ISSN–0391–1675
ISTISAN 86/11

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Metodi di campionamento e montaggio dei flebotomi (Diptera: Psychodidae)

M. Maroli, A. M. Fausto

Laboratorio di Parassitologia

Con riassunto in: inglese, francese, spagnolo e arabo

Roma, marzo 1986

M. MAROLI, A.M. FAUSTO. Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae): methods for sampling and mounting.

Summary - The present report is intended to be a pratical guide for field workers involved in studies on sandflies (Diptera, Psychodidae). Some morphological characters and biological aspects od sandflies and their medical importance are reported in the introduction.
The report is divided in three Chapters: the first one deals with sampling methods of adults and includes three sections: hand collections, traps without attractives and traps using attractives. For each section purposes and limitations of the sampling methods reported are listed.
In the first section, different types of test tubes, killing tubes and various hand and electic aspirators are described.
The second section of the Chapter covers the most useful traps without attractives such as oiled papers, Malaise trap, window traps. Catches in animal burrows and pyrethrum spray catches are also described in that section.
The third section deals with sampling technique using an attractive, such as animal hosts, artificial light or CO_2. Different baited traps (Disney trap, tent trap and two types of rodent-baited traps) are reported. Among the traps using artificial light, as attractive, CDC miniature light traps, New Jersey, Monks Wood and chemical light traps are described together with traps using CO_2.

The second Chapter deals with the identification of sandly breeding sites and reports four main methods to collect sandfly larvae: observation under the microscope,flooting and Macfadyen techniques (as direct methods) and emergence traps in the field or in the laboratory (as indirect methods) are described.

The third Chapter covers the main methods for preserving and mouting phlebotomine sandflies.

M.MAROLI, A.M. FAUSTO. Les Phlébotomes (Diptera, Psychodidae): méthodes d'echantillonage

Résume - Le présent rapport a été redigé comme un guide pratique pour les chercheurs qui sont engagés dans les études des phlébotomes (Diptera, Psychodidae) sur le terrain.
Quelques caractères morphologiques et notes biologiques de meme que l'importance médicale des phlébotomes sont résumés dans l'introduction. Le rapport comprend trois chapitres. Le chapitre premier est dedié aux méthodes d(echantillonnage des phlébotomes adults. Il est divisé en trois Paragraphes: les captures manuelles; les captures aux piéges "sans attractif" et les captures qui utilisent des"attractifs". Pour chaque Paragraphe sont enumerées les buts et les limites des diverses méthodes de capture décrites dans le chapitre.
Dans le premier Paragraphe sont déscrits divers échantillonnages utilisés pour la capture manuelle et des modéles d'aspirateur-nasse et d'aspirateurs électrique. Le second Paragraphe comprend les papiers adhésifs, le piège type Malaise et le piège type fenêtre. Dans le même Paragraphe est décrite la méthode de capture par le pyrethrum. Le troisième Paragraphe décrit les pièges qui utilisent divers types d'attractif: des appâts animaux (rougeurs) utilisée pour le piége type "Disney". L'homme même peut être un appât pour le piège-moustiquaire. Dans le même Paragraphe est décrite la capture aux pièges lumineux et à CO_2.
Le second chapitre du rapport parle de l'identification des gîtes larvaires. Quatre types de méthodes sont décrits: la recherche directe des larves ou microscopie; la méthode de flottaison; la tecnique de Macfadyen et la méthode de sortie observée sur le terrain et au laboratoire. Dans le trosième chapitre sont décrites les méthodes de conservation et de montage des phlébotomes.

