono state possibili catture con un ritmo mensile, fornendo così dati sufficienti per un preliminare studio longitudinale.

Lavoro eseguito nell'ambito del contratto C.E.E. TSD.016.I(TT).

Risultati e Discussione

Nelle località in esame sono state identificate due delle sei specie del complesso: An.arabiensis e An.gambiae s.s.. Nei campioni del mese di agosto, centro della stagione delle piogge, la frequenza percentuale di gambiae s.s. è oscillata in maniera non significativa intorno al 50% nei villaggi di Nioko II e Zagtouli, mentre è risultata significativamente maggiore nei villaggi di Pabré (68%) e in particolar modo di Kouabri (88%). Esaminando in dettaglio i cinque quartieri di Ouagadougou (che considerati in toto hanno mostrato una pari frequenza delle due specie), si è potuta osservare una notevole variabilità delle frequenze relative delle due specie: nel quartiere nord-occidentale di Kologh Naba la frequenza di gambiae s.s. era del 77% mentre a Tanghin, quartiere situato poco distante da Kologh Naba ma al di là del "barrage" e caratterizzato dalla presenza di piccole mandrie di bovini, la frequenza di gambiae s.s. scende al 57%. Anche gli altri tre quartieri hanno mostrato forti oscillazioni delle frequenze relative delle due specie: 27% di gambiae s.s. a St.Camille, 43% a Nongremassm e infine 63% a St.Léon-Samandin. Le differenze fortemente significative nelle frequenze relative delle due specie osservate tra villaggi e tra quartieri della città in campioni temporalmente omogenei non sono facilmente correlabili con ovvie differenze ambientali; va comunque detto che oscillazioni apparentemente stocastiche nelle prevalenze relative di arabiensis e gambiae s.s. sono state osservate anche in progetti di ricerca in altre zone dell'Africa occidentale (2), spesso in ambiti di tempo e di spazio anche minori di quelli da noi esaminati.

Come si è accennato, per alcune stazioni di cattura è stato possibile effettuare raccolte mensili con i seguenti risultati: nel villaggio di Zagtouli (a circa 10 km da Ouagadougou) la frequenza relativa delle due specie non si discosta in cinque catture (da giugno a ottobre) significativamente dal 50%; nel villaggio di Kouabri (a circa 35 km da Ouagadougou) si nota invece un modello di distribuzione alquanto differente, infatti la frequenza di An.arabiensis è significativamente più elevata (in media circa il 30%) nei due campioni catturati rispettivamente all'inizio (luglio) e alla fine (ottobre) della stagione delle piogge, mentre nei mesi centrali della stagione umida essa è notevolmente inferiore (in media circa il 10%). Nella cerchia della città, il quartiere settentrionale di Nongremassm ha invece mostrato una prevalenza relativa delle due specie molto vicina alla parità per tutto il periodo di campionamento (aprile-ottobre), con deviazioni generalmente non significative.

An.arabiensis è risultato polimorfico per tre sistemi di inversione: 2Ra (con frequenze medie dell'ordinamento a generalmente inferiori al 30%), 2Rb (con frequenze dell'ordinamento bc oscillanti intorno al 25%) e infine 3Ra (con frequenze dell'ordinamento a ampiamente oscillanti intorno al 50%).

Nelle località in esame An.gambiae s.s. mostra un interessante fenomeno già riscontrato nelle regioni centro-settentrionali del confinante Mali: la coesistenza all'interno della specie di diverse popolazioni quasi completamente isolate riproduttivamente, ciascuna delle quali caratterizzata da differenti polimorfismi per inversioni (3). In particolare in Ouagadougou e dintorni è stato possibile mettere in evidenza due di queste popolazioni o forme cromosomiche: Mopti e Savanna. La prima è caratterizzata dagli ordinamenti 2Rbc e 2Ru e la seconda dall'ordinamento 2Rb; sono inoltre presenti cariotipi denominati provvisoriamente "ibridi" in quanto non attribuibili ad alcuna delle

predette forme essendo il probabile risultato di incroci tra di esse o di incroci di una delle due forme con individui ibridi portatori di ricombinazioni tra gli ordinamenti caratteristici di ciascuna forma. La distribuzione di tali forme cromosomiche nella città di Ouagadougou e nei villaggi di Pabr , Nioko II e Koubri   essenzialmente simile: oltre l'85% (747/848) di gambiae s.s.   costituito dalla forma Mopti, circa il 10%   classificabile come forma Savanna mentre la parte rimanente   costituita da "ibridi". Unica eccezione a questo modello generale   il villaggio di Zagtouli, nel quale il campione di femmine di gambiae s.s.   costituito per il 75% (111/147) dalla forma Mopti, mentre circa il 20%   attribuibile alla forma Savanna. Va notato che Zagtouli   l'unica tra le stazioni di cattura prese in esame priva di risaie nelle immediate vicinanze; questo ben si accorda con la relazione gi  mostrata in Mali tra prevalenza della forma Mopti e presenza di risaie o comunque raccolte di acqua permanente. La distribuzione delle due forme di gambiae s.s. nei quartieri di Ouagadougou presenta qualche punto di rimarchevole interesse: si   infatti notata una notevole prevalenza della forma Mopti nei quartieri di Kologh Naba, Tanghin e Nongremassm, i pi  vicini alla zona dei "barrages" e quindi i pi  dipendenti dai focolai di acqua permanente ai quali sembra particolarmente legata la forma Mopti, mentre nel quartiere di St.Léon, situato al centro della citt  e distante circa 3 km, la forma cromosomica Savanna prevale nettamente (circa 68%) sulla forma Mopti (circa 30%). Una possibile spiegazione di questa differenza, fortemente significativa, potrebbe risiedere proprio nella distanza di St.Léon dai "barrages" e quindi dai focolai larvali con acqua permanente e dalla dipendenza del quartiere stesso da focolai larvali di tipo temporaneo, tipicamente formati dalle piogge. A questo tipo di situazione sembrerebbe particolarmente legata la forma Savanna (3). Va inoltre considerato che, come illustrato altrove in questo volume (4), la dispersione di gambiae s.l. in questa situazione urbana,   estremamente ridotta, per cui le femmine appartenenti alla forma Mopti, prodotte essenzialmente dai focolai larvali permanenti circostanti le zone dei "barrages", graviterebbero in maggior parte nelle vicinanze, mentre al centro della citt , dove la disponibilit  di focolai   quasi esclusivamente dipendente dalle piogge, prevale la forma Savanna che, come si   detto, appare pi  legata a queste condizioni.

BIBLIOGRAFIA

1. COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V., DI DECO M.A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environment in the Anopheles gambiae complex. Trans.Roy.Soc.trop.Med.Hyg.; 73: 83-497.
2. COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. 1975. Chromosomal investigations on species A and B of the Anopheles gambiae complex in the Garki District (Kano State, Nigeria). Results of species identifications from 1971 to 1974. World Health Organization, WHO, MPD/TN, 75.1: 16-25.
3. TOURE Y.T., PETRARCA V., COLUZZI M. (1983). Nuove entit  del complesso Anopheles gambiae in Mali. Parassitologia, 25: 367-370.
4. SABATINELLI G., ROSSI P. & BELLI A. 1985. Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso) - Dispersione di Anopheles gambiae s.l. in zona urbana. Atti del XIII Congresso della Societ  Italiana di Parassitologia, Roma, 3-5 dicembre 1984, questo stesso volume.

PROGRAMMA DI LOTTA ANTIMALARICA A OUAGADOUGOU (BURKINA FASO) - DISPERSIONE DI
ANOPHELES GAMBIAE S.L. IN ZONA URBANA

G. Sabatinelli, P. Rossi e A. Belli

Ministero Affari Esteri, Dipartimento per la Cooperazione allo Sviluppo -
Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma "La Sapienza"

Riassunto - Vengono esposti i risultati preliminari di uno studio sulla dispersione del vettore Anopheles gambiae s.l. in zona urbana.

Summary (Malaria control programme in Ouagadougou (Burkina Faso) - Dispersion of Anopheles gambiae s.l. in urban area). - Preliminary results of a study on the dispersion of A.gambiae s.l. vector are reported with some consideration on their epidemiological importance.

Introduzione

La dispersione di Anopheles gambiae è uno degli aspetti più importanti dell'epidemiologia della malaria nelle zone urbane dell'Africa tropicale. Fino ad oggi gli studi a questo proposito si riferivano essenzialmente alla dispersione di questo vettore nelle zone rurali delle savane e hanno evidenziato delle distanze medie di 3 Km, che possono raggiungere un massimo di 6.8 Km con vento favorevole (1)(2)(3). Uno studio (4) ha tuttavia dimostrato una dispersione assai minore (1-1½ Km) di A.gambiae s.l. in zona urbana.

Le indagini entomologiche (5) e protozoologiche (6) condotte per definire un programma di lotta contro la malaria a Ouagadougou, hanno evidenziato ampie variazioni nei tassi di inoculazione entomologica e negli indici plasmodici anche in quartieri assai vicini. Una tale focalità di trasmissione sembrerebbe essenzialmente dovuta ad una assai debole mobilità del vettore A.gambiae s.l. in zona urbana.

Al fine di contribuire ad una migliore conoscenza di questi fenomeni è stato condotto uno studio specifico sulla dispersione di A.gambiae s.l. in zona urbana scegliendo come area di indagine un quartiere della città di Ouagadougou.

Materiali e Metodi

Quale zona di studio è stato scelto il quartiere di Kologh Naba; quartiere lottizzato, presenta dei focolai larvali di Anopheles gambiae s.l. relativamente localizzati anche in stagione delle piogge. Il quartiere, di circa 500 m², è attraversato da strade perpendicolari in terra battuta che delimitano dei lotti di 100 metri di lato comprendenti 16 concessioni nelle quali è edificato un numero variabile di case in argilla ed argilla-cemento. I focolai larvali, costituiti da pozze di acqua stagnante, torbida, insolleggiata e senza vegetazione, sono situati quasi esclusivamente sul bordo del barrage n° 2 che delimita la parte Nord del quartiere. L'insufficiente riempimento del bacino idrico, a causa delle scarse precipitazioni, l'assenza di manutenzione dei margini e la natura

del suolo, sono all'origine della formazione dei focolai larvali. Nel quartiere sono stati stabiliti 81 punti di cattura, 3 per lotto, costituiti da una casa in "banco" di dimensioni standard (2.5 x 3 x 3 m) con un tetto in lamiera ondulata, una sola porta e finestra. Alcuni lotti sono stati esclusi da questo studio in quanto mancavano di case con caratteristiche standard. In totale sono stati dunque presi in considerazione 27 lotti disposti su 7 file parallele situate a distanze crescenti dal margine del "barrage" (tra 100 e 1050 m). Tra i 600 ed i 900 metri dai focolai larvali è presente una zona priva di abitazioni e pertanto esclusa dallo studio. Nelle abitazioni scelte dormivano una media di 3 persone per notte. Le catture sono state effettuate dal 27 al 30 agosto 1984, tra le ore 8 e 10 con la tecnica delle catture al piretro. Nei giorni delle catture non si sono avute piogge né forti venti.

Risultati

Le zanzare raccolte secondo il metodo sopra descritto sono state identificate e contate in laboratorio.

Su un totale di 4.145 zanzare, sono state identificate 892 femmine e 354 maschi di Anopheles gambiae s.l., 11 ♀♀ di A.funestus Giles, 15 ♀♀ di A.pharoensis Theo. 1.709 ♀♀ e 1.164 ♂♂ di Culex quinquefasciatus Say.

Per ogni lotto, corrispondente a tre punti di cattura, è stata calcolata la media dei valori della densità per camera di femmine di A.gambiae s.l. e di Culex quinquefasciatus ed il valore medio per fila di lotti. L'esame comparativo di questi valori dà un χ^2 altamente significativo per A.gambiae con una probabilità inferiore all'uno per mille mentre le variazioni sono al limite della significatività per C.quinquefasciatus (.05 > P > .01). I valori medi della densità per camera e per lotto delle femmine di A.gambiae sono stati correlati con le rispettive distanze dai focolai larvali. La distribuzione che ne risulta mostra che la densità per camera decresce in funzione dell'allontanamento dai focolai larvali, ad eccezione di un lieve rialzo nella zona situata più all'interno (900-1050 m).

A soli 300 metri dai focolai larvali si osserva una diminuzione del 50 % della densità per camera (11 ♀♀/camera) rispetto alla densità massima rilevata nella fila di case situate a 200 metri dai focolai (28 ♀♀/camera). Si osserva anche che a soli 545 metri la riduzione è dell'88 % (3 ♀♀/camera).

La densità media per camera di femmine di Culex quinquefasciatus non risulta invece correlata significativamente all'allontanamento dai margini del "barrage" e mostra un andamento irregolare probabilmente influenzato dai focolai larvali (acque luride) sparsi in tutto il quartiere.

Per quanto concerne le due altre specie di Anopheles raccolte, A.funestus ed A.pharoensis, la densità per camera è risultata molto bassa (massimo 4 ♀♀/camera) e la loro presenza limitata alla prima fila di case vicine al "barrage".

Discussione

I dati raccolti nel presente studio vanno integrati con quelli della inchiesta entomologica e protozoologica condotte nel quadro del Programma di lotta contro la malaria nella città di Ouagadougou (5)(6). Nella zona che si estende dai margini del "barrage" fino a 350 metri, i valori di densità per camera di femmine di A.gambiae s.l. risultano compresi tra 11 e 25 e corrispondono a tassi di inoculazione entomologici (IIE) varianti tra 0.06 e 0.14, cioè da 1 a 4 punture infettanti per uomo e per mese (PIUM). Nella zona che si estende tra i 400 ed i 600 m, a valori di densità per camera compresi tra 3 e 7 corrisponde un IIE compreso tra 0.002 e 0.14, cioè da 0.5 a 1 PIUM.

Le differenze tra gli indici entomologici delle due zone sono state confermate dai risultati dell'inchiesta protozoologica condotta all'inizio del mese di settembre dello stesso anno, nelle due stesse zone, (6) su 228 bambini di età com-

presa tra 0 e 5 anni. I risultati mostrano che nei 99 bambini abitanti la zona dei primi 350 metri, l'indice plasmodico totale (IP tot.) è del 33.3 %, l'indice gametocitario (IG) dell'8 % e l'indice di densità parassitaria (IDP) per Plasmodium falciparum del 12.3 %. Invece nei 129 bambini residenti nella zona che si estende tra 400 e 600 m, l'IP tot. è dell'8.5 %, l'IG dell'1.5 % e l>IDP per P. falciparum del 5.8 %. Le differenze osservate tra i due gruppi risultano tutte significative con una probabilità inferiore all'uno per mille.

A 500 metri dai focolai larvali di Anopheles gambiae s.l. si osserva dunque una diminuzione notevole di tutti gli indici malariometrici rispetto a quelli osservati nella popolazione che risiede in prossimità di questi focolai.

I risultati dello studio mostrano, in zona urbana, una dispersione relativamente debole del vettore A. gambiae s.l. probabilmente dovuta ad una elevata frequenza e relativamente uniforme distribuzione spaziale degli ospiti.

Queste osservazioni aprono prospettive interessanti per il controllo della malaria in zona urbana. In particolare appare molto promettente l'utilizzazione di insetticidi ad azione residua nelle case prossime ai focolai larvali, sia per proteggere la popolazione a più alto rischio, sia per limitare la dispersione del vettore.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, P. C. G. 1940. Some observations on the flight of stained anophelines at Nkana, Northern Rhodesia. Ann. trop. Med. Parasit. 34: 35.
2. DE MEILLON, B. 1937. Some reactions of Anopheles gambiae and Anopheles funestus to environmental factors, in "Entomological studies". Publ. S. Afr. Inst. med. Res. 7: 313.
3. GILLIES, M. T. 1961. Studies on the dispersion and survival of Anopheles gambiae Giles in East Africa, By means of marking and release experiments. Bull. ent. Res. 52: 99.
4. JEPSON, W. F., MOUTIA, A. & COURTOIS, C. 1947. The malaria problem in Mauritius: The bionomics of Mauritian anophelines. Bull. ent. Res. 38: 177.
5. ROSSI, P., BELLI, A., MANCINI, L. & SABATINELLI, G. 1985. Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso) - Livelli di trasmissione della malaria: dati entomologici. Annali Ist. Sup. San. stesso vol.
6. SABATINELLI, G., BOSMAN, A., LAMIZANA, L. & ROSSI, P. 1985. Programma di lotta antimalarica nella città di Ouagadougou (Burkina Faso) - Livelli di trasmissione della malaria: dati protozoologici. Annali Ist. Sup. San. stesso vol.

LIVELLI DI SENSIBILITÀ DI ANOPHELES GAMBIAE S.L. AGLI INSETTICIDI TRADIZIONALI E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAELENSIS E BACILLUS SPHAERICUS

G. Majori (a), G. Sabatinelli (b), P. Rossi (b), R. Romi (a) e F. Villani (a)

(a) Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia, Roma

(b) Ministero Affari Esteri, Dipartimento Cooperazione allo Sviluppo

RIASSUNTO I saggi biologici effettuati su Anopheles gambiae s.l. nell'area urbana di Ouagadougou hanno messo in evidenza una sensibilità al fenitrothion, malathion, fenthion, temephos, chlorpyrifos e propoxur, ed una diminuita sensibilità al DDT. Nella zona rurale (Koubri) è presente una resistenza al DDT e dieldrin. Bacillus thuringiensis H-14 e B. sphaericus hanno dimostrato una elevata attività biologica in laboratorio.