M.MAROLI Y A.M.FAUSTO. Métodos de muestreo de los flebotomos (Diptera, Psychodidae)

Resumen- En el presente informe se describen las técnicas más comunmente usadas en el muestreo de los Flebotomos (Diptera, Psychodidae). Una parte viene dedicada a los métodos de conservación y preparaciòn de las muestras para la identificación de la especie.
Precede una reseña introductiva sobre algunas características morfològicas y biológicas de los Flebotomos, sobre la importancia médica y las dificultades que se encuentran en la captura, dada la fragilidad y pequeñez de estos insectos. Subrayamos el rol que han tenido las escuelas Europeas y Sudamericanas de Entomologia, poniendo a punto las técnicas de muestreo de estos pequeños.El premier capítulo se divide en tres partes: métodos de captura manual, con trampas simples y trampas con "atractivo". En lo que concierne los métodos de captura manual se enumeran diferentes tipos de provetas, aspiradores a boca y eléctricos. Entre los métodos de captura que no se valen de "atractivo" se mencionan las trampas aderentes, ampliamente usadas, y las trampas sin aderent particularmente usadas en madrigueras de roedores.Mencionamos también las trampas con reparo artificial (Malaise trap, captura al piretro, trampas de entrada y salida) que pueden ser facilmente usadas para la captura de Flebotomos. La trampas con "atractivo" disfrutan la acciòn del cebo, sea animal, luz artificial o de CO_2. En el primer caso se describe la trampa "Disney", la trampa a embudo y la trampa tienda. La trampas luminosas pueden ser asociadas a trampas aderentes o aspiradores eléctricos como la trampa CDC, New Jersey y Monks Wood. El CO_2 sòlido o gaseoso puede asociarse a la trampa adesiva o luminosa. En cada una de las partes en las que se divide el primer capítulo (captura manual, trampas con y sin atractivo) se ha discutido el empleo y los límites de los métodos descritos.
El segundo capitulo se dedica a la identificación de los focos larvarios, y se divide en métodos directos e indirectos (observación al microscopio, flotación y técnica de Macfadyen). El tercer capítulo trata la conservación y el montaje de los ejemplares, además de la descripción de algunos métodos de preparaciones permanentes en balsamo de Canadà, en goma al Cloralio, en alcohol polivinílico y en llquido de Faure; para los preparados de rutina se describen, el montaje en llquido de Marc Andre y Cloralatofenol.

م. مارولى ، أ.م. فاوستو

ذبابة الرمل :

طرق أخذ العينات وتثبيتها :

ملخص : التقرير المقدم قصد به أن يكون دليلا عمليا للعاملين فى الحقل ممن يشتغلون بالدراسات الخاصة بذباب الرمل .

وفى المقدمة ذكرت بعض الخصائص المورفولوجيه والنواحى البيولوجيه لذباب الرمل مع عرض لأهميته من الناحية الطبية .

وينقسم التقرير الى ثلاثة أبواب يتناول الباب الأول طرق جمع العينات من الذباب البالغ وينقسم هذا الباب الى ثلاثة أقسام : الجمع اليدوى ، الجمع بالمصايد بدون جاذبات ، وبالمصايد مع الاستعانة بالجاذبات .

وقد دُوِّن بكل قسم الاغراض والتحديدات الخاصة بوسائل جمع العينات ويتضمن القسم الاول وصفا للانواع المختلفة من انابيب الاختبار وأنابيب القتل والبخاخات اليدوية والكهربائية المختلفة .

ويختص القسم الثانى بمعظم المصايد المفيدة التى لاتعتمد على استخدام الجاذبات مثل الأوراق المغطاة بالزيوت ، ومصايد ماليزيا ، ومصائد النافذة وفى هذا القسم أيضا شرح لاصطياد هذا الذباب من حجور الحيوانات واصطيادها برزاز البيرثريوم . أما الباب الثالث فيختص بأساليب أخذ العينات باستعمال الجاذبات مثل العوائل الحيوانية (مصيدة ديزنى ، مصيدة الخيمة ، نوعين من المصايد التى تعتمد على القوارض كطعم ، ومن بين المصايد التى تستخدم الضوء الصناعى لجذب الحشرات قُدِم وصف لمصايد س.د.ى س الضوئية المصغرة ، نيوجيرسى ، مونكس وود ، مصايد الضوء الكيماوى بالاضافة الى المصايد التى تستخدم غاز ثانى اكسيد الكربون .