SUMMARY Anopheles gambiae s.l. in urban areas of Ouagadougou, Burkina Faso, shows susceptibility to fenitrothion, malathion, fenthion, temephos, chlorpyrifos, propoxur, whereas 2 hours exposure to 4% DDT is required to have 100% mortality. DDT and dieldrin resistant populations from rural areas (village of Koubri) are present. Bacillus thuringiensis H-14 and B. sphaericus appear to have good larval control potential.

Introduzione

In Burkina Faso, ex Alto Volta, Anopheles gambiae s.l. è il principale vettore di malaria in tutto il paese, e costituisce il solo vettore accertato nella zona urbana di Ouagadougou (1). Le operazioni di lotta antivettoriale sono state effettuate in passato particolarmente nella zona di Bobo Dioulasso nel decennio 1955-1965. I primi dati sui livelli di sensibilità agli insetticidi in An. gambiae sono quelli pubblicati da Hamon *et. al.* nel 1957; successivamente i dati sulla sensibilità agli insetticidi tradizionali sono stati raccolti da Ricossé *et al.* (2). La resistenza al dieldrin nel villaggio di Pala, e al DDT in Bobo Dioulasso, è stata riportata da Hamon *et. al.* nel 1968 (3) e rilevata fin dai primi anni di lotta antimalarica. Tra le cause principali dell'insorgenza della resistenza è stata menzionata la pressione selettiva esercitata dagli insetticidi clororganici impiegati in agricoltura (Ricossé *et. al.*, 1969).

Nell'ambito della prima fase del progetto di lotta antimalarica nella città di Ouagadougou sono stati effettuati saggi di sensibilità di An. gambiae s.l. agli insetticidi comunemente impiegati, ed è stata valutata l'efficacia in laboratorio di alcune formulazioni a base di Bacillus thuringiensis H-14 e B. sphaericus, ceppi 1593 e 2362.

Materiale e metodi

I tests di sensibilità sono stati effettuati seguendo le metodiche standard raccomandate dall'OMS (4,5). Le prove con le alate sono state condotte impiegando femmine ingorgate di An. gambiae s.l. raccolte in differenti occasioni in abitazioni della zona urbana di Ouagadougou ed in un villaggio

(Koubri) situato a 27 Km dalla capitale. Gruppi di 20 zanzare sono stati esposti per 1 ora a carte impregnate con DDT 4%, dieldrin 0,4%, fenitrothion 1%, malathion 5%, propoxur 0,1%. L'esposizione all'insetticida è stata protratta per 2 ore quando vi è stata sopravvivenza con 1 ora di contatto.

Le prove di sensibilità sulle larve sono state eseguite su gruppi di 20 larve al 3° stadio-inizio del 4°, esposte per 24 ore a varie concentrazioni di una soluzione alcolica di chlorpyrifos, fenitrothion, fenthion, malathion, temephos. Le prove sono state effettuate in bicchieri di carta del diametro di 8 cm contenenti 250 ml di acqua esente da tracce di cloro. Sono state calcolate le percentuali di mortalità osservate dopo 24 ore o 48 ore a differenti concentrazioni e successivamente corrette con la formula di Abbott; i valori di LC_{50} e LC_{90} sono stati ottenuti con l'analisi dei probit (6) utilizzando un programma su computer Tektronix Mod. 4051. Sono stati calcolati anche i limiti fiduciali delle concentrazioni letali ed i valori dello slope.

Per la valutazione dell'attività larvicida dei bioinsetticidi B. thuringiensis H-14 e B. sphaericus è stato seguito il metodo riportato da Majori & Ali (7). Sono state preparate sospensioni all'1% (peso / volume) dei formulati, agitando per pochi minuti; l'agitazione è stata mantenuta per le diluizioni successive necessarie per le prove. Per ogni concentrazione sono state effettuate 3 repliche e tutte le prove sono state ripetute in diverse occasioni non meno di 4 volte.

I saggi sulle zanzare adulte e sulle larve sono stati effettuati in Gennaio-Febbraio, durante la stagione secca (23-25°C ; 20-25% di U.R.) e in Agosto-Settembre, durante la stagione delle piogge (24-28°C ; 70-74 % di U.R.)

Non è stata osservata una variabilità significativa tra i risultati delle prove effettuate in stagione secca e stagione delle piogge

Risultati e discussione

I risultati dei saggi biologici effettuati con dosi diagnostiche indicano livelli normali di sensibilità al fenitrothion, malathion e propoxur, mentre per il DDT si evidenzia un moderato livello di resistenza nel caso delle popolazioni di A. gambiae raccolte nell'area urbana di Ouagadougou (Tabella 1) ed una marcata resistenza al DDT e dieldrin, in misura nettamente maggiore per questo ultimo, nelle alate provenienti dal villaggio di Koubri (Tabella 2).

Tabella 1 - Sensibilità a vari insetticidi di adulti ^(a) di Anopheles gambiae s.l. raccolti nell'area urbana di Ouagadougou, Burkina Faso

Insetticida	Conc. (%)	Tempo di Esposizione (h)	Mortalità (%) ^(b)
FENITROTHION	1	1	100
MALATHION	5	1	100
PROPOXUR	0.1	1	100
DDT	4	1	88.5
DDT	4	2	100

(a) femmine ingorgate o gravide ; (b) mortalità corretta con la formula di Abbott .

I valori di LC_{50} e LC_{90} per gli insetticidi fosfororganici (Tabella 3) rientrano nell'ambito della sensibilità normale e in accordo con l'attività biologica esplicita dai singoli principi attivi.

Tabella 2 - Sensibilità agli insetticidi clororganici di adulti^(a) di Anopheles gambiae s.l. raccolti nel villaggio di Koubri, Ouagadougou, Burkina Faso.

Insetticida	Concentr. (%)	Tempo di esposizione (h)	Mortalità (%) ^(b)
DDT	4	1	50
DDT	4	2	54
DIELDRIN	0,4	1	0
DIELDRIN	0,4	2	20

(a) femmine ingorgate o gravide; (b) mortalità corretta con la formula di Abbott.

Tabella 3 - Sensibilità agli insetticidi fosfororganici di larve di 3°- 4° stadio di Anopheles gambiae s.l. raccolti nell'area urbana di Ouagadougou, Burkina Faso.

Insetticida	Concentrazione letale (mg/l) a 24 ore				
	LC ₅₀	Limiti fid. 95%	LC ₉₀	Limiti fid. 95%	Slope
CHLORPYRIFOS	0,00140	0,00115 - 0,00170	0,00694	0,00496 - 0,00969	3,46
FENITROTHION	0,01589	0,01453 - 0,01738	0,03095	0,02669 - 0,03588	2,39
FENTHION	0,00591	0,00544 - 0,00635	0,01080	0,00942 - 0,01240	1,53
MALATHION	0,05188	0,04434 - 0,06185	0,10239	0,08600 - 0,12379	1,65
TEMEPHOS	0,00382	0,00312 - 0,00468	0,02136	0,01342 - 0,03441	3,49

Le formulazioni di batteri sporigeni hanno dimostrato una elevata attività biologica nei confronti di A. gambiae s.l., secondo le caratteristiche dei prodotti (Tabella 4 , 5). In base ai risultati delle prove eseguite è possibile prevedere una efficace utilizzazione di questi bioinsetticidi per il controllo delle popolazioni vettrici nell'area di Ouagadougou.

Tabella 4 - Attività biologica di Bacillus thuringiensis H-14 su larve di 3°- 4° stadio di Anopheles gambiae s.l. dell'area urbana e periferica di Ouagadougou, Burkina Faso.

FORMULAZIONE	Concentrazione letale (mg / l) a 24 ore				
	LC ₅₀	Limiti fid. 95%	LC ₉₀	Limiti fid. 95%	Slope
BACTIMOS, WP	0,0809	0,0698 - 0,0937	0,2312	0,1802 - 0,2973	2,27
TEKNAR, FC	0,6618	0,4452 - 0,9837	1,7426	1,7374 - 2,0145	2,09
VECTOBAC, WP	0,1099	0,0959 - 0,1260	0,3753	0,2961 - 0,4757	2,59

Tabella 5 - Attività biologica di Bacillus sphaericus su larve di 3°- 4° stadio di Anopheles gambiae s.l. dell'area urbana e periferica di Ouagadougou, Burkina Faso.

CEPPO	Concentrazione letale (mg / l) a 48 ore				
	LC ₅₀	Limiti fid. 95%	LC ₉₀	Limiti fid. 95%	Slope
1593	0,4312	0,3421 - 0,5420	1,0650	0,7312 - 1,5542	1,97
2362	0,2187	0,1370 - 0,3483	1,2983	0,9531 - 1,7245	4,03

I dati ottenuti con questa indagine preliminare forniscono le necessarie informazioni sui livelli di sensibilità o resistenza agli insetticidi tradizionali e sulla efficacia in laboratorio di alcune formulazioni a base di batteri sporigeni, in modo da poter idoneamente programmare operazioni di lotta anti anofelica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ROSSI, S., MANCINI, L., Belli, A., SABATINELLI, G. 1985. Programma di lotta antimalarica nella città di Ouagadougou (Burkina Faso) - Livelli di trasmissione della malaria: dati entomologici. Annali Ist. Sup. San. stesso volume
- 2) RICOSSE', J.H. et al. 1969. Faits nouveaux relatifs à l'épidémiologie et au contrôle du paludisme en Afrique tropicale francophone. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63 (suppl. to n. 4): 36-41.
- 3) HARRON, J., MOUCHET, J., COZ, J., CHALLIER, A., SUBRA, R. & ADAM, G.P.. 1968. Résistance aux insecticides et contrôle des vecteurs en Afrique occidentale et centrale. Rapport rônéot. n. 18 O.C.C.G.F. Centre Murat O.R.S.T.O.M., Bobo Diulasso du 19 janvier 1968.
- 4) Organization Mondiale de la Santé 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitos to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. - Diagnostic tests. Unpublished document WHO/VBC/81.806.
- 5) Organization Mondiale de la Santé 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Unpublished document WHO/VBC/81.807.
- 6) FINNEY, D.J., 1952. Probit analysis. 2nd Ed. 318 pp. Cambridge University Press.
- 7) MAJORI, G. & ALI, A. 1984. Laboratory and field evaluation of industrial formulations of Bacillus thuringiensis var. israeliensis against some mosquito species of central Italy. J. Invert. Pathol. 43: 316-323.

VALORE DIAGNOSTICO DEL NUMERO DEI RAMI DELLE SETOLE ANTEPALMATE PER
L'IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ITALIANE DEL COMPLESSO ANOPHELES MACULIPENNIS

D. Boccolini (a), A. Sabatini (a) e M. Coluzzi (b)

(a) Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Istituto di Parassitologia, Università "La Sapienza", Roma

Summary (Diagnostic value of the number of branches of antepalate hairs for the identification of the Italian species of the Anopheles maculipennis complex). - The larval morphological character of the number of branches of antepalate hairs has been reexamined in order to obtain a better evaluation of its diagnostic value for the Italian species of the maculipennis complex. Statistically significant differences were confirmed between all species. However, only for a few comparisons, the character is completely discriminant and useful in field research.

Introduzione

Oltre alla specie nominale Anopheles maculipennis, sono presenti in Italia altre cinque specie appartenenti all'omonimo complesso: An. melanoon, An. messeae, An. atroparvus, An. labranchiae e An. sacharovi. Dopo i primi lavori di Falleroni (1) che portarono alla scoperta di questo gruppo di specie criptiche, il problema della loro identificazione è stato affrontato da diversi autori utilizzando criteri morfologici e genetici. L'esame elettroforetico di sistemi gene-enzima diagnostici è attualmente il solo criterio che consenta la corretta classificazione di tutte le specie allo stadio larvale e di alata (2). Questo metodo ha anche permesso di caratterizzare popolazioni della Valle Padana riferibili morfologicamente ad An. subalpinus (taxon considerato sinonimo di An. melanoon) e appartenenti probabilmente ad una settima entità del complesso maculipennis in Italia (3). L'esame elettroforetico del materiale non è tuttavia sempre facilmente utilizzabile in quanto comporta costi notevoli e il trasporto del materiale vivo o congelato in laboratorio. Alcuni criteri morfologici quali ad esempio i caratteri dell'uovo messi in evidenza da Falleroni (1) possono quindi ancora costituire un supporto notevole per indagini di campo sia pure con le ben note limitazioni dovute alla difficoltà di ottenere ovodeposizioni da alate catturate in attività di puntura. In questo contesto abbiamo ritenuto utile riesaminare criticamente il solo carattere morfologico larvale considerato di interesse diagnostico per il complesso e cioè il numero dei rami delle setole antepalate del IV e V tergite addominale (3-5). L'obiettivo è stato quello di definire meglio i limiti entro i quali questo carattere può essere utilizzabile in indagini di campo in Italia.

Materiali e metodi

Sono state esaminate 1.049 larve appartenenti a 23 campioni identificati precedentemente con l'esame delle uova o dei sistemi gene-enzima. Le larve al IV stadio sono state fissate in formalina al 4%, chiarificate in clorallattofenolo e montate in liquido di Faure o in fenolo-balsamo.

Tabella 1. - Numero e distribuzione dei rami delle setole antepalmate del IV e V segmento addominale di larve di IV stadio di diverse specie del complesso An. maculipennis.

SPECIE	LOCALITA'	N	ESTREMI	MEDIA	DS	ES
<u>labranchiae</u>	Policoro (MT)	36	6-12	9,33	1,55	0,26
	Buonamico (RC)	47	4-18	9,53	2,28	0,33
	Bernalda (MT)	44	5-13	9,91	1,60	0,24
	TOTALE	127	4-18	9,61	1,87	0,17
<u>atroparvus</u>	Follonica (GR)	30	9-17	11,83	1,78	0,32
	Ravenna (RA)	13	10-13	12,08	0,95	0,26
	Colli a Volturno (IS)	16	10-18	12,50	2,06	0,52
	Vallo della Lucania (SA)	11	11-18	12,91	2,07	0,62
TOTALE	70	9-18	12,20	1,79	0,21	
<u>maculipennis</u>	Buonamico (RC)	59	9-19	13,49	1,87	0,24
	Rieti (RI)	81	9-22	14,18	2,17	0,24
	Vicalvi (FR)	49	11-19	14,29	2,00	0,29
	Orte (VT)	13	11-20	14,38	2,40	0,66
	Opi (AQ)	106	11-22	14,74	2,33	0,23
	S.Oliva (FR)	33	11-23	16,64	3,04	0,53
TOTALE	341	9-23	14,50	2,39	0,13	
<u>messeae</u>	Sartirana e Torre Beretti (PV)	117	9-23	15,25	3,26	0,30
	Rieti (RI)	79	12-28	15,90	2,76	0,31
TOTALE	196	9-28	15,51	3,07	0,22	
<u>melanoon</u>	Roma (RM)	31	17-24	19,58	1,86	0,33
	Massarosa (LU)	63	16-30	22,08	3,17	0,40
	Sartirana (PV) (<u>subalpinus</u>)	47	18-34	24,60	3,26	0,48
	Vicalvi (FR)	92	20-31	25,02	2,79	0,29
TOTALE	233	16-34	23,42	3,47	0,23	
<u>sacharovi</u>	Taranto (TA)	48	29-50	38,08	4,66	0,67
	Vieste (FG)	34	33-49	41,73	3,92	0,67
TOTALE	82	29-50	39,60	4,70	0,52	

Risultati e discussione

Differenze significative (t di Student) risultano tra le medie di tutte le specie che variano da 9,6 per An. labranchiae a 39,6 per An. sacharovi (Tabella I). All'interno delle singole specie differenze significative (t di Student) risultano tra le popolazioni di maculipennis, melanoon e sacharovi. Tali differenze sono attribuibili a differenze genetiche dovute a fenomeni di deriva o a differenze fenotipiche dovute all'effetto di diversi ambienti larvali o di diverse condizioni di allevamento. Il campione di melanoon di Sartirana (Pavia), elettroforeticamente differenziabile e riferibile presumibilmente ad An. subalpinus (2), risulta intermedio rispetto ai campioni di Massarosa e Vicalvi sicuramente riferibili a melanoon.

Il carattere e' completamente discriminante solo tra An. sacharovi e le altre specie, ad eccezione di melanoon. Anche considerando l'intervallo definito da 1 deviazione standard intorno alla media, la sovrapposizione coinvolge tutte le specie del gruppo ad eccezione di labranchiae/melanoon e atroparvus/melanoon.

I dati concordano ampiamente con quelli esistenti in letteratura, solo per An. atroparvus, An. messeae e An. sacharovi sono stati trovati valori medi piu' alti. Soprattutto nel caso di An. sacharovi, che presenta setole con un numero particolarmente elevato di rami con conseguente maggiore possibilita' di errore nel conteggio, la differenza puo' essere attribuita ad un esame piu' accurato delle setole.