اما الباب الثانى فيشمل التعريف بمواقع تكاثر ذباب الرمل ويتضمن أربعة طرق رئيسية لجمع يرقات ذبابة الرمل ، كما يتضمن وصفا للفحص تحت المجهر وطريقة التعويم وماكفيديان (كطرق مباشرة) ومصايد الطوارئ فى الحقل والمختبر (طرق غير مباشرة) .

ويغطى الباب الثالث الطرق الأساسية لحفظ وتثبيت ذباب الرمل .

*** قام بالترجمة الى اللغة العربية (دكتور / أحمد طلعت عدوى ـ مصر)

INDICE

INTRODUZIONE ..... Pag. 1

CAPITOLO I
METODI DI CAMPIONAMENTO DEGLI ADULTI

A- CATTURE MANUALI ..... " 5

1. Provette ..... " 6

2. Catturatori a bocca ..... " 8

3. Catturatori elettrici ..... " 14

4. Impiego e limitazioni delle catture manuali ..... " 17

B- TRAPPOLE SENZA ATTRATTIVO ..... " 20

1. Catture con trappole adesive ..... " 20

1.1 Carte oleate ..... " 20

2. Catture in tane di animali ..... " 23

2.1 Trappole adesive ..... " 23
2.2 Trappole non adesive ..... " 23

3. Altri tipi di cattura senza attrattivi ..... " 25

3.1 Malaise trap ..... " 26
3.2 Trappole con rampa ..... " 27
3.3 Ripari artificiali ..... " 27
3.4 Catture con piretro ..... " 28
3.5 Trappole di entrata e di uscita ..... " 28

4. Impiego e limitazioni delle trappole senza attrattivi " 29

C- TRAPPOLE CON ATTRATTIVO ..... " 34

1. Catture con esca ..... " 34

1.1 Trappola Disney ..... " 34
1.2 Trappole ad imbuto ..... " 35
1.3 Altri tipi di trappole con esca ..... " 37

2. Catture con trappole luminose ..... " 40

2.1 Trappole luminose con carte oleate ..... " 40
2.2 Trappole luminose con aspiratore ..... " 43
2.2.1 Trappole C.D.C. ..... " 43

2.2.2 Trappola New Jersey ..... Pag. 44
2.2.3 Trappola Monks Wood ..... " 46
2.2.4 Trappole a luce chimica ..... " 46

3. Catture con CO_2 ..... " 47
3.1 Trappole con CO_2 ..... " 47
3.2 Trappole luminose con CO_2 ..... " 49

4. Impiego e limitazioni delle trappole con attrattivi .. " 51

CAPITOLO II

IDENTIFICAZIONE DEI FOCOLAI LARVALI

A- METODI DIRETTI ..... " 55

1. Osservazione diretta al microscopio ..... " 55

2. Flottazione ..... " 56

3. Tecnica del Macfadyen ..... " 57

B- METODI INDIRETTI ... . " 59

1. Trappole di sfarfallamento ..... " 59

2. Sfarfallamento in laboratorio ..... " 61

CAPITOLO III

METODI DI CONSERVAZIONE E MONTAGGIO DEGLI ESEMPLARI

A- TRASPORTO MATERIALE VIVO ..... " 62

B- CONSERVAZIONE ESEMPLARI ..... " 63

C- TECNICHE DI MONTAGGIO ..... " 64

1. Preparati permanenti ..... " 64

1.1 Montaggio in balsamo del Canadà ..... " 64
1.2 Montaggio in gomma al Cloralio ..... " 66
1.3 Montaggio in liquido di Faure ..... " 66
1.4 Montaggio in alcool Polivinilico ..... " 67