BIBLIOGRAFIA

1. FALLERONI, D. 1926. Fauna anofelica italiana e suo "habitat" (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria. Riv. Malariol. 5: 553-593.
2. BULLINI, L., BIANCHI BULLINI, A.P., CIANCHI, R., SABATINI, A. e COLUZZI, M. 1980. Tassonomia biochimica del complesso Anopheles maculipennis. Parassitologia 22: 290-292.
3. LA FACE, L. 1931. Sull'esistenza di razze diverse di Anopheles maculipennis. Riv. Malariol. 10: 673-683.
4. BATES, M. 1939. Variation in the antepalmar hairs of larvae of the Anopheles maculipennis complex. Riv. Malariol. 18: 299-312.
5. BUONOMINI, G. 1940. L'esame delle setole antepalmar per lo studio della popolazione larvale dei focolai naturali di Anopheles maculipennis. Riv. Parassit. 6: 163-174.

RUOLO DELLA COMPETIZIONE NELLA DISTRIBUZIONE DI VETTORI DI MALARIA IN ITALIA

M. Coluzzi (a) e A. Sabatini (b)

(a) Istituto di Parassitologia, Università "La Sapienza", Roma

(b) Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Summary (Effect of competition in the distribution of malaria vectors in Italy). - Unexpected patterns of distribution of Anopheles labranchiae and Anopheles sacharovi and some variations in their range in Italy observed in recent years suggest the effect of competitive phenomena with other species of the maculipennis complex.

Il ruolo dei fenomeni di competizione interspecifica nella distribuzione delle zanzare è stato ipotizzato ripetutamente. In teoria l'influenza di questo fattore è da prendere in attenta considerazione soprattutto per specie tra cui esistono strette relazioni filogenetiche come è il caso dei membri del complesso Anopheles maculipennis. Alcune osservazioni sugli areali dei due principali vettori di malaria compresi nel complesso, An. labranchiae e An. sacharovi, e sulle variazioni intervenute nella loro distribuzione in Italia negli ultimi anni, fanno supporre l'influenza di fenomeni di competizione.

An. labranchiae e An. sacharovi sono gli elementi più meridionali del complesso maculipennis. La loro speciazione appare legata ad isolati formati durante l'ultima glaciazione in nord Africa (labranchiae) e nell'Asia mediterranea (sacharovi). Gli areali primitivi di queste due specie termofile si sono estesi verso nord probabilmente in tempi storici, entrando in contatto con quelli di elementi più settentrionali del complesso quali An. maculipennis, An. atroparvus e An. melanoon (1). Le nicchie ecologiche di queste specie si sovrappongono largamente e le differenze che caratterizzano An. labranchiae e An. sacharovi sembrano sostanzialmente legate alla loro più spiccata termofilia che determina, nel caso dell'alata, una più stretta associazione con l'ambiente domestico termicamente protetto e un conseguente importante ruolo vettore per la malaria. Il diverso termopreferendum è evidenziabile anche allo stadio larvale (presumibilmente coinvolto in maniera più diretta negli ipotizzati fenomeni di competizione), ma recenti indagini svolte in Calabria hanno permesso di documentare ripetutamente la coesistenza di larve di An. maculipennis e An. labranchiae a pochi centimetri di distanza, nella stessa raccolta d'acqua, e probabilmente competitive rispetto alla stessa nicchia (2). La sovrapposizione della nicchia ecologica sembra particolarmente ampia tra An. labranchiae e il suo più stretto vicariante settentrionale

An. atroparvus. L'assenza di situazioni di reale simpatria tra queste due specie e la loro distribuzione paraptrica in Italia, suggeriscono chiaramente una ipotesi di esclusione competitiva. D'altra parte la distribuzione costiera in Italia peninsulare di An. labranchiae si spiega difficilmente sulla base dei soli fattori climatici, considerando che la stessa specie mostra di poter colonizzare ampiamente zone interne in Sicilia ed in Sardegna (fig. 1). Anche in questo caso l'ipotesi che emerge e' quella di una competizione con altri membri del complesso maculipennis, in particolare An. atroparvus, presenti in Italia peninsulare ma non nelle isole. Allo stesso modo la distribuzione strettamente costiera di An. sacharovi e il suo adattamento alle acque salmastre, sono probabilmente determinati dalla competizione che questa specie trova nelle acque dolci interne. La stessa specie infatti si rivela quale elemento eurialino e colonizza facilmente acque dolci interne in diverse zone dell'Asia dove sono assenti competitori del complesso maculipennis ed in particolare An. labranchiae e An. atroparvus.

L'ipotesi di un ruolo di fenomeni competitivi nella distribuzione di An. labranchiae e An. sacharovi emerge anche dall'esame di alcune variazioni intervenute nella distribuzione di questi vettori dopo la forte riduzione cui

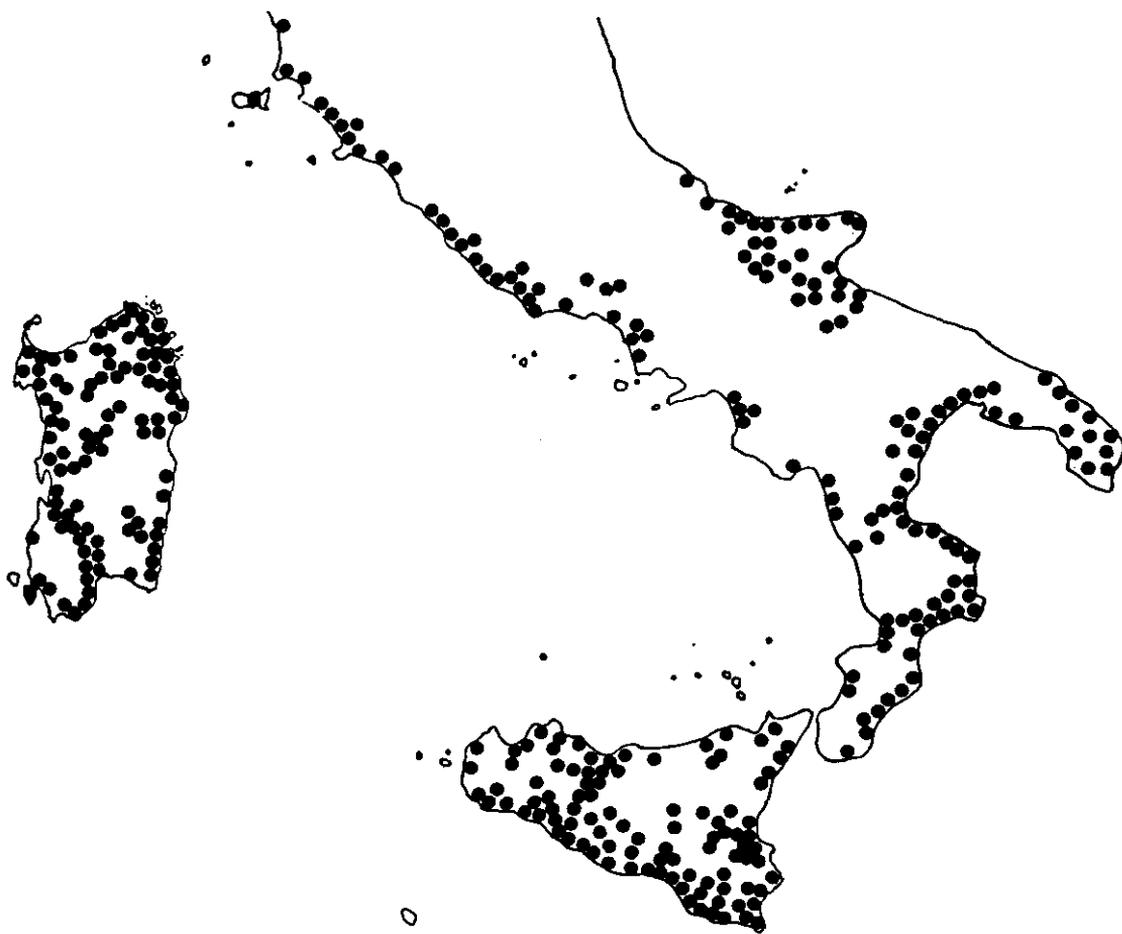


Fig. 1. - Distribuzione di An. labranchiae in Italia sulla base di tutti i dati disponibili. L'areale ha subito una forte riduzione a seguito dei trattamenti antimalarici e negli anni recenti e' risultato nuovamente in espansione soprattutto in Sardegna e in Sicilia.

sono stati soggetti durante la campagna antimalarica con insetticidi ad azione residua. Le osservazioni piu' recenti dimostrano che An. labranchiae, pur essendo presente nuovamente in densita' elevate in alcune localita' dell'Italia peninsulare (2,3,4), e' caratterizzato attualmente da una distribuzione a mosaico, molto focale, piu' strettamente costiera che in passato e comunque ancora molto limitata rispetto all'areale documentato precedentemente agli interventi con insetticidi. Alcune zone un tempo colonizzate da An. labranchiae sono state soggette a trasformazioni ecologiche o ad inquinamenti che limitano fortemente le possibilita' di sviluppo di questa come di altre specie del gruppo maculipennis. Tuttavia sono numerose le zone in cui buone possibilita' di sviluppo permangono ma dove An. labranchiae appare sostituito da An. melanoon, An. maculipennis o An. atroparvus. Simili sostituzioni sembrano essere avvenute anche per An. sacharovi almeno nel delta del Po dove non siamo riusciti a mettere in evidenza questa specie un tempo molto frequente. In base ai nostri dati, An. sacharovi permane sicuramente solo in alcune localita' costiere del Gargano dove era in passato simpatico/parapatrico con An. labranchiae e dove si registra l'apparente scomparsa di quest'ultima specie.

Indagini sperimentali su questi fenomeni sono di grande interesse pratico in quanto tutto fa ritenere che esistano notevoli possibilita' di manipolazioni della frequenza delle diverse specie con opportuni lanci. Ad esempio la diffusione di An. labranchiae in Sardegna potrebbe risultare fortemente ridotta dall'immissione di altre specie del gruppo maculipennis non vettrici di malaria. L'uso di queste metodologie dovrebbe inoltre essere attentamente valutato nel caso di complessi di specie di Anopheles tropicali (ad esempio complesso Anopheles gambiae) che comprendono specie vettrici e non vettrici.

BIBLIOGRAFIA

1. DE ZULUETA, J. 1973. Malaria and Mediterranean history. Parassitologia 15: 1-15.
2. SABATINI, A., TERRANOVA, F., CIANCHI, R. e COLUZZI, M. 1981. Ricerche sull'anofelismo delle fiumare della costa ionica calabrese. 1981. Parassitologia 23: 245-249.
3. BETTINI, S., GRADONI, L., COCCHI, M. e TAMBURRO, A. 1978. Rice culture and Anopheles labranchiae in central Italy. WHO/VBC/78.687: 1-5.
4. COLUZZI, M. e COLUZZI, A. 1980. Rischio di una ripresa della trasmissione della malaria e problemi connessi al controllo dei vettori. Riv. Parassit. 41: 117-125.

IL COMPLESSO ANOPHELES GAMBIAE IN MOZAMBICO

V. Petrarca (a), G.C. Carrara (b), M.A. Di Deco (a) e G. Petrangeli (a)

(a) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza"

(b) Ministerio de Saúde, Maputo, Mozambico

Durante le stagioni delle piogge (ottobre-marzo) del 1983 e 1984 sono state effettuate catture di alate di Anopheles gambiae s.l. in riposo all'interno delle abitazioni in 27 località appartenenti a otto delle dieci provincie in cui è suddivisa la Repubblica Popolare del Mozambico. Le alate semigravide sono state fissate sul campo in Carnoy etanolo-acetico e quindi spedite all'Istituto di Parassitologia di Roma dove sono state esaminate citologicamente. Come è noto l'esame dei cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche delle alate semigravide permette l'identificazione indubbia delle specie criptiche del complesso gambiae (altrimenti molto difficilmente distinguibili) come anche lo studio di eventuali polimorfismi da inversioni paracentriche (1). Sono state identificate in totale 1376 alate di cui 432 An.arabiensis, 497 An.gambiae s.s., 446 An.merus e 1 An.quadriannulatus.

An.gambiae s.s. è apparsa la specie del complesso prevalente nei campioni delle provincie settentrionali, caratterizzate da foreste ed elevata piovosità (superiore a 1000 mm/anno): nelle località delle provincie Cabo Delgado e Nampula essa è risultata sempre la sola presente (almeno nel periodo da noi considerato) con l'unica eccezione del campione di Olumbi, dove due delle quattro alate catturate sono state identificate come An.merus, la specie della costa orientale africana del complesso a sviluppo larvale in acqua salmastra. Nella parte nord occidentale del Paese (provincie di Niassa e Tete) An.gambiae s.s. è risultata simpatica con An.arabiensis; in particolare nei campioni raccolti nei villaggi della zona a più elevata altitudine (superiore a 800 m s.l.m.) del Niassa la frequenza di arabiensis raggiunge circa il 25% e nell'unico campione della provincia di Tete, catturato nel villaggio di Moatize, essa è superiore al 40%. Nei campioni delle località centrali costiere di Quelimane (provincia Zambesia) e Beira (provincia Sofala), caratterizzate da stagni a mangrovie, la maggior parte degli esemplari catturati è stato identificato come An.merus (circa il 75%), mentre il resto del campione era costituito da An.gambiae s.s.; quest'ultima specie è risultata predominante (80% circa) nel campione del villaggio di Marromeu (provincia Sofala), sulla riva sud del fiume Zambesi a circa 50 km dalla costa, mentre il restante 20% del campione era costituito da An.arabiensis. Nel sud del Mozambico (provincie Gaza e Maputo) caratterizzato da un clima più arido (meno di 600 mm/anno di pioggia) e da temperature medie annuali relativamente minori, An.gambiae s.s. sembra scomparire del tutto nei campioni

catturati all'interno delle abitazioni, sostituito da An.arabiensis, che sulla costa, laddove esistono stagni salmastri a mangrovie, è simpatico con An.merus. Particolarmente interessante è il campione catturato a Chokwe (provincia Gaza), un villaggio sulla riva sud del fiume Limpopo a circa 70 km dalla costa; in esso è infatti presente An.merus (circa 13%) nonostante la distanza dall'Oceano e l'assenza di mangrovie alle quali è usualmente legato lo sviluppo larvale di questa specie. In tale località è tuttavia presente acqua salmastra dovuta probabilmente alla soluzione in acqua piovana di sale presente nel suolo. Un fenomeno simile si verifica anche nelle località più meridionali di Bela Vista, Salamanga e Tinonganine, tutte sulle rive del fiume Maputo, che possono essere salmastre per l'ingresso di acqua marina sospinta dalle maree. Nella località di Bela Vista, in un unico campione catturato in attività di puntura su bovini, è stata identificata l'unica femmina di An.quadriannulatus.

L'esame dei cromosomi politenici, oltre a fornire i caratteri citotassonomici atti alla identificazione delle specie del complesso, ha permesso anche lo studio dei polimorfismi da inversioni paracentriche in An.arabiensis e An.gambiae s.s.. An.merus è risultato sempre monomorfo per l'ordinamento standard, fenomeno già segnalato in un lavoro effettuato sulle coste del Kenya (2).

An.arabiensis ha mostrato polimorfismo da inversione 2Rb/+: la frequenza dell'ordinamento invertito nell'area di distribuzione della specie (località meridionali e nord-occidentali) si aggira molto uniformemente intorno al 70% con l'unica eccezione del campione di Moatize (provincia Tete-non distante dal fiume Zambesi) in cui la frequenza di 2Rb scende, ma in maniera non significativa, al 50%. In alcune località è presente anche il polimorfismo 3Ra/+ ma con frequenze dell'ordinamento invertito mai superiori all'8%.

An.gambiae s.s. presenta due polimorfismi da inversione: 2Rb/+ e 2La/+. La frequenza dell'ordinamento b è molto bassa o pari a zero nei campioni delle zone costiere nord orientali e centrali, generalmente di foresta, mentre sale fino ad un massimo di circa il 35% nelle aree occidentali più interne e montuose. La frequenza dell'ordinamento 2La varia da un minimo del 28% fino ad un massimo dell'84: le frequenze più elevate si osservano in zone con scarsa piovosità (circa 700 mm/anno) della provincia nord-occidentale Tete (località Moatize). Questi dati sembrano in accordo con quanto già osservato in zone dell'Africa occidentale (1), dove si è potuta notare una relazione tra aumento della frequenza dei portatori di questo ordinamento e condizioni di aridità relativamente elevate.

La deviazione di ciascun campione di An.arabiensis e An.gambiae s.s. dall'equilibrio di Hardy-Weinberg non è risultata mai significativa.

BIBLIOGRAFIA

1. COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V., DI DECO M.A. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environment in the Anopheles gambiae complex. Trans.Roy.Soc.trop.Med.Hyg., 73: 483-497.
2. MOSHA F.W., PETRARCA V. 1983. Ecological studies on Anopheles gambiae complex sibling species on the Kenya coast. Trans.Roy.Soc.trop.Med.Hyg., 77: 344-345.

IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA DI ALATE DI ANOPHELES MERUS IN MOZAMBICO IN UNA ZONA DI SIMPATRIA CON AN.GAMBIAE E AN.ARABIENSIS

M.A.Di Deco (a), G.C.Carrara (b), V.Petrarca (a) & S.Bagalino (a)

(a) Istituto di Parassitologia, Università "La Sapienza", Roma

(b) Ministerio de Saúde, Maputo, Mozambico

Anopheles merus è la specie del complesso gambiae a sviluppo larvale in acqua salmastra che vive lungo la costa dell'Africa orientale. Situazioni di simpatrismo sono state documentate allo stadio di alata con le specie di acqua dolce An.gambiae e An.arabiensis. Nonostante l'elevato cripticismo tra le specie del complesso uno studio di Coluzzi nel 1964 (1) ha evidenziato due caratteri di tipo biometrico (il rapporto palpale e il numero di sensilli celoconici dell'antenna) che permettono di differenziare An.merus rispetto ad An.arabiensis e An.gambiae. Alcune osservazioni successive hanno confermato il valore tassonomico di tali caratteri mettendo tuttavia in evidenza una notevole variabilità così che popolazioni della stessa specie ma di diversa origine geografica mostrano distribuzioni talvolta piuttosto diverse mentre popolazioni appartenenti a specie diverse mostrano aree di sovrapposizione anche piuttosto ampie (1, 2, 3). Gli studi sopracitati si sono basati, per l'identificazione di An.merus rispetto alle specie d'acqua dolce su materiale di laboratorio originato da femmine identificate mediante test di ibridizzazione oppure su materiale di campo identificato con il test di tolleranza alla salinità. La scoperta che le sei specie del complesso possono essere tutte differenziate sulla base di riordinamenti cromosomici evidenziabili nelle cellule nutrici ovariche delle alate semigravide, ha determinato un minore interesse per tali metodi morfologici. Tuttavia, dato il limite che il metodo citotassonomico presenta (è applicabile infatti solo ad alate nello stadio fisiologico di semigravide) abbiamo ripreso in considerazione il metodo biometrico per valutarne la sua eventuale utilità pratica. L'opportunità per tale studio ci è stata fornita da un materiale, proveniente dal Mozambico, particolarmente adatto perchè costituito da esemplari raccolti in natura e appartenenti alle tre specie identificate cromosomicamente (4).

Materiali e Metodi

Il materiale consiste di 100 An.gambiae, 150 An.arabiensis e 200 An.merus raccolti da Febbraio a Giugno 1983 e da Dicembre 1983 a Giugno 1984 prevalentemente in riposo all'interno delle abitazioni. An.gambiae è stato raccolto in parte lungo la costa centrale del Mozambico dove è simpatrico con An.merus e in parte nelle regioni più interne e settentrionali. An.arabiensis proviene prevalentemente dalla costa meridionale dove è stato trovato in lavoro eseguito nell'ambito del contratto C.E.E. TSD.016.I(TT).

simpatria con An.merus e solo in piccola parte è originario della regione più interna e settentrionale del Paese. An.merus, infine, proviene da località della costa centrale e meridionale del Paese.

Il capo di ciascun esemplare, identificato cromosomicamente come appartenente a una delle tre specie, è stato chiarificato in clorallattofenolo e montato in fenolo-balsamo per la misura dei segmenti palpali e la conta del numero totale di sensilli celoconici sui segmenti antennali (dal 3° al 10°). Entrambe le osservazioni sono state eseguite a 200 ingrandimenti utilizzando un oculare micrometrico per la misura dei segmenti palpali. Per analizzare la distribuzione dell'indice palpale nelle tre specie sono stati utilizzati tutti gli esemplari disponibili mentre per analizzare la distribuzione del numero di sensilli celoconici dell'antenna solo un sottocampione di 50 esemplari è stato utilizzato per ciascuna specie. Per ogni esemplare è stato calcolato il numero medio di sensilli celoconici tra le due antenne. Il criterio per stabilire la utilizzabilità pratica di tali caratteri è stato basato sul calcolo del coefficiente di differenza tra le medie (1).

Risultati e Conclusioni

Il diagramma delle distribuzioni dell'indice palpale nei campioni da noi esaminati è riportato nella Fig. 1. Si può notare come tali distribuzioni risultino diverse soprattutto tra merus e le due specie d'acqua dolce essendo le medie e le deviazioni standard dell'indice palpale di An.merus, An.arabiensis e An.gambiae rispettivamente pari a $0,89 \pm 0,04$, $0,78 \pm 0,03$, e $0,77 \pm 0,02$. Mediante il calcolo del coefficiente di differenza è risultata un'area di sovrapposizione delle distribuzioni di tale carattere inferiore al 5% tra merus e arabiensis e inferiore al 3% tra merus e gambiae.

Il diagramma della distribuzione del numero di sensilli antennali nei campioni da noi esaminati è riportato in Fig. 2. Anche per questo carattere biometrico le medie risultano diverse tra merus e le specie d'acqua dolce e in particolare rispetto ad An.gambiae. Le medie e le deviazioni standard del numero di sensilli celoconici di An.merus, An.arabiensis e An.gambiae sono rispettivamente $33,45 \pm 3,33$, $28,04 \pm 3,61$, e $21,52 \pm 2,11$. Le aree di sovrapposizione, calcolate mediante il coefficiente di differenza, sono 22% e 1,5% rispettivamente per le coppie merus-arabiensis e merus-gambiae.

Infine è stato calcolato l'indice di correlazione tra i due caratteri biometrici. Poiché la correlazione non è risultata significativa in nessuna

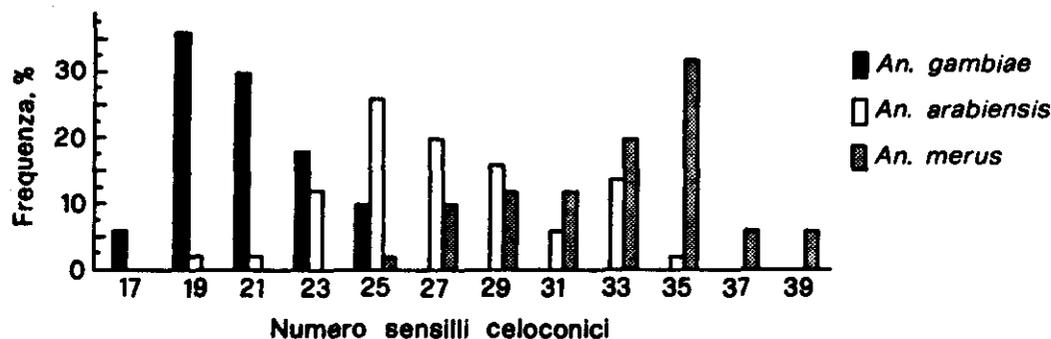


Fig.1. - Distribuzione dell'indice palpale in alate raccolte in Mozambico e identificate citotassonomicamente.

delle tre specie si è ipotizzato che i due metodi applicati contemporaneamente migliorassero la possibilità di identificazioni corrette. Tale ipotesi è stata saggiata esaminando il numero di sensilli celocnici in tutti gli esemplari disponibili che pur appartenendo a specie diverse cadevano nell'area di sovrapposizione per l'indice palpale. Come atteso su 40 esemplari indistinguibili sulla base di quest'ultimo carattere ben 37 risultavano identificabili sulla base dell'altro.

I nostri dati, ottenuti su esemplari di campo identificati con la tecnica citotassonomica, risultano completamente in accordo con quanto osservato da Coluzzi su ceppi di laboratorio originari dell'Africa Orientale, ma non completamente in accordo con quanto osservato da Bushrod (2) e Mosha & Mutero (3) su materiale identificato con il test di tolleranza alla salinità. Tuttavia mentre i dati di Bushrod anche se diversi dai nostri confermano un'area di sovrapposizione molto limitata tra merus e le specie d'acqua dolce, i dati di Mosha & Mutero al contrario mostrano un'area di sovrapposizione estremamente estesa (59%). Anche ammettendo una variabilità dei caratteri morfologici dovuta a fattori ambientali e genetici, il reperto di Mosha & Mutero ci sembra troppo differente da quello degli altri autori e perciò presumibilmente viziato da errori di classificazione verificatisi al momento dell'applicazione del test di tolleranza alla salinità.

In conclusione quindi l'indice palpale e il numero dei sensilli celocnici utilizzati contemporaneamente permettono di distinguere con un alto livello di affidabilità An.merus dalle specie simpatriche An.gambiae e An.arabiensis. Tuttavia è consigliabile, qualora si voglia eseguire un lavoro tassonomico di questo tipo, valutare preventivamente su un campione identificato col metodo citotassonomico, l'entità delle eventuali aree di sovrapposizione esistenti tra le diverse specie per i due caratteri biometrici.

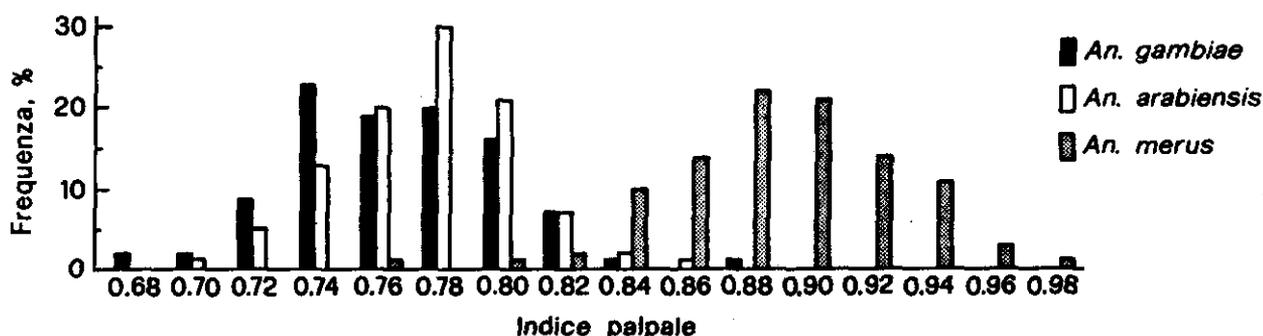


Fig.2. - Distribuzione del numero di sensilli celocnici dell'antenna in alate raccolte in Mozambico e identificate citotassonomicamente.

BIBLIOGRAFIA

1. COLUZZI M. 1964. Morphological divergences in the Anopheles gambiae complex. Riv. Malariol. 43: 197-232.
2. BUSHROD F.M. 1981. The Anopheles gambiae complex and Bancroftian filariasis transmission in a Tanzanian Coastal Village. Ann. trop. Med. Parasit. 75: 93-100.
3. MOSHA F.W. & MUTERO C.M. 1982. Separation of Anopheles merus from freshwater Anopheles gambiae by salinity tolerance test and morphological characters. Parassitologia 24: 255-264.
4. PETRARCA V., CARRARA G.C., DI DECO M.A. & PETRANGELI G. 1984. Il complesso Anopheles gambiae in Mozambico. (In questo stesso volume).

ESAME COMPARATIVO DEI TASSI DI INFEZIONE CON SPOROZOITI E FILARIE IN DIVERSE FORME DEL COMPLESSO ANOPHELES GAMBIAE IN UN VILLAGGIO DEL MALI

Y.T.Touré (a), V.Petrarca (b) e M.Coluzzi (a)

(a) Ecole Nationale de Médecine, Bamako, Mali

(b) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza"

Recenti ricerche citogenetiche sul complesso Anopheles gambiae in Mali (1) hanno permesso di precisare la distribuzione di An.arabiensis e An.gambiae s.s. e di mettere in evidenza nell'ambito di quest'ultima specie tre diverse unità tassonomiche indicate, con una nomenclatura non linneana, come Mopti, Savanna e Bamako. Queste tre forme caratterizzabili cromosomicamente hanno uno status di specie incipienti con tassi di ibridizzazione abbastanza elevati tra Bamako e Savanna, meno frequenti tra Mopti e Savanna e del tutto assenti tra Mopti e Bamako. Con l'obbiettivo di evidenziare eventuali differenze nel ruolo vettore per plasmodi e filarie umane sono state eseguite una serie di osservazioni nel villaggio di Bananbani dove tutti quattro i taxa sopra ricordati coesistono durante la stagione delle piogge in proporzioni variabili e mostrano livelli di antropofilia molto alti (HBI > 0,90) e piuttosto uniformi. Infatti il limitato numero degli animali ospiti alternativi (in particolare bovini) nonché la loro disposizione nel villaggio non favorisce deviazioni rilevanti dell'attività di puntura che resta quasi tutta orientata sull'uomo anche nel caso dei membri del complesso meno specificamente antropofili quali An.arabiensis.

Le zanzare sono state raccolte con catturatori a serbatoio durante le prime ore della mattina in abitazioni scelte a caso, e mantenute in bicchieri di cartone in buone condizioni climatiche fino alle prime ore del pomeriggio. Dalle 14 alle 18 si è proceduto al loro esame operando solo sulle femmine gonotroficamente attive che avevano compiuto un pasto di sangue durante la precedente notte e che risultavano al III-IV stadio ovarico di Christophers (semigravide). Ciascuna di queste zanzare è stata dissezionata in modo da consentire: 1) l'esame microscopico delle ghiandole salivari per la ricerca di sporozoitii; 2) l'esame microscopico del torace e del capo per la ricerca e l'identificazione di larve di filarie; 3) l'assorbimento su carta da filtro del sangue residuo contenuto nell'intestino per l'identificazione dell'ospite; 4) la fissazione in etanolo/acido acetico in microtubi da ml'0,5 delle ovaie da utilizzare successivamente per l'esame dei cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche. I preparati cromosomici sono stati ottenuti secondo la tecnica di Coluzzi (2) modificata da Hunt (3) e la classificazione dei diversi taxa è stata fatta seguendo il precedente lavoro (1).

L'esame comparativo dei tassi di infezione è stato limitato alla stagione

delle piogge e in particolare ai mesi di luglio, agosto e settembre in corrispondenza con le maggiori densità e con la presenza contemporanea dei quattro taxa oggetto del confronto. Sono stati complessivamente esaminati 1904 esemplari di cui 486 (25,53%) An.arabiensis e 1418 An.gambiae (74,47%), questi ultimi divisi in 453 (31,95%) Mopti, 598 (41,17%) Savanna, 154 (10,86%) Bamako e 213 (15,02%) portatori di cariotipi non facilmente riferibili ad una delle tre forme cromosomiche (in prevalenza cariotipi risultanti da ibridazioni). Delle 1904 zanzare esaminate ben 276 sono risultate portatrici di sporozoitii nelle ghiandole salivari con un tasso di infezione, molto elevato, pari al 14,50%. Osservazioni condotte in parallelo identificando gli sporozoitii con anticorpi monoclonali (Esposito et al., in preparazione) hanno consentito di accertare che oltre il 99% delle infezioni era riferibile a Plasmodium falciparum in accordo con i dati rilevati nella popolazione umana durante la stagione delle piogge.

La distribuzione delle zanzare infette risulta omogenea nei quattro taxa se si pongono a confronto i campioni totali. Ciò fa ritenere che non sono complessivamente presenti differenze rilevanti nei livelli di suscettibilità al parassita o nella longevità media e che, nelle condizioni prevalenti nel villaggio, tutti i taxa confrontati mostrano un elevatissimo tasso di puntura sull'uomo, confermato d'altronde dalle identificazioni dei pasti di sangue. Quando l'analisi comparativa viene indirizzata ai campioni dei singoli mesi emergono differenze significative nei tassi di infezione dovute almeno in parte a variazioni non parallele nell'età media di alcune delle popolazioni presumibilmente in relazione a un loro sviluppo stagionale asincrono e/o a diversi valori adattativi (e longevità) rispetto a determinate condizioni stagionali. Differenze più importanti si osservano nell'ambito della stessa popolazione tra varianti cromosomiche per inversioni paracentriche del braccio 2R. Ad esempio nella popolazione Mopti gli eterocariotipi bc/u mostrano a luglio un tasso di infezione del 27,12% significativamente più elevato ($P=0,002$) del tasso osservato nei corrispondenti omocariotipi che risulta dell'8,53% nello stesso mese (Tab.1). Questa differenza non è confermata ad agosto ciò che fa ipotizzare una relazione con un temporaneo vantaggio dell'eterozigote durante il mese di luglio e un corrispondente aumento della sua longevità media. Simili osservazioni sono possibili anche per polimorfismi cromosomici 2R di An.arabiensis e della forma Savanna di An.gambiae.

Per quanto riguarda le osservazioni su larve di filarie gli esami morfologici eseguiti in particolare sul terzo stadio (L_3) ci consentono di riferire le infezioni a Wuchereria bancrofti in accordo con i dati parassitologici umani e con l'elevato livello di antropofilia documentato. Delle 1904 zanzare esaminate 209 (10,97%) sono risultate infettate (presenza di L_1-L_3) e 66 (3,47%) sono risultate infettanti (L_3). La distribuzione delle zanzare infettate e infettanti nei quattro taxa non risulta omogenea. In particolare i tassi di infezione sui campioni totali sono pari a 4,32% per An.arabiensis, 4,64% per Mopti, 2,68% per Savanna e 0,65% per Bamako (solo una zanzara infettante su 153 esaminate). La minore efficienza vettrice della forma Bamako non sembra dovuta a minore longevità in quanto tale fattore influenzerebbe anche il tasso di infezione con sporozoitii e, d'altra parte la minore frequenza di filarie in questa forma si osserva anche considerando le larve L_1 e L_2 . Potrebbero quindi essere ipotizzati meccanismi di resistenza all'infezione o un ritmo di puntura diverso tale da determinare una minore probabilità di suzione delle microfilarie.

Tabella 1 - Positività per sporozoitii in Anopheles gambiae s.s., forma cromosomica Mopti, portatori degli ordinamenti alternativi 2Rbc e 2R u. Gli omocariotipi (bc/bc e u/u) vengono posti a confronto con l'eterocariotipo (bc/u).