2. Preparati non permanenti ..... " 67

2.1 In liquido di Marc André ..... " 68
2.2 In clorallattofenolo ..... " 68

BIBLIOGRAFIA ..... " 70

INTRODUZIONE

I flebotomi sono ditteri della famiglia Psychodidi e sono caratterizzati dalla presenza di una fitta peluria sul capo, torace, addome ed ali (fig. 1). Sono insetti di piccole dimensioni raggiungendo pochi millimetri di lunghezza, variabile tra 2 e 4 mm a seconda della specie; il capo forma con il torace e l'addome un angolo quasi retto,, caratteristica che li rende riconoscibili anche ad occhio nudo. Finora sono state descritte più di 600 specie suddivise in cinque generi: Phlebotomus e Sergentomyia, che sono generi del Vecchio Mondo, e Warileyia, Brumptomyia e Lutzomyia, generi che comprendono specie del Nuovo Mondo.

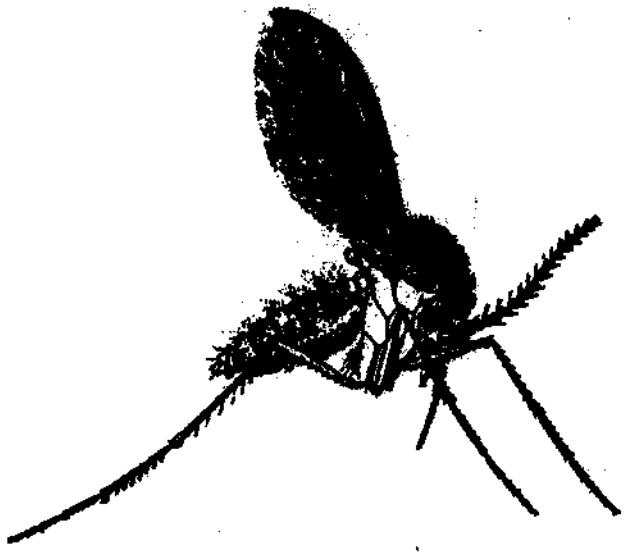

Fig. 1 - Femmina di flebotomo (da Theodor, 1958).

In Italia il genere Sergentomyia è rappresentato da una sola specie, S. minuta; il genere Phlebotomus è presente con sette specie: P.perniciosus, P.perfiliewi, P.papatasi, P.major, P.mascitti, P.sergenti e P.ariasi.

I flebotomi sono insetti ematofagi e quindi la femmina ha bisogno di un pasto di sangue di un ospite vertebrato fra cui anche l'uomo. Questa necessità alimentare li porta ad avere un ruolo, oramai accertato sperimentalmente, nella trasmissione di diversi agenti patogeni per l'uomo. Le leishmaniosi, la bartonellosi, la febbre da pappataci ed alcuni tipi di arbovirosi sono le malattie più conosciute. Inoltre nell'uomo possono manifestarsi a volte gravi forme di reazioni allergiche in seguito alla puntura di questi insetti. Data la loro importanza medica è quindi giustificata la necessità di studi approfonditi sulla loro biologia, distribuzione, densità e comportamento, onde meglio prevenire le malattie da essi trasmesse o per impiantare idonee compagne di lotta contro quelle specie vettrici. Due delle difficoltà maggiori nello studio dei flebotomi sono la loro estrema fragilità e le loro piccole dimensioni. Per questo uno dei grossi problemi che si presenta nello studio epidemiologico delle malattie da essi trasmesse è quello del campionamento e raccolta dei flebotomi in natura.

Nel corso delle ricerche sui flebotomi sono state sperimentate e messe a punto diverse tecniche di cattura, soprattutto per quanto riguarda gli adulti. Fra le ricerche condotte in Europa, fin dall'inizio degli anni trenta, quelle dei Sovietici hanno messo in evidenza come sia possibile una "certa standardizzazione" delle raccolte di flebotomi con l'uso delle carte oleate, oramai di larga diffusione in molte altre regioni. Un altro aspetto che viene sottolineato nei lavori condotti in Unione Sovietica è che le conoscenze sul vettore, e in particolare sulla sua densità, sono essenziali per meglio comprendere l'epidemiologia di un focolaio di leishmaniosi.