MESE	SPOR.	TOTALE	bc/bc,u/u		bc/u(*)		χ^2_1	P
			N	%	N	%		
LUGLIO	POS.	27	11	40,74	16	59,26		
	NEG.	161	118	73,29	43	26,71		
	TOT.	188	129	68,62	59	31,38		
	TASSO	14,36		8,53		27,12	9,92	0,002
AGOSTO	POS.	16	9	56,25	7	43,75		
	NEG.	78	39	50,00	39	50,00		
	TOT.	94	48	51,06	46	48,94		
	TASSO	17,02		18,75		15,22	0,03	0,86
TOTALE	POS.	43	20	46,51	23	53,49		
	NEG.	239	157	65,69	82	34,31		
	TOT.	282	177	62,77	105	37,23		
	TASSO	15,25		11,30		21,90	4,94	0,03
Tasso - mesi	χ^2_1 :	0,17		2,70		1,50		
	P:	0,68		0,10		0,22		

(*) Sono stati presi in esame solo gli eterocariotipi per i quali l'analisi cromosomica ha consentito una identificazione sicura rispetto ad eterocariotipi aventi la stessa apparente configurazione politenica ma non appartenenti alla forma Mopti.

E' interessante notare che calcolando l'indice di correlazione tra i tassi di positività per sporozoitii e per filarie L_3 nei 5 gruppi (un gruppo per ciascuno dei quattro taxa e un gruppo comprendente cariotipi di gambiae non assegnati ad alcuna forma) per un totale di 15 diversi campioni nei tre mesi, si ottiene un valore molto basso ($r=-0,18$). Tale valore aumenta sensibilmente se la correlazione viene limitata a gambiae Savanna e Mopti ($r=0,46$) ma non raggiunge in nessun caso la significatività. Una correlazione sarebbe invece attesa nel caso che le variazioni dei tassi fossero dipendenti unicamente o prevalentemente da variazioni dell'età media del campione.

BIBLIOGRAFIA

1. TOURE Y.T., PETRARCA V., COLUZZI M. (1983). Nuove entità del complesso Anopheles gambiae in Mali. Parassitologia, 25: 367-370.
2. COLUZZI M. (1968). Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche nel complesso gambiae del genere Anopheles. Parassitologia 10: 179-84.
3. HUNT R.H. (1973). A cytological technique for the study of Anopheles gambiae complex. Parassitologia, 15: 137-139.

ZANZARIERE A BARRIERA PER IL CAMPIONAMENTO DI CULICIDI IN ATTIVITA' DI PUNTURA SU ANIMALI

Y.T.Touré (a) e M.Coluzzi (b)

(a) Ecole Nationale de Médecine, Bamako, Mali

(b) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza"

Summary (Fences for sampling mosquitoes biting on animal herds).- Mosquito net fences 2.30-2.50 m high placed around cowherds at their night resting sites have been successfully utilized to obtain large samples of malaria vectors of the Anopheles gambiae complex and of other mosquito species. Collections of blood fed mosquitoes were carried out during the night by inspecting regularly the net side facing the animal enclosure. This sampling procedure has important advantages over alternative procedures based on direct collection on animal or on the use of baited traps.

Lo studio delle preferenze alimentari dei ditteri culicidi è di grande interesse epidemiologico e viene affrontato con diverse tecniche (1). L'identificazione del sangue ingerito fornisce informazioni attendibili solo quando sia possibile disporre di campioni rappresentativi di zanzare che si sono nutrite. La cattura notturna diretta su ospiti alternativi e in diverse condizioni resta comunque una verifica importante del comportamento di puntura ed è indispensabile in molte ricerche particolarmente quando -si tratti di stimare la frazione esofaga ed esofila di una determinata specie. La cattura notturna su uomo è usata con successo nello studio dei tassi di inoculazione di plasmodi e filarie e nella valutazione della capacità vettrice. La cattura notturna su animali pone invece diversi problemi soprattutto quando si debba operare su grossi mammiferi all'aperto (bovini in particolare) e quando non sia possibile disporre di soggetti docili od opportunamente immobilizzati. Sono stati anche sperimentati numerosi tipi di trappole (vedi 1) attraverso cui, tuttavia, si influenza quasi sempre la composizione del campione. D'altra parte in situazioni in cui l'animale utilizzato quale esca è presente in numerosità ed aggregazioni importanti, l'effetto attrattivo di singoli soggetti associati o meno a trappole può essere comparativamente del tutto irrilevante. Simili osservazioni sono state da noi fatte ripetutamente nel corso di indagini sui vettori di malaria del complesso An.gambiae la cui frazione zoofila/esofila è in genere scarsa e i cui ospiti alternativi sono costituiti principalmente da bovini. In tali condizioni è risultato molto utile "operare" sull'intera mandria con "zanzariere a barriera" secondo il metodo che descriviamo qui di seguito.

Il principio, molto semplice, è quello di realizzare una barriera di rete zanzariera esternamente al recinto in cui sono chiusi gli animali durante la notte. La zanzariera viene montata su pali metallici costituiti ciascuno da due segmenti il primo dei quali lungo due metri è infisso nel terreno per una profondità di circa 30 cm mentre il secondo, lungo 1 metro, è raccordato al primo in modo da formare un angolo di 120° rivolto verso il recinto. I pali vengono posti ad una distanza di due metri e sono provvisti di anelli metallici da agganciare ad anelli di tela predisposti sulla zanzariera in modo che questa risulti tesa tra i pali a formare una barriera continua di 2,30-2,50 m di altezza intorno agli animali. Tra il recinto e la parete di rete zanzariera viene lasciato un corridoio percorribile di circa 1 m di larghezza utilizzato durante la notte per ispezionare ogni 10-15 minuti la parete interna della zanzariera con una torcia elettrica e campionare le zanzare nutrite con un aspiratore a serbatoio (2). Una barriera costituita da 30 pali e 60 metri di zanzariera può essere facilmente trasportata e montata da tre tecnici in meno di 30 minuti.

La parete di rete zanzariera intorno alla mandria non costituisce un ostacolo rilevante né per l'entrata né per la fuoriuscita delle zanzare, come d'altra parte è stato dimostrato da Gillies e Wilkes (3) con barriere anche più alte. Inoltre nel nostro caso le zanzare possono passare non solo sopra la zanzariera ma anche sotto in quanto una apertura di 10-20 cm viene lasciata all'altezza del suolo. Per quanto la zanzariera non impedisca l'allontanamento delle zanzare nutrite, un'alta percentuale di queste, appesantite dal pasto di sangue, sosta sulla barriera per periodi sufficienti a consentire la cattura.

Questo metodo di campionamento di culicidi in attività di puntura all'esterno su animali, viene da noi utilizzato con successo in ricerche in corso sul complesso An.gambiae in Mali e presenta a nostro parere i seguenti vantaggi: 1) il campione risulta in genere molto più numeroso e presumibilmente più rappresentativo di quello che si ottiene con la cattura su singoli animali o con trappole; 2) il campione è costituito prevalentemente da femmine che hanno compiuto indisturbate un pasto di sangue completo sull'animale e possono quindi facilmente essere mantenute vive ed utilizzate per allevamenti e per diversi tipi di esame tra i quali l'analisi citotassonomica dei cromosomi delle cellule nutrici ovariche; 3) vengono evitate immobilizzazioni spesso traumatiche per gli animali con i quali si evita un contatto diretto limitando così i rischi per il personale addetto alla cattura notturna.

BIBLIOGRAFIA

1. SERVICE M.W. (1976). Mosquito ecology. Field sampling methods. Applied Science Publ., London, pp.583.
2. COLUZZI M. & PETRARCA V. (1973). Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and other insects. Mosq.News, 33: 249-250.
3. GILLIES M.T. & WILKES T.J. (1978). The effect of high fences on dispersal of some West African mosquitoes. Bull.ent.Res., 68: 401-408.

OSSERVAZIONI DI LABORATORIO SU POLIMORFISMI DA INVERSIONE ORIGINATI DA INCROCI
TRA POPOLAZIONI DIVERSE DI ANOPHELES GAMBIAE S.S.

A. Persiani, M.A. Di Deco & G. Petrangeli

Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza"

Alcune specie di zanzare del complesso Anopheles gambiae sono caratterizzate da un elevato grado di polimorfismo dovuto a inversioni paracentriche. In almeno due specie del complesso (An.gambiae s.s. e An.arabiensis) tale variabilità cromosomica è mantenuta, in condizioni naturali, a livelli molto alti e tali, probabilmente, da consentire alla specie di aumentare le possibilità di adattamento a condizioni ambientali diverse (1). Quando partendo da alcune popolazioni polimorfiche del complesso An.gambiae si stabiliscono ceppi in laboratorio si osserva in genere il mantenimento dei polimorfismi originari. In particolare un ceppo di An.gambiae s.s. colonizzato nella Gambia e studiato in laboratorio per nove generazioni ha mostrato costantemente eccessi, spesso statisticamente significativi, delle frequenze eterocariotipiche osservate rispetto ai valori attesi secondo la legge di Hardy-Weinberg (2). In questa nota vengono presentati ulteriori dati sul polimorfismo di un ceppo di An.gambiae s.s.. In questo caso i polimorfismi non sono gli stessi presenti in natura in quanto sono stati originati incrociando in laboratorio popolazioni cromosomicamente diverse, geograficamente distanti e non completamente panmittiche.

Materiali e Metodi

Il materiale da noi utilizzato è stato ottenuto mediante incroci tra le tre seguenti colonie di laboratorio: Ziguinchor, stabilita nel 1981 a partire da ovodeposizioni di oltre 80 femmine raccolte nei pressi di Ziguinchor, Senegal meridionale, corrispondente alla popolazione 2 descritta in (3), caratterizzata dai polimorfismi 2Rd/+, 2La/+; Bansang, costituita nel 1981 a partire da ovodeposizioni di circa 50 femmine raccolte nei pressi di Bansang, nella zona interna della Gambia, corrispondente alla popolazione 1 descritta in (3), monomorfa per le inversioni fissate 2Rb e 2La; Bamako, stabilita nel 1983 da materiale proveniente da Banambani, nei pressi di Bamako, nel Mali meridionale, corrispondente alla forma cromosomica Bamako descritta in (4), caratterizzata dal polimorfismo 2Rjcu/jbcu e dall'inversione fissata 2La.

In nessuno degli incroci eseguiti tra questi ceppi si sono osservati fenomeni di incompatibilità ed eterocariotipi molto rari o assenti in natura sono risultati producibili in laboratorio, presenti nel ceppo ibrido secondo l'atteso e con fitness normale o comunque non inferiore ai ceppi parentali. Uno dei ceppi risultato da questi incroci, e contenente ordinamenti di tutte e tre le colonie, è stato allevato per numerose generazioni e da noi preso in esame al lavoro eseguito nell'ambito di programmi finanziati da C.N.R. e M.P.I.

fine di osservare il mantenimento dei diversi ordinamenti alternativi. A distanza di 16 mesi dall'incrocio eseguito tra i ceppi parentali, abbiamo esaminato tre campioni di alate femmine prelevati rispettivamente dalla XXV, XXVII e XXVIII generazione.

L'allevamento è stato eseguito in stanze termostatiche alla temperatura di $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidità relativa variabile dal 50 al 70% e fotoperiodo di 12h. Per lo studio del polimorfismo cromosomico sono state utilizzate alate femmine semi-gravide; i preparati dei cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche sono stati allestiti secondo le tecniche in uso presso il nostro laboratorio (3). Dalla lettura del cariotipo di ciascun individuo sono state calcolate le frequenze degli ordinamenti cromosomici alternativi quindi, applicando la legge di Hardy-Weinberg, le frequenze attese dei cariotipi: eventuali scostamenti tra frequenze dei cariotipi osservate e attese sono poi state saggiate con il test del χ^2 per stabilirne la significatività.

Risultati e Discussione

In tutti i campioni appartenenti alle tre generazioni è stato documentato il mantenimento di tre dei cinque ordinamenti alternativi presenti nei ceppi parentali ovvero 2R+, 2Rjcu e 2Rd, mentre gli ordinamenti 2Rb e 2Rjbcu sono andati persi; inoltre dall'ordinamento 2Rjcu si sono originati per crossing over due nuovi varianti: 2Rj e 2Rcu, presenti con frequenze basse nelle generazioni da noi esaminate. Solo in alcuni individui eterozigoti per due o più inversioni è stato possibile stabilire mediante lettura diretta se le inversioni appartenevano o no allo stesso omologo. Si è dovuto perciò procedere all'analisi delle frequenze distinguendo all'interno del cromosoma 2 tre sistemi di inversione: il sistema 2Rj con i due ordinamenti alternativi $+^j$ e j, il sistema 2Rd con i tre ordinamenti alternativi $+^d$, d e cu e il sistema 2La con i due ordinamenti alternativi $+^a$ ed a. In Fig.1 sono riportate le frequenze degli ordinamenti cromosomici osservate nelle tre generazioni successive per ciascuno dei tre sistemi di inversione. Si può notare che in tutti e tre i sistemi gli ordinamenti cromosomici standard vanno progressivamente aumentando nelle tre generazioni successive.

Le frequenze cariotipiche delle tre generazioni sono riportate in Tabella 1 dove per ciascun sistema di inversione sono state messe a confronto con le frequenze attese secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Si può notare che gli scostamenti sono dovuti a eccesso pressoché costante degli eterocariotipi e difetto degli omocariotipi. La deviazione tra numero dei cariotipi osservato e atteso secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg, saggiata col test del χ^2 è risultata significativa nella XXV generazione per il sistema 2Rj ($P=0,005$) e 2Rd ($P \ll 0,001$), nella XXVII generazione per i sistemi 2Rd ($P < 0,001$) e 2La

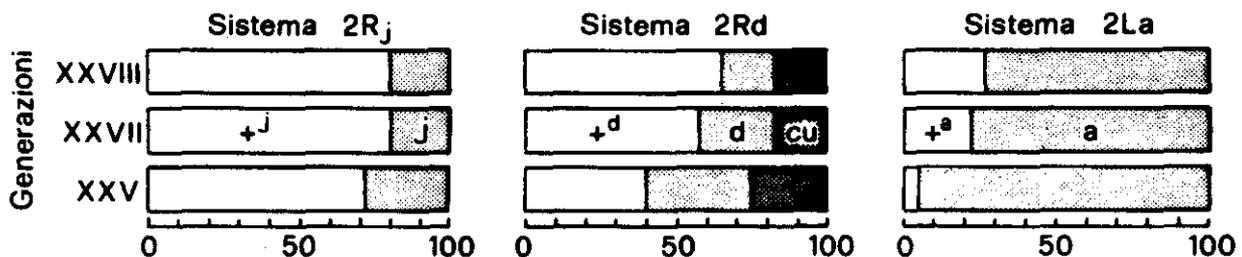


Fig. 1 - Frequenze degli ordinamenti cromosomici alternativi per i tre sistemi d'inversione del cromosoma 2 in un ceppo di laboratorio di *Anopheles gambiae* s.s.. I campioni appartengono a tre diverse generazioni.

($P=0,04$) e nella XXVIII generazione per il sistema 2La ($P<<0,001$).

Un discorso a parte merita infine l'analisi del tasso di eterozigosi presente nei tre campioni. Si è infatti notato che tale valore diminuisce per i sistemi 2Rj e 2Rd e aumenta per il sistema 2La. Tali andamenti opposti ci hanno indotto a calcolare la frequenza media di eterozigosi. Abbiamo quindi constatato che, pur variando l'eterozigosi tra un sistema di inversione e l'altro e, nell'ambito dello stesso sistema, tra una generazione e l'altra, il valore di eterozigosi media per generazione rimane costante intorno al 52%.

I risultati qui esposti concordano nell'indicare il mantenimento del polimorfismo cromosomico in ceppi di laboratorio anche quando esso è prodotto da ordinamenti alternativi derivanti da popolazioni diverse per origine geografica e non completamente panmittiche.

I cambiamenti di frequenze osservati nelle tre generazioni possono essere influenzati da fattori quali origine di nuove associazioni per effetto dello scambio, inevitabili fenomeni di deriva, differenza nei valori adattativi tra i cariotipi rispetto alle condizioni di laboratorio. Tali cambiamenti delle frequenze, tuttavia, sembrano non influenzare la frequenza media di eterozigosi che si è mantenuta intorno ad un valore pressoché costante. I dati sembrano confermare un ruolo importante della sovradominanza marginale dell'eterozigote sia per il mantenimento dei polimorfismi, sia per spiegare alcuni dei cambiamenti di frequenze osservati. In particolare l'aumento progressivo in frequenza dell'ordinamento $2L+^a$ appare legato al vantaggio dell'eterocariotipo in quanto l'omocariotipo $2L+^a/+^a$ risulta pressoché assente e perciò presumibilmente svantaggiato almeno nelle nostre condizioni di laboratorio.

Tabella 1. - Frequenze percentuali osservate (sopra) e attese (sotto) dei cariotipi per i diversi sistemi di inversione nel cromosoma 2 in femmine di un ceppo di laboratorio di *Anopheles gambiae* s.s.. I campioni appartengono a tre diverse generazioni.

GENERAZIONE	N	SISTEMA 2Rj			SISTEMA 2Rd						SISTEMA 2La		
		$\frac{J}{+} \frac{J}{+}$	$\frac{J}{+} \frac{j}{j}$	$\frac{j}{j}$	$\frac{d}{+} \frac{d}{+}$	$\frac{d}{+} \frac{d}{d}$	$\frac{d}{+} \frac{d}{cu}$	$\frac{d}{d}$	$\frac{d}{cu}$	$\frac{cu}{cu}$	$\frac{+}{+} \frac{+}{+}$	$\frac{+}{+} \frac{a}{a}$	$\frac{a}{a}$
XXV	58	46,55	53,45	0,00	6,90	39,65	24,14	0,00	29,31	0,00	0,00	10,34	89,66
		53,70	39,16	7,14	15,05	26,76	20,73	11,89	18,43	7,14	0,27	9,80	89,93
XXVII	92	59,78	40,22	0,00	21,74	43,48	25,00	0,00	8,69	1,09	1,09	41,30	57,61
		63,83	32,13	4,04	31,34	29,21	20,07	6,81	9,36	3,21	4,72	34,03	61,25
XXVIII	89	61,80	38,20	0,00	37,08	28,09	25,84	0,00	6,74	2,25	0,00	56,18	43,82
		65,45	30,90	3,65	41,01	22,31	23,75	3,03	6,46	3,44	7,89	40,40	51,71

BIBLIOGRAFIA

1. COLUZZI, M., SABATINI, A., PETRARCA, V. & DI DECO, M.A. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 73: 483-497.
2. DI DECO, M.A., PETRARCA, V., VILLANI, F. & COLUZZI, M. 1980. Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di *Anopheles* allevati in laboratorio. *Parassitologia* 22:304-306.
3. BRYAN, J.H., DI DECO, M.A., PETRARCA, V. & COLUZZI, M. 1982. Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.str. in The Gambia, West Africa. *Genetica* 59: 167-176.
4. TOURE', Y.T., PETRARCA, V. & COLUZZI, M. 1983. Nuove entità del complesso *Anopheles gambiae* in Mali. *Parassitologia* 25: 367-370.

OSSERVAZIONI SU POLIMORFISMI DA INVERSIONE IN UNA POPOLAZIONE DI LABORATORIO DI ANOPHELES STEPHENSI

M.A. Di Deco (a) & H. Tran Duc (b)

- (a) Istituto di Parassitologia (Facoltà di Medicina), Università di Roma "La Sapienza", Roma
(b) Istituto di Malariologia di Hanoi, Viet Nam

Introduzione

Il polimorfismo cromosomico per inversioni paracentriche è molto diffuso in diverse specie di Anofelini ed è stato studiato sia in condizioni naturali che di laboratorio. Anopheles stephensi si è dimostrato particolarmente adatto a studi di laboratorio che hanno permesso di evidenziare le relazioni filogenetiche con la specie affine An.superpictus (1), di descrivere la distribuzione geografica di diversi varianti cromosomici (2) e infine di stabilire le relazioni tra questi varianti e alcuni modelli di comportamento (vedi (3) per una bibliografia dettagliata). Il polimorfismo più ampiamente studiato, soprattutto da quest'ultimo punto di vista, è stato il 2Rb/+ che sembra anche essere fino ad oggi il più diffuso. Questo polimorfismo insieme al 2Lc/+ è stato da noi preso in esame e descritto in questa nota particolarmente in relazione ai tempi di sviluppo larvale in condizioni di laboratorio.

Materiali e Metodi

I risultati qui esposti sono stati ottenuti con il ceppo Delhi 1971 (2) in allevamento presso l'Istituto di Parassitologia. Tale ceppo è caratterizzato dalla presenza di due polimorfismi: il 2Rb/+ e il 2Lc/+. Sono state eseguite cinque consecutive generazioni di laboratorio da cui sono stati estratti altrettanti campioni di alate femmine con numerosità, nell'ordine, pari a 120, 87, 104, 137 e 142. I cromosomi politenici ovarici di tali campioni hanno permesso l'analisi dei due polimorfismi presenti. Mentre il primo campione è stato allevato in condizioni standard, gli altri quattro sono stati ottenuti in condizioni più controllate e cioè con densità larvale più bassa corrispondente a 120 larve per bacina (1 larva per 3 cm² di superficie) e separando le alate per giorni di sfarfallamento in modo da fornire loro il pasto di sangue entro due giorni dallo sfarfallamento stesso.

Risultati

La frequenza percentuale degli ordinamenti 2Rb e 2Lc nelle cinque generazioni, diagrammata in Figura 1 indica che i due polimorfismi si aggirano intorno a valori medi piuttosto diversi essendo il 2Rb pari al 53,90% e il 2Lc pari al 34,00%. Inoltre, mediante test di omogeneità sono state evidenziate forti oscillazioni ($P \ll 0,001$) nella frequenza del 2Rb nelle successive generazioni mentre la frequenza del 2Lc appare molto più stabile ($P < 0,60$). Saggiando, mediante il test del χ^2 , l'equilibrio di Hardy Weinbergh per i due sistemi di inversione nei cinque campioni, è risultato che la distribuzione dei cariotipi osservata per il sistema 2Lc è sempre in accordo con i valori attesi mentre la distribuzione dei cariotipi 2Rb mostra un forte eccesso di eterozigoti nel primo campione ($P < 0,001$) e un eccesso significativo anche se di minore entità nel quinto campione ($P < 0,05$).

Nella Figura 2 sono riportate le frequenze percentuali degli ordinamenti 2Rb e 2Lc per tre delle quattro generazioni ottenute con allevamento controllato. Ogni singola generazione è stata suddivisa secondo i giorni di sfarfallamento: sfarfallamento precoce che comprende 1°, 2° e 3° giorno e sfarfallamento tardivo che comprende i giorni successivi al 3°. I dati mostrano un andamento costante in tutte le tre generazioni con una diminuzione significativa ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,01$) della frequenza dell'ordinamento 2Rb nell'ultima parte dello sfarfallamento. L'ordinamento 2Lc invece, non ha mostrato nelle diverse generazioni un andamento costante. Solo in una delle tre generazioni di laboratorio si osserva un aumento significativo ($P < 0,001$) dell'ordinamento nell'ultima parte dello sfarfallamento.

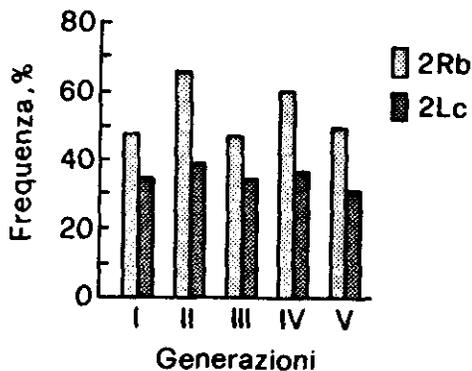


Figura 1

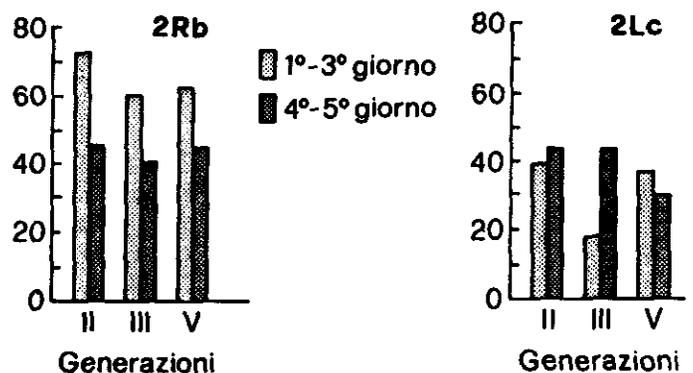


Figura 2

Fig. 1 - Frequenze percentuali degli ordinamenti cromosomici 2Rb e 2Lc in campioni di alate femmine appartenenti a cinque generazioni successive di un ceppo di laboratorio di Anopheles stephensi.

Fig. 2 - Frequenza degli ordinamenti 2Rb e 2Lc in campioni di alate femmine appartenenti a tre generazioni di laboratorio di un ceppo di Anopheles stephensi. Ogni campione è stato suddiviso in due sottocampioni secondo il periodo di farfallamento: sfarfallamento precoce (1°, 2° e 3° giorno) e sfarfallamento tardivo (4° e 5° giorno).

Conclusioni

Sembra, in conclusione che entrambi i polimorfismi abbiano valore adattativo in condizioni di laboratorio. Tuttavia, i due polimorfismi sembrano avere un significato diverso infatti mentre il 2Rb/+ è soggetto al fenomeno dell'eccesso di eterozigoti, come già notato per altre specie di Anopheles (4) il 2Lc/+ non presenta mai questo fenomeno, almeno nelle nostre condizioni di allevamento. Inoltre l'ordinamento 2Rb, contrariamente al 2Lc, ha mostrato una chiara relazione con i tempi di sviluppo larvale in accordo con quanto già precedentemente mostrato da Coluzzi (5). E' stata osservata infatti una frequenza più elevata di questo ordinamento tra le alate che, a parità di schiusa hanno uno sviluppo preimaginale più rapido. Quest'ultima osservazione potrebbe fornire la spiegazione delle forti oscillazioni osservate per l'ordinamento 2Rb nelle successive generazioni di laboratorio. E' infatti possibile ammettere che le oviposizioni da cui si è originata ciascuna delle nostre generazioni non siano state rappresentative di tutta la generazione parentale presente nella gabbia di allevamento ma siano provenute soprattutto da alate sfarfallate per prime quando si è registrata una frequenza dell'ordinamento 2Rb più elevata e da alate sfarfallate più tardi quando viceversa si è registrata una frequenza del 2Rb più bassa.

BIBLIOGRAFIA

1. COLUZZI, M., CANCRINI, G. & DI DECO, M.A. 1970. The polytene chromosomes of Anopheles superpictus and relationships with Anopheles stephensi. Parassitologia, 12: 101-112.
2. COLUZZI, M., DI DECO, M. & CANCRINI, G. 1973. Chromosomal inversions in Anopheles stephensi. Parassitologia, 15: 129-136.
3. COLUZZI, M. & DI DECO, M. 1974. Cage experiments on homospecific and heterospecific matings with females of Anopheles stephensi carriers of different inversion karyotypes. Atti Accad.naz.Lincei Rc., 57: 683-689.
4. DI DECO, M.A., PETRARCA, V., VILLANI, F. & COLUZZI, M. 1979. Polimorfismo cromosomico da inversioni paracentriche ed eccesso degli eterocariotipi in ceppi di Anopheles allevati in laboratorio. Parassitologia, 22: 304-306.
5. COLUZZI, M. 1972. Inversion polymorphism and adult emergence in Anopheles stephensi. Science, 176: 59-60.

COMPORAMENTO DI PUNTURA E DI RIPOSO DI ANOPHELES MELAS E DEI SUOI VARIANTI CROMOSOMICI

J.H. Bryan (a), V. Petrarca (b), M.A. Di Deco (b) e M. Coluzzi (b)

(a) Medical Research Council, The Gambia; attualmente University of Sydney, Australia

(b) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza"

Summary (Biting and resting behaviour of Anopheles melas and its chromosomal variants).- Sampling of adult female mosquitoes were carried out with different collection methods in villages of The Gambia where An.melas and An.gambiae occur sympatrically. Blood fed mosquitoes were processed for blood meals identification and for polytene chromosomes analysis. An.melas is confirmed to be more zoophilic and exophilic than An.gambiae. Moreover, behavioural heterogeneities are shown within An.melas related to the widespread 2Rn inversion polymorphism.

Anopheles melas è la specie del complesso An.gambiae associata tipicamente con le paludi a mangrovie dell'Africa Occidentale dove le larve, eurialine, si sviluppano generalmente in piccole pozze di acqua salata lasciate dalle alte maree. La distribuzione, essenzialmente costiera, comprende ampie zone di simpatrismo con An.gambiae e, limitatamente alle zone più settentrionali dell'areale, con An.arabiensis. An.melas ha una capacità vettrice inferiore a quella delle specie d'acqua dolce del complesso rispetto alle quali dimostra una relativa esofilia e zoofilia (vedi 1 e 2 per una bibliografia dell'argomento). La disponibilità di caratteri citotassonomici completamente attendibili per la diagnosi delle specie criptiche del complesso gambiae consente osservazioni comparative più precise e indagini su eventuali eterogeneità di comportamento al livello intraspecifico in relazione a polimorfismi cromosomici da inversione che sono presenti non solo nelle specie d'acqua dolce ma anche in An.melas (3 e 4). Le osservazioni oggetto di questa comunicazione, in parte riferite precedentemente (4 e 5) sono state condotte nella Gambia dove An.melas ha una ampia diffusione lungo il fiume omonimo e i suoi affluenti fino ad una distanza dalla costa di oltre 150 km (6). Nella maggior parte delle località si osserva un'associazione di An.melas con An.gambiae mentre la presenza di An.arabiensis è del tutto sporadica. In An.gambiae sono state osservate due popolazioni caratterizzabili cromosomicamente che entrano in contatto nell'area in questione senza intergradare completamente.

Materiale e Metodi

Le indagini sul comportamento di An.melas e dei suoi varianti cromosomici lavoro eseguito nell'ambito di programmi finanziati da C.E.E. e M.P.I.

sono state eseguite principalmente nel villaggio di Mandina Ba, non lontano dalla foce del fiume Gambia e in due piccoli villaggi (Ker Madi e Balingho) presso Farafenni. Sono stati posti a confronto campioni raccolti in parallelo in diverse situazioni o con diversi metodi di cattura come indicato qui di seguito: A) catture diurne in abitazioni umane; B) catture diurne in ricoveri esterni; C) catture diurne in ricoveri per bovini ed equini; D) catture notturne su uomo all'esterno e all'interno; E) catture notturne su bovini all'esterno. Le zanzare ottenute con catture diurne (A, B, C) sono state dissezionate nel pomeriggio dello stesso giorno prendendo in esame solo la frazione del campione che aveva punto la notte precedente e il cui sviluppo ovarico risultava al III-IV stadio di Christophers. Di queste zanzare è stato prelevato il residuo di sangue nell'intestino per l'identificazione dell'ospite mentre le ovaie sono state fissate per la preparazione dei cromosomi politenici. Le zanzare ottenute dalle catture notturne (D, E), molte delle quali digiune, sono state nutrite su pollo durante la stessa notte e mantenute in condizioni climatiche ottimali per favorire un normale sviluppo ovarico fino al III-IV stadio di Christophers e consentire così la preparazione dei cromosomi politenici.

Risultati e Discussione

Le indagini sono state eseguite durante la stagione delle piogge negli anni 1980 e 1981 esaminando complessivamente oltre 12000 zanzare. La frequenza di An.melas è risultata, nei campioni raccolti all'interno delle abitazioni, mediamente del 7% a Mandina Ba e del 40% nella zona di Farafenni. Variazioni altamente significative sono state osservate in ciascuna delle due località in rapporto ai diversi tipi di campionamento. Tali variazioni sono in linea di massima concordanti nel confermare una elevata zoofilia ed esofilia in An.melas (4). In base ai dati relativi all'identificazione del pasto di sangue nei campioni raccolti nelle abitazioni, la tendenza di An.melas a nutrirsi su bestiame sarebbe non più di quattro volte maggiore rispetto a quella di An.gambiae. La differenza tra le due specie risulta tuttavia grossolanamente sottostimata da questo tipo di campionamento in quanto An.melas che punge all'esterno su animali (prevalentemente bovini ed equini) ha una probabilità molto più bassa di An.gambiae di andare a riposare nelle abitazioni umane (endofilia). Infatti le catture eseguite a Ker Madi su animali all'esterno mostrano un rapporto medio di 1 gambiae per 20 melas mentre nel campione positivo per sangue di animali catturato all'interno delle abitazioni nello stesso periodo il rapporto è di 1 gambiae per 0,6 melas. Pertanto se la probabilità di An.gambiae di entrare nelle abitazioni è 1 quella di An.melas risulta essere inferiore a 0,05. Tenendo conto quindi del diverso comportamento endofilo delle due specie, la zoofilia di An.melas sarebbe almeno 10 volte più elevata di quella di An.gambiae come d'altra parte è indicato dalle catture in parallelo su uomo e su bovino.

Questo comportamento zoofilo ed esofilo di An.melas non è tuttavia uniforme prendendo in esame i varianti cromosomici intraspecifici. I campioni esaminati sono risultati polimorfici per 5 diverse inversioni paracentriche, due delle quali molto rare e tutte con frequenze cariotipiche sostanzialmente in accordo con l'ipotesi di una singola unità panmittica nell'area di studio. L'inversione 2Rn è la più frequente e quella più interessante in rapporto alle eterogeneità sopra menzionate. Questa inversione sembra infatti associata in

Tabella 1 - Numero e percentuale dei cariotipi 2Rn in campioni di Anopheles melas ottenuti con diversi metodi di cattura a Ker Madi.

CAMPIONI	TOTALE	$\frac{+^n/+^n}{N \quad \%}$		$\frac{+^n/n}{N \quad \%}$		$\frac{n/n}{N \quad \%}$	
		N	%	N	%	N	%
<u>Catture notturne</u>							
uomo all'interno	225	108	48,00	102	45,33	15	6,67
uomo all'esterno	236	134	56,78	90	38,14	12	5,08
bovino all'esterno	543	270	49,72	222	40,88	51	9,39
<u>Catture diurne nelle abitazioni</u>							
sangue umano	159	81	50,94	69	43,40	9	5,66
sangue animale	152	59	38,82	73	48,03	20	13,16

$$\chi^2_8 = 19,39 \quad P = 0,01$$

qualche modo con una maggiore zoofilia e forse anche con una maggiore endofilia (vedi anche 4 e 5). In particolare i dati raccolti a Ker Madi, riportati nella Tabella 1, indicano una frequenza dei portatori dell'ordinamento 2Rn meno elevata nel campione catturato su uomo all'esterno rispetto al campione catturato su bovino nelle stesse condizioni e questa tendenza risulta chiaramente confermata dal confronto dei campioni catturati nelle abitazioni e separati in rapporto all'identificazione del pasto di sangue. Volendo calcolare su ciascun cariotipo l'indice di puntura su uomo questo risulta pari a 0,58 negli omocariotipi $+^n/+^n$, 0,49 negli eterocariotipi $+^n/n$ e 0,31 negli omocariotipi n/n .