Recentemente, all'inizio degli anni sessanta, nel sud della Francia,

è stato creato un centro di ricerca (Rioux e Golvan, 1969; Rioux et al., 1979) che ha affrontato con metodiche nuove lo studio dell'ecologia e dell'etologia dei flebotomi. Una diretta collaborazione di questo centro con ricercatori della Scuola inglese (Killick-Kendrick e collaboratori dell'Imperial College di Londra) ha prodotto una serie di interessanti e significativi lavori sul campo e in laboratorio.

Fra i numerosi ricercatori italiani che hanno dedicato la loro attività ai flebotomi non si può fare a meno di ricordare G.B. Grassi (1907), con i suoi studi pionieristici, Corradetti e coll. e Biocca e coll., che hanno condotto ricerche rispettivamente sull'epidemiologia della leishmaniosi e sulla distribuzione dei flebotomi. Sempre per l'Italia vanno poi citati gli studi compiuti da Adler e Theodor negli anni trenta, in Sicilia.

Importanti e risolutive ricerche sono state condotte in tre diverse aree dell'America centrale e meridionale:

a) In Belize (British Honduras), gli studi hanno riguardato l'identificazione della specie di Phlebotomus che poteva nutrirsi sui roditori incriminati come reservoirs della leishmaniosi cutanea. Numerosi tentativi di mettere a punto trappole per flebotomi, che usassero come esca tali roditori, hanno portato alla definizione della trappola descritta da Disney (1966);

b) In un'altra zona, Belem (Brasile), gli studi sui flebotomi hanno ricevuto un notevole impulso da parte dei numerosi ricercatori (Lainson e Shaw, 1968; Lainson et al., 1973; Shaw e Lainson, 1968 e 1972; Shaw et al., 1972; Ward et al., 1973). Uno dei principali obiettivi delle ricerche condotte in Belem è stata la definizione del ruolo dei flebotomi nel ciclo di trasmissione della leishmaniosi da roditore a roditore e da roditore

all'uomo. Altri studi, sempre in Belem, hanno riguardato la distribuzione dei flebotomi in differenti tipi di foresta brasiliana;

c) Infine in Panama, presso uno dei più antichi ed importanti centri di ricerca dell'America tropicale, il Gorgas Memorial Istituto di Medicina Tropicale e Preventiva, sono state condotte intensive ricerche sui flebotomi anche sul ruolo che essi hanno nella trasmissione di virus (Chaniotis et al., 1971 (a e b), 1972, 1974; Tesh et al., 1971).

Nella presente rassegna vengono raccolte e descritte le tecniche più comunemente usate per il campionamento degli adulti e per l'identificazione dei focolai larvali. Una sezione viene dedicata ai metodi di conservazione e montaggio dei flebotomi. Consapevoli che una tale rassegna potrà essere incompleta e che delle tecniche descritte vi possono essere numerose possibilità di variazioni, dovute alla reperibilità del materiale per la costruzione di trappole ed alle condizioni ambientali in cui si opera, ci auguriamo che il nostro lavoro possa servire soprattutto come materiale di consultazione a chi volesse iniziare una ricerca sui flebotomi.

CAPITOLO I

METODI DI CAMPIONAMENTO DEGLI ADULTI

I flebotomi sono insetti con attività notturna, durante il giorno restano fermi nei posti di riposo, ("resting sites" degli inglesi) quindi i metodi di cattura saranno differenti a secondo se la ricerca viene effettuata durante le ore di luce o durante la notte.

Abbiamo suddiviso i metodi di campionamento degli adulti in tre sezioni, catture manuali, trappole senza attrattivo e trappole con attrattivo, ritenendo che tale suddivisione non dovrà essere intesa come l'unica possibile, nè come scelta di priorità del metodo in quanto essa è dettata esclusivamente dagli scopi prefissati della ricerca. Un aspetto che va senz'altro sottolineato è che l'uso di uno solo dei metodi non permette mai di avere una completa conoscenza sui molteplici aspetti della biologia dei flebotomi e sulla distribuzione delle specie presenti nell'area della ricerca. Quindi è sempre necessario usare contemporaneamente la combinazione di diversi metodi onde poter stabilire con certezza e le specie presenti e il loro ruolo nella trasmissione di patogeni.