BIBLIOGRAFIA

- GILLIES M.T. & DE MEILLON B. (1968). The Anophelines of Africa South of the Sahara. Publ. of The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- BRYAN J.H. (1983). Anopheles gambiae and An. melas at Brefet, The Gambia, and their role in malaria transmission. Ann. trop. Med. Parasit. 77: 1-12.
- COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. & DI DECO M.A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 73: 483-497.
- BRYAN J.H., PETRARCA V., DI DECO M.A., COLUZZI M. (1981). Osservazioni su Anopheles melas nella Gambia e zone limitrofe. Parassitologia, 23: 136-139.
- BRYAN J.H., PETRARCA V., DI DECO M.A. & COLUZZI M. (1984). Mosquito behaviour studies in The Gambia, West Africa. In: Proc. of Conference in Honour of R.H. Black. Sydney, February, 1983. Australian Government Publishing Service, Canberra, 1984, 157-160.
- BRYAN J.H., DI DECO M.A., PETRARCA V. & COLUZZI M. (1982). Inversion polymorphism and incipient speciation in Anopheles gambiae s.str. in The Gambia (West Africa). Genetica, 59: 167-176.

Sessione II

VALIDITA' DI UN TEST EIA NELLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI IgG ANTI-TOXOPLASMA NELLA PREVENZIONE PRECONCEZIONALE

E. Rigoli, M. Vianello

Servizio di Microbiologia, Ospedale Regionale, Treviso

Riassunto - Nell'attuale diagnostica preventiva di infezione toxoplasmica materno-fetale è importante disporre di metodi di screening di massa, da utilizzare nelle donne fertili in fase pre-gravidica. Tra le tecniche diagnostiche è migliore quel test capace di discriminare i più bassi, ma sicuri titoli anticorpali. Si è preso in considerazione un test del commercio (ETI-TOXOK) e si riferiscono prove volte ad utilizzarlo in modo migliore nella area "border-line".

Summary

Sierological screening methods are a very important tool for prevention of congenital toxoplasmosis when employed in fertile women before pregnancy.

The methods able to detect the lowest, however quite sure, anti-toxoplasma antibody levels are to prefer for this purpose.

We report our evidences regarding a new commercial kit (ETI-TOXOK) and its employment in border-line range.

Introduzione

L'infezione da T.gondii è una delle più diffuse nell'uomo e negli animali, essa interessa secondo le statistiche il 25-75% e oltre della popolazione adulta sana.

Allo stato attuale la diagnosi di infezione toxoplasmica è compito del laboratorio e può essere posta con :

- metodi diretti che comprendono isolamento e identificazione del protozoo dal materiale biologico
- metodi indiretti a) immunologici (siero-umorali, cellulari)
b) istologici

In Italia, come in altri paesi, la diagnosi è fondamentale

sierologica e i campi di applicazione sono:

- nelle donne fertili: a) profilassi preconcezionale
b) controllo durante la gravidanza
- nei neonati: toxoplasmosi congenita
- nei soggetti di ogni età: toxoplasmosi acquisita

Il ridotto interesse per la patologia dell'adulto, unito ad una più reale valutazione del rischio di infezione nella donna in gravidanza, hanno spostato l'interesse del microbiologo verso la toxoplasmosi materno-fetale e sua prevenzione. Ciò si è tradotto nell'attuale aumento di richieste di esami sierologici per la profilassi gravidica ponendo la necessità di adottare sistemi di screening di massa in grado di rispondere a queste esigenze, di accertare prioritariamente cioè se esiste o meno uno stato acquisito di immunizzazione.

E' noto che un test di screening deve possedere:

- buona specificità
- buona sensibilità per rilevare i più bassi, ma sicuri, livelli anticorpali, dovendosi evitare i falsi positivi non più correggibili
- buona riproducibilità del dato
- semplicità tecnica, basso costo.

Allo scopo di identificare nell'ambito delle tecniche diagnostiche, quelle più adatte a rilevare i più bassi contenuti di IgG specifiche, viene preso in esame il test immunoenzimatico EIA. Il fine è di valutare il grado di rilevamento del metodo, nel limite inferiore, delle unità sicuramente protettive che oggi è attestato per le tecniche siero-immunologiche più comuni ancora intorno alle 30 U.I./ml. Capacità di identificazioni più basse si riconoscono solo per il dye-test, non usato di routine.

EIA è una tecnica lineare standardizzabile, più sensibile e più specifica delle tecniche end-point, mentre precisione ed accuratezza sono identiche a quest'ultime.

Materiali e Metodi

Nel nostro Laboratorio da tempo è in uso, il sistema EIA prodotto dalla Ditta Sorin Biomedica (ETI-TOXOK). L'esecuzione del test prevede la diluizione dei campioni 1:5000, e lettura dei risultati contro una curva di taratura costruita con una serie di standard da 15 a 1500 U.I./ml (TOXO-STD-SET). Accanto a ETI-TOXOK IgG è eseguito di routine il test di agglutinazione diretta (A.D.) per completamento e conferma del dato. Quando i risultati appaiono discordanti o non correlati il riferimento è fatto con IFA e Dye-Test.

Nel corso degli esami compiuti, è apparso evidente che il test, eseguito secondo la procedura analitica suggerita dalla ditta produttrice, mentre è correlato per i valori medio-alti, crea problemi nell'area bassa della curva, indicando unità EIA superiori al reale titolo anticorpale ovvero dando qualche falso negativo in confronto con il dye-test.

L'idea di poter migliorare le possibilità di questo metodo

immunoenzimatico nell'area bassa, si è intuita quando, per motivi di ordine pratico (l'occasionale esaurimento dei reattivi del TOXO STD-SET per costruire la curva 15-1500 U.I./ml), si è eseguito il test allestendo una curva di taratura con 3 punti dati dal controllo positivo (150 U.I./ml) e il controllo negativo forniti dalla ditta e 1 punto intermedio (30 U.I./ml) ricavato da questi, ottenendo una espansione della curva nella parte medio-bassa dei valori. Ciò ci ha indotto a ritenere dopo consigli ed accordi con il gruppo di Ferrara, pervenuti per altre vie alla stessa conclusione, che si sarebbe ottenuta una maggiore differenziazione dei campioni "border" variando non solo la curva standard ma anche il fattore di diluizione dei sieri da esaminare 1:500.

Questi accorgimenti avrebbero consentito di migliorare la sensibilità del metodo con conseguente maggiore discriminazione dei sieri nell'area border-line, senza variazione della specificità.

In pratica e in accordo con gli altri operatori dell'indagine policentrica, la procedura analitica al termine della sua modifica prevedeva diluizione dei sieri in esame 1:500 (anzichè 1:5000) e lettura contro una curva standard ai punti 15, 30, 75, 150 U.I./ml. I campioni che fossero risultati fuori scala sarebbero stati ritestati dopo opportuna diluizione con siero sicuramente negativo.

Si è concordata la raccolta di 91 sieri opportunamente selezionati nei centri di Treviso, Ferrara, Palermo con concentrazioni definite "border" di IgG anti-toxoplasma (10-30 U.I./ml) con le seguenti metodiche: IFA, AD, Dye-Test.

Tutti i campioni sono stati esaminati in cieco.

I risultati complessivi dell'indagine saranno oggetto di una nota cumulativa, qui vengono riferiti solo i dati del centro di Treviso ritenuti significativi per la loro omogeneità e correlazione.

Risultati

Il confronto delle curve di riferimento ottenute con la tecnica operativa fornita dalla ditta e quella qui proposta è espresso nelle figure 1-2 in cui in ordinata è riportata la densità ottica (D.O.) a 492 nm. e in ascissa la concentrazione degli standard espressa in U.I./ml.

Più in dettaglio, se consideriamo la D.O. come parametro costante nei due diagrammi, si osserva che nella figura 1, nell'ambito del range di D.O. 0,100-1,000 si distribuiscono i valori fino a 400 U.I./ml, mentre nel grafico 2 a D.O.=1,000 corrispondono 65-70 U.I.

Per questa diversa sensibilità, nella curva costruita sugli standard 15-1500 U.I./ml, modeste differenze di D.O. comportano specie nell'ambito basso: 1) non completa riproducibilità degli standard; 2) notevoli variazioni di concentrazione e quindi di significato tra i campioni in esame.

Il notevole ampliamento della curva ottenuto con la diluizione 1:500 si traduce invece in più sicura differenziazione nello

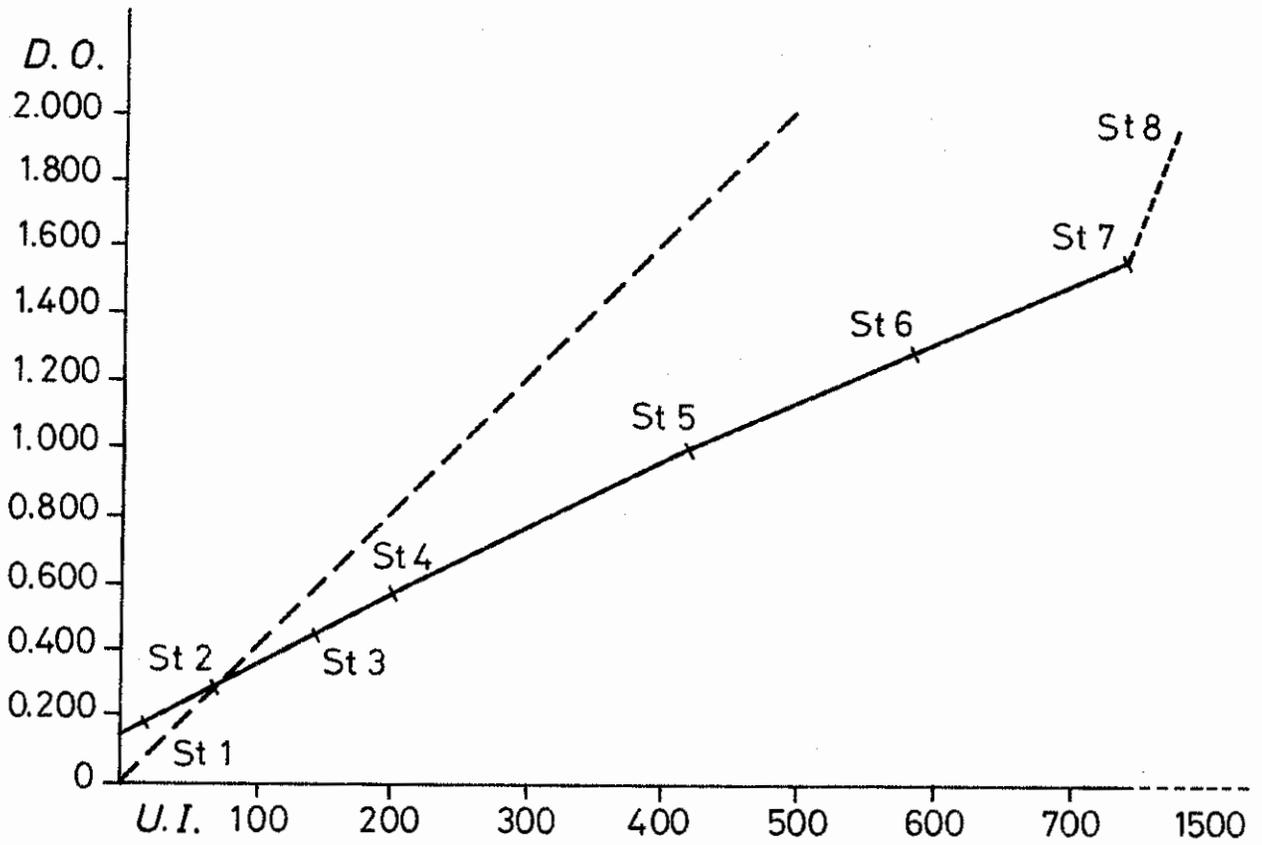


Fig. 1 - Curva di taratura con diluizione 1:5000

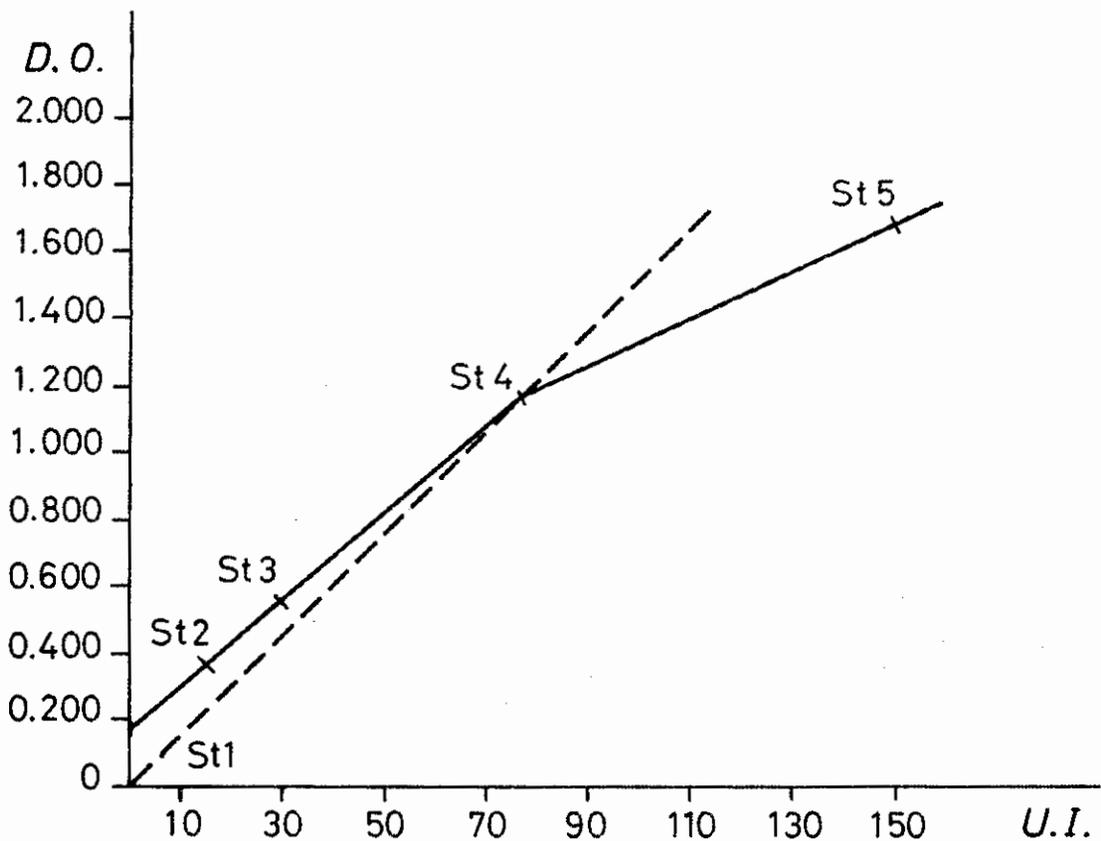


Fig. 2 - Curva di taratura con diluizione 1:500

ambito dei valori bassi dove maggiormente necessita l'attendibilità del dato e dove viene a cadere la maggior parte dei titoli presenti nella popolazione sana/protetta.

Per meglio valutare la modifica proposta al metodo abbiamo analizzato la riproducibilità inter-assay sui sieri standard di 8 sedute di cui vengono riportati i risultati nelle tabelle 1-2

Tabella 1 - Controllo between run scala 1:5000
(valori D.O. x 1000)

	Negat.	15 U.I.	70 U.I.	140 U.I.	200 U.I.
Media	144.37	202.75	298.02	482.13	589.53
Dev.st.	20.23	45.50	53.31	62.82	92.96
C.V.	14.01	22.44	17.89	13.03	15.77

Tabella 2 - Controllo between run scala 1:500
(valori D.O. x 1000)

	Negat.	15 U.I.	75 U.I.	150 U.I.
Media	180.03	323.12	1135.03	1715.24
Dev.st.	22.74	45.60	139.05	236.87
C.V.	12.63	14.12	12.24	13.81

Nella tabella 1 la riproducibilità appare piuttosto scarsa soprattutto per i valori intorno al cut-off che presenta un coefficiente di variazione (C.V.) molto elevato.

Nella tabella 2 i C.V. appaiono accettabili per tutti i punti della scala; si osserva inoltre una più netta distinzione di D.O. fra tutti gli standard in particolare fra negativo e standard 15 U.I.

L'applicazione pratica della diluizione 1:500 è stata verificata con l'esame dei 91 sieri "border" dei quali riportiamo i risultati (tabella 3-4) facendo il confronto con IFA e Dye Test (test di riferimento).

Tabella 3 - Valori in U.I. dei 91 sieri testati con le varie metodiche

TECNICA usata	VALORI POSITIVI			VALORI NEGATIVI	
	n°sieri	RangeU.I./ml	Val.medio	n°sieri	RangeU.I./ml
Dye Test(Ig totali)	71	7-31	20.11	20	<7
EIA(IgG)	70	15-70	33.49	21	<15
IFA(Ig totali)	73	15-63	20.8	18	<15

Tabella 4 - Confronto kit ETI-TOXOK con i test di riferimento (Esperienze di Treviso)

EIA vs. DYE TEST		EIA vs. IFA	
+	+ = 68	+	+ = 69
-	+ = 3	-	+ = 4
-	- = 18	-	- = 17
+	- = 2	+	- = 1
SENSIBILITA' = 95.6 %		SENSIBILITA' = 94.2 %	
SPECIFICITA' = 88.8 %		SPECIFICITA' = 94.1 %	

Discussione

Dall'esperienza del laboratorio di Treviso il test EIA (ETI-TOXOK), eseguito secondo i criteri previsti per una più ampia distinzione nell'ambito dei titoli deboli di IgG specifiche (diluizione dei sieri 1:500 e curva fino a 150 U.I./ml) ha fornito buoni risultati in assoluto e in confronto con i test di riferimento, tale da essere proficuamente utilizzato come test di screenig.

Ci sembra tuttavia sempre consigliabile, secondo i principi generali dell'indagine di massa, abbinare al test EIA un altro test per un confronto reciproco, che per nostra esperienza, identifichiamo con l'agglutinazione diretta nelle sue varie modalità di impiego.

BIBLIOGRAFIA

- 1 -FERRUCCI M., RIGOLI E., CASTELLETTO M.-Situazione attuale della diagnostica della toxoplasmosi in Italia.
Atti del Workshop sulla toxoplasmosi svoltosi nel I° Congresso Europeo di Microbiologia Clinica, Bologna, 17-21 ottobre 1983.
Monografie di Microbiologia Medica, E.Rigoli Editore, 1984, pag. 47-62.
- 2 -McLAREN M.L., LILLYWHITE J.E., ANDREW A.U.-Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); practical aspects of standardization and quality control.
Med.Lab.Sci., 38, 245-251, 1981.
- 3 -WOODWARD B.C.-Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay specific for human immunoglobulin G as a screenig test for detecting anti-toxoplasma antibodies.
J.Clin.Microbiol., 16:367-372 (1982).

INFEZIONE ACCIDENTALE DA CRYPTOSPORIDIUM SP. NELL'UOMO IN LABORATORIO : SEGNA-
LIZIONE DI UN NUOVO CASO

S. Visconti (a), G. Canestri-Trotti (a) & S. Pampiglione (b)

(a) Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria (Facoltà di
Medicina Veterinaria), Università di Bologna

(b) Cattedra di Parassitologia (Facoltà di Medicina Veterinaria), Università di
Bologna

Riassunto.- Si descrive un caso d'infezione da Cryptosporidium sp. occorso acci-
dentalmente in laboratorio in uno degli autori in cui si é potuto confermare la
diagnosi anche mediante l'infezione sperimentale di topini a partire da oocisti
eliminate dal paziente.

Summary (An accidental laboratory infection in man with Cryptosporidium sp.: a
new case report).- The authors report an accidental laboratory infection of one of
the authors with Cryptosporidium sp. The diagnosis has been proved with experimen-
tal infection of mice using oocysts eliminated from the patient.

Introduzione

I protozoi del genere Cryptosporidium hanno acquisito improvvisa notorietà
in questi ultimi anni, dopo che alcuni autori hanno incominciato a riconoscerne
il ruolo patogeno nelle diarree neonatali bovine (1) ed ora sono considerati cau-
sa di diarrea in numerose specie animali, uomo compreso.

Il primo caso umano di criptosporidiosi é stato osservato negli Stati Uniti
nel 1976 (2) e ad esso, hanno fatto seguito, fino all'ottobre 1983 le segnalazio-
ni di altri 95 casi di cui 1 anche in Italia (3,4).

Scopo di questa comunicazione é quello di riferire su di un caso di infezio-
ne da Cryptosporidium sp. occorso accidentalmente in laboratorio, in persona in
buona salute (uno degli autori), in cui si é confermata la diagnosi anche con una
infezione sperimentale realizzata in topini a partire da oocisti eliminate dal
paziente.

Materiali e Metodi

La sintomatologia acuta é esplosa in un soggetto di sesso femminile 27enne
dopo circa 52 ore dall'esposizione al possibile contagio (infezione accidentale
durante la preparazione di campioni di feci bovine positive per Cryptosporidium
sp.) ed é stata caratterizzata da : nausea, borborigmi, sonnolenza e dolori addomina-
li molto forti, a crisi di breve durata, senza diarrea. Al 2° giorno si é manifestato
un attacco di diarrea acquosa ed essendosi subito sospettato un nesso tra diarrea

e manipolazione di feci contenenti oocisti di Cryptosporidium sp., si é proceduto ad un esame delle feci e della formula leucocitaria, dove si é rilevata una modica neutrofilia. Tra il 2° e il 3° giorno si é osservato un lieve rialzo febbrile (37,2 °C) durato poche ore ed il persistere dei dolori addominali, sempre a crisi ripetute e molto intense. Alla fine della terza giornata, la sintomatologia diarroica é scomparsa e le manifestazioni dolorose si sono notevolmente attenuate. Al 4° giorno ogni sintomo é scomparso, permanendo solo un lieve stato d'inappetenza, seguito da un breve periodo di costipazione.

Campioni fecali sono stati raccolti per 20 giorni a partire da circa 22 ore dall'inizio della sintomatologia e da circa 74 ore dalla presunta infezione.

I campioni fecali sono stati esaminati previa arricchimento per sedimentazione e flottazione con liquido di Sheather e realizzazione di strisci di materiale fecale, arricchito per sedimentazione, colorati con metodi di Ziehl-Neelsen modificato ed Heine.

I campioni positivi, addizionati a bicromato di potassio al 2,5% e conservati a 4°C per 103 giorni (5), sono stati impiegati per le prove d'infezione sperimentale in topini. Tale materiale, al momento dell'utilizzazione, é stato sottoposto a 3 ripetuti lavaggi in acqua e 0,1 ml di sedimento fecale é stato somministrato per via orale a 5 topini, appena divezzi, di una stessa nidiata, risultati fino ad allora coprologicamente negativi per oocisti di Cryptosporidium sp. Ugualmente negativi sono risultati la madre ed altri 2 topini della stessa nidiata che sono stati tenuti di controllo. Tutti i topini sono stati esaminati coprologicamente 2 volte al giorno e 7 giorni dopo l'inoculazione sono stati sacrificati. Gli intestini, dal duodeno al retto, sono stati immediatamente fissati in formalina tampognata e con essi si sono allestiti preparati istologici.

Risultati

Sono risultati positivi per oocisti di Cryptosporidium sp. i campioni di feci del soggetto colpito prelevati dal 2° al 7° giorno dalla comparsa dei sintomi e cioè dal 1° giorno di manifestazioni diarroiche; rare oocisti si sono reperite nei campioni dall'8° al 14° giorno e negativi i campioni successivi.

Dei topini infettati sperimentalmente, 4 sono risultati positivi per oocisti di Cryptosporidium sp. comparse nelle feci dopo 3 giorni dal pasto infettante, fino alla soppressione. Uno dei 5 topini infettati é morto circa 40 ore dopo il pasto infettante. Gli esami coprologici nei topini di controllo e nella madre si sono mantenuti negativi per tutta la durata delle prove. Gli esami istologici sono risultati positivi per 4 dei 5 topi infettati, mentre in quello morto dopo 40 ore e nei topi di controllo sono risultati negativi.

Discussione

Questo caso non si é discostato sostanzialmente nel suo decorso da quello osservato in precedenza nel nostro Istituto (4) e sembra anche avere notevoli analogie, per quanto riguarda le manifestazioni cliniche, con quanto riferito da altri autori, che hanno segnalato casi simili in persone immunocompetenti (6,7,8).

L'infezione acquisita da materiale di provenienza bovina e trasmessa a topi, conferma la scarsa specificità di questo protozoo, almeno nei mammiferi (9). L'avvenuta infezione, malgrado le norme di precauzione igieniche abituali, seguite dal soggetto colpito, durante la manipolazione dei campioni fecali di bovini infetti,

dimostra l'estrema facilità di contagio ed impone, per chi lavora in laboratorio con tale parassita, estrema attenzione.

BIBLIOGRAFIA

1. POHLENZ, J. MOON, H.W. CHEVILLE, N.F. & BEMRICK, W.J. 1978. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. J.Am.vet.med.Ass. 172: 452-457.
2. NIME, F.A. BUREK, J.D. PAGE, D.L. HOLSCHER, M.A. & YARDLEY, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan Cryptosporidium. Gastroenterology 70: 592-598.
3. NAVIN, T.R. & JURANEK, D.D. 1984. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic and parasitologic review. Rev.infect.Dis. 6: 313-327.
4. CANESTRI-TROTTI, G. 1982. Criptosporidiosi. Boll.epidem.Naz. 82/42.
5. SHERWOOD, D. ANGUS, K.W. SNODGRASS, D.R. & TZIPORI, S. 1982. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. Infect.Immun. 38: 471-475.
6. ANDERSON, B.C. DONNDELINGER, T. WILKINS, R.M. & SMITH, J. 1980. Cryptosporidiosis in a veterinary student. J.Am.vet.med.Ass. 180: 408-409.
7. BLAGBURN, B.L. & CURRENT, W.L. 1983. Accidental infection of a researcher with human Cryptosporidium. J.infect.Dis. 148: 772-773.
8. CURRENT, W.L. REESE, N.C. ERNST, J.V. BAILEY, W.S. HEYMAN, M.B. & WEINSTEIN, W.M. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental infection. New.Engl.J.Med. 308: 1252-1257.
9. LEVINE, N.D. 1984. Taxonomy and review of coccidian genus Cryptosporidium (Protozoa, Apicomplexa). J.Protozool. 31: 94-98.

PNEUMOCYSTIS CARINII AU MICROSCOPE OPTIQUE.
INTÉRÊT DE LA COLORATION DE CHALVARDJIAN ET GRAWE

P. Marty et Y. Le Fichoux

Parasitologie et Mjologie, Faculte de madecine, F - 06 034 - Nice Cédex

RESUME : La fréquence de la pneumonie à Pneumocystis carinii est liée au nombre croissant de patients immunodéprimés. Nous réalisons le diagnostic de certitude par la coloration de Chalvardjian et Grawe après prélèvement par lavage broncho-alvéolaire.

SUMMARY : Incidence of Pneumocystis carinii pneumonia is actually higher. This fact is related to the more frequent patients with immunodeficiency. The Chalvardjian and Grawe stain after bronchopulmonary lavage is our method of direct positive diagnosis.

INTRODUCTION

La place taxonomique de Pneumocystis carinii, Delanoë et Delanoë 1912, est encore mal définie. La majorité des auteurs pense que c'est un protozoaire qui vit habituellement dans l'alvéole pulmonaire de nombreux mammifères. La baisse de l'immunité permet sa multiplication et le rend pathogène.

En pathologie humaine, Pneumocystis carinii occupe une place de plus en plus importante en raison du nombre croissant de malades immunodéprimés (3). La population à risque est constituée par les nouveaux nés prématurés, les déficits immunitaires congénitaux, surtout les cancéreux sous chimiothérapie ou radiothérapie, récemment les sujets atteints de S.I.D.A.

Le diagnostic de présomption est, en général sur un terrain à risque, l'apparition d'une insuffisance respiratoire progressive avec à la radiographie un infiltrat réticulo-nodulaire bilatéral prédominant aux hiles.

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite qui se présente sous deux formes :

- des formes à paroi mince que certains appellent "trophozoïtes" de très petite taille (2μ de diamètre). Elles sont très difficilement identifiables dans un but diagnostique.
- des formes à paroi épaisse ou kystes dont il existe plusieurs aspects. C'est la mise en évidence de ces kystes qui permet le diagnostic.

LE PRELEVEMENT

La mise en évidence des kystes est conditionnée par la qualité du prélèvement. Tous les auteurs s'accordent pour considérer le lavage bronchoalvéolaire comme la technique la plus adaptée. La biopsie pulmonaire donne également de bons résultats mais n'est pas toujours réalisable. Quant aux expectorations ou à l'aspiration bronchique il est illusoire de vouloir y rechercher le parasite (2). Le prélèvement sera traité différemment s'il s'agit de biopsies ou de liquides. Pour les biopsies, on séparera deux fragments. L'un destiné à l'examen histologique montre dans les cas positifs une alvéolite spécifique avec exsudats en nid d'abeille ; avec l'autre fragment on pratique des appositions sur lame. Pour les liquides de lavage, après centrifugation à 2500 tours/mn pendant 5mn, on dépose le culot sur lame et on laisse bien sécher avant fixation.

L'IDENTIFICATION

Nous avons comparé les différentes techniques d'identification pour déterminer la plus fiable, la plus facile et la plus rapide d'exécution (6). Dans ce but nous provoquons selon le protocole de MOJON (5) une maladie expérimentale chez le rat blanc par injection d'acétate d'hydrocortisone à la dose de 125 mg/kg, 2 fois par semaine pendant 8 semaines avec addition à l'eau de boisson d'oxytétracycline à la dose de 50 mg/100 ml d'eau.

Parmi les techniques décrites nous retenons :

- la coloration de CHALVARDJIAN et GRAWE (1) dont nous rappelons la réalisation :

Matériel

Le Réactif de sulfatation

On prépare du Wet Ether à partir de 25 ml d'éther sulfurique et de 10 ml d'eau déminéralisée dans une ampoule à décanter. Après agitation vigoureuse la séparation en deux phases s'effectue. Après élimination de la phase aqueuse et de quelques ml de phase éther, on obtient le Wet Ether. On dispose 25 ml de Wet Ether dans un récipient placé dans de la glace pilée et on laisse filer très lentement le long d'une baguette de verre 25 ml d'acide sulfurique concentré. On obtient ainsi le réactif de sulfatation qui se conserve plusieurs mois à +4°C dans un flacon bien clos.

La solution de Bleu de Toluidine O comprend :

Bleu de Toluidine O pulvérisé	32 mg
Eau déminéralisée	60 ml
Acide chlorhydrique 1 N	2 ml
Alcool absolu	140 ml

Méthode : On colore en même temps une lame témoin positif

Formol à 10 % fixation	10 mn
Réactif de sulfatation	5 mn

Eau courante - lavage	3 mn
Bleu de Toluidine O	3 mn
Alcool isopropylique	3 bains rapides
Xylène	2 bains

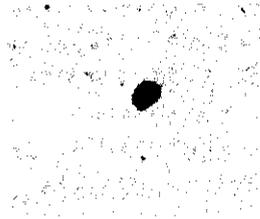
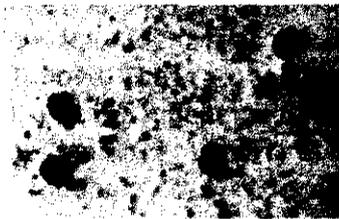
Montage au Baume du Canada

Après repérage à l'objectif 40, c'est à l'objectif 100 (x1000) que l'on visualisera les 2 types de kystes de couleur violet pourpre sur un fond bleu. Certains sont bien ronds avec une zone plus sombre, d'autres sont plus ovalaires en cupule ou en croissant (cf. photo). Les différences morphologiques sont également observées avec les techniques d'imprégnation argentique comme celle de GOMORI-GROCOTT (4) et ses dérivés (7).

CONCLUSION

Le diagnostic de la pneumonie à Pneumocystis carinii repose sur un prélèvement de qualité à partir de lavages alvéolaires ou éventuellement de biopsies pulmonaires.

Nous le réalisons à partir de la coloration de CHALVARDJIAN et GRAWE qui est fiable et facilement réalisable.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - CHALVARDJIAN (A.M.), GRAWE (L.A.). A new procedure for the identification of Pneumocystis carinii cysts in tissue sections and smears. J. Clin. Pathol. 1963, 16, 383-384.
- 2 - DREW (W.L.), FINLEY (T.N.), MINTZ (L.), KLEIN (H.Z.). Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia by bronchopulmonary lavage. J.A.M.A., 1974, 230, 713-715.
- 3 - EXCLER (J.L.), MOJON (M.). Quand faut-il penser à Pneumocystis carinii ? Cahiers Médicaux, 1982, 7, 1225-1228.
- 4 - GROCOTT (R.G.). A stain for Fungi in tissue sections & smears (using Gomori's Methenamine Silver Nitrate Technique). Am.J.Clin.Pathol., 1955, 25, 975-979.
- 5 - MOJON (M.). Introduction à l'étude de la pneumonie à Pneumocystis carinii. Thèse Médecine, Lyon, 1971, n° 247, 157 p.
- 6 - MARTY (P.), DELLAMONICA (P.), LE FICHOUX (Y.), BERNARD (E.), PAGLIARDINI (G.), VILLEVIEILLE (J.). Pneumocystis carinii, Delanoë & Delanoë 1912, en microscopie optique. Les différentes techniques d'identification. Ann.Parasitol.Hum.Comp. 1981, 56, 363-374.
- 7 - MUSTO (L.). Ten minutes silver stain for Pneumocystis carinii & Fungi in tissue sections. Arch. Pathol. Lab. Med., 1982, 106, 292-294.