A- CATTURE MANUALI.

Le catture manuali possono essere condotte facendo uso di provette, aspiratori a bocca ed aspiratori elettrici.

1. Provette.

La cattura con provetta è il metodo più semplice per le raccolte di flebotomi, anche se non necessariamente il più efficiente. Le provette impiegate possono essere di diversa grandezza: la lunghezza può variare da 6 cm a 15 cm e il diametro da 1 cm a 1,5 cm.

Nella Fig. 2 sono rappresentati quattro tipi di provette: le prime due da impiegare per la raccolta di esemplari vivi e le seconde preparate in modo che i flebotomi catturati vengano immediatamente uccisi.

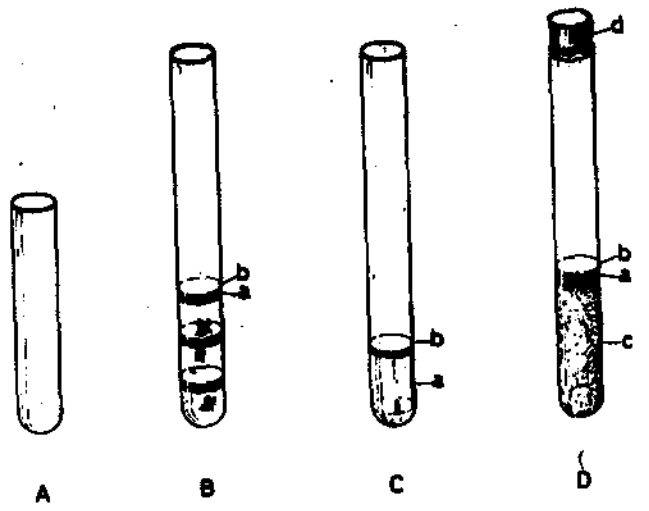

Fig. 2 - Provette per la cattura manuale: (A) catture singole; (B) catture di più esemplari; (C) e (D) catture di più esemplari morti. (a) cotone, (b) carta da filtro, (c) sughero imbevuto di cloroformio; (d) tappo di sughero.

La provetta di tipo A (1 cm di diametro e 6 di lunghezza) è adoperata per catturare singolarmente i flebotomi, evitando così di danneggiarli. Il flebotomo fermo su una superficie o su un'esca viene intrappolato con

la provetta, aspettando che voli verso il fondo. A questo punto l'operatore capovolge la provetta e rapidamente ne chiude l'apertura con un dito. Una volta liberato il flebotomo all'interno di una gabbia, si procede ad una nuova cattura.

Se invece si vogliono catturare con un'unica provetta più esemplari, può essere impiegata la provetta di tipo B (1,5 cm di diametro e 10-15 cm di lunghezza), ove i flebotomi catturati vengono isolati l'uno dall'altro mediante uno strato di cotone e un dischetto di carta da filtro.

Per la raccolta di materiale non vivo sono adoperate le provette di tipo C e D, così preparate:

C - Sul fondo della provetta (1,5 cm di diametro e 10-15 cm di lunghezza) vengono posti del cotone inumidito con qualche goccia di etere e un dischetto di carta da filtro. Il flebotomo fermo su una superficie viene imprigionato con la provetta, i cui margini sono tenuti per alcuni secondi aderenti alla superficie stessa. Una volta che l'insetto è caduto nel fondo, si può procedere ad una nuova cattura, finchè, raggiunti il numero desiderato, i flebotomi vengono conservati con le modalità che verranno descritte nel capitolo sui metodi di conservazione.

D - Sul fondo di una provetta (1,5 cm di diametro e 10-15 cm di lunghezza) vengono posti in successione: un pezzo di sughero spesso circa 3 cm, uno strato di cotone di 3-4 mm e un dischetto di carta da filtro. Vi si versa quindi del cloroformio o, in mancanza di questo, idrossido di ammonio e lo si lascia assorbire dal sughero per un giorno circa; l'eccesso viene poi eliminato. La provetta così preparata è tenuta ben chiusa con un tappo di sughero quando non adoperata, per evitare l'evaporazione del cloroformio.

Un metodo alternativo alle due provette precedentemente descritte

può essere quello di adoperare una provetta inumidita internamente con alcool o acqua, in modo che i flebotomi, intrappolati, rimangano attaccati alle pareti.

2. Catturatori a bocca.

Durante le numerose ricerche condotte nel campo dell'entomologia medica sono stati descritti ed usati vari catturatori a bocca per le raccolte di insetti ematofagi.

Il principio di funzionamento consiste nel provocare, mediante una lieve inspirazione boccale, una corrente d'aria in un tubo dove l'insetto da catturare viene imprigionato: una retina posta all'estremità prossimale del tubo impedisce di inghiottire l'insetto.

Fra i catturatori descritti in letteratura abbiamo scelto quelli che sono stati impiegati con successo anche nella cattura di flebotomi.

Modello A: Il più semplice e più usato dei catturatori a bocca è quello della Fig. 3-A. Esso è composto da due parti, una rigida di vetro o plastica trasparente ed una flessibile di gomma. La parte rigida ha un diametro interno compreso tra i 0,5 cm e 1 cm ed una lunghezza variabile tra i 30 ed i 45 cm. Un pezzetto di rete a maglia fitta è fissata a mo' di filtro all'estremità del tubo cui è connessa la parte flessibile composta da un tubo di gomma di lunghezza variabile tra i 60 e gli 80 cm, a seconda della lunghezza del braccio dell'operatore. Per un più comodo uso è preferibile fissare all'altra estremità del tubo di gomma un boccaglio di plastica rigida.

L'uso del catturatore che, come accennato, consiste praticamente nel

succhiare l'insetto, comporta che dopo ogni suzione l'operatore otturi l'apertura del tubo con un dito per evitare che i flebotomi già catturati possano volare via. Questo tipo di catturatore può essere adoperato nelle raccolte, sia diurne che notturne, nei posti di ricovero o su esca. E' chiaro che esso non permette di catturare più di una decina di flebotomi per volta senza essere svuotato. Per ovviare a questo inconveniente può essere applicato al catturatore sopra descritto un contenitore di riserva che però rende poco agevole il successivo trasferimento dei flebotomi catturati.

Un catturatore molto simile al precedente adoperato per le catture di flebotomi in anfratti e in posti di ricovero particolarmente scomodi da raggiungere è stato usato da Kirk e Lewis (1940) (Fig. 3-B). Questo è costituito da un cilindro di vetro stretto ad una delle estremità a cui è unito un tubo di gomma flessibile connesso con un tubicino di vetro di 6 mm di diametro interno, piegato ad angolo retto. Dall'altra parte del cilindro è fissato un tubo flessibile di gomma di varia lunghezza che termina con un boccaglio per l'aspirazione.

Modello B: questo modello di catturatore a bocca (Fig. 4-A) è costituito da un cilindro di vetro o di plastica trasparente di 30 cm di lunghezza (tipo lungo) e 4 cm di diametro. L'estremità distale è un cono invertito che si prolunga all'interno per 2 cm e presenta un'apertura apicale di 1 cm di diametro. L'estremità prossimale del cilindro è chiusa da un tappo di sughero attraversato da un tubo di vetro di 1 cm di diametro. Una delle estremità di questo tubo si prolunga all'interno del cilindro per 1 cm ed è ricoperta da una rete a maglia molto fitta; all'altra estremità è invece applicato un tubo di gomma variabile tra i 60 e gli 80 cm. I flebotomi

aspirati nel cilindro vi possono essere conservati otturando l'apertura distale con del cotone. Il trasferimento in un altro contenitore è eseguito dopo una blanda anestesia con CO_2 o fumo o dopo raffreddamento. Se il trasferimento avviene in una gabbia per flebotomi, è sufficiente introdurre il catturatore nella stessa e, dopo aver tolto il tappo di sughero, con un leggero soffio, si lascia uscire gli esemplari dal catturatore: una sorgente luminosa posta dietro la gabbia può facilitare la fuoriuscita dei flebotomi. Questo catturatore è stato messo a punto per le raccolte diurne

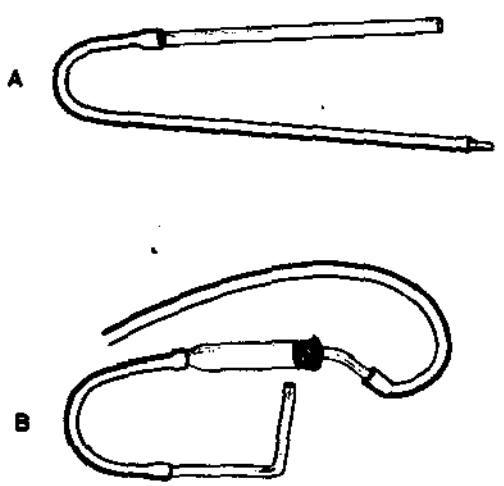

Fig. 3 - Catturatori a bocca: (A) catturatore semplice; (B) Catturatore per anfratti e posti di riposo particolarmente scomodi da raggiungere (ridisegnato da Kirk e Lewis, 1940).

in cavità con apertura sufficientemente ampia. Per le catture notturne su superfici lisce e chiare, con l'aiuto di una torcia, è preferibile che l'apertura prossimale del cilindro sia più piccola, 0,5 cm circa, poichè, essendo i flebotomi più attivi, è sufficiente una piccola e rapida aspirazione per deviare il loro volo. Il catturatore così modificato, ma con un cilindro di 15-18 cm di lunghezza (tipo corto), è usato per catture su uomo. L'insetto viene imprigionato all'estremità distale del cilindro i cui margini aderiscono alla pelle: ciò permette un'aspirazione sufficiente a catturare il flebotomo anche mentre punge ed è quindi saldamente attaccato all'ospite. All'interno del cilindro può essere inserita una striscia di carta da filtro piegata a fisarmonica (Fig. 4-B). Questa costituisce un'ottima superficie di appoggio per i flebotomi e nello stesso tempo attenua la forza dell'aspirazione salvaguardando l'integrità degli stessi insetti (Rioux, comunicazione personale).

Modello C: il catturatore è composto da un cilindro di vetro o di plastica trasparente di 2 cm di diametro. L'estremità prossimale è uguale a quella descritta per il catturatore Modello B. L'apertura distale è chiusa da un tappo di sughero attraversato da un tubo di gomma semirigida lungo 10 cm e con un diametro di 1 cm, tagliato obliquamente all'apice (Fig. 4-C). Il catturatore permette raccolte in fessure strette e in cavità con piccole aperture.

Modello D: il catturatore della Fig. 5 è costituito da un cilindro di vetro o di plastica trasparente lungo 10 cm e con il diametro di 3 cm.

L'estremità prossimale, la sola aperta, porta un tappo di sughero in cui sono praticati due fori. Nel primo passa un tubicino di vetro che

entra nel cilindro per circa 2 cm, mentre esternamente si prolunga per 10 cm. Nel secondo è posto un tubicino simile al precedente che sporge all'interno solo per 1 cm ed è ricoperto da una rete a maglia fitta. L'estremità esterna è unita ad un tubo di gomma di circa 60 cm, attraverso cui è operata l'aspirazione. I flebotomi risucchiati attraverso il primo tubicino non possono essere conservati nel cilindro e sono quindi trasferiti in altri contenitori con le stesse procedure precedentemente descritte.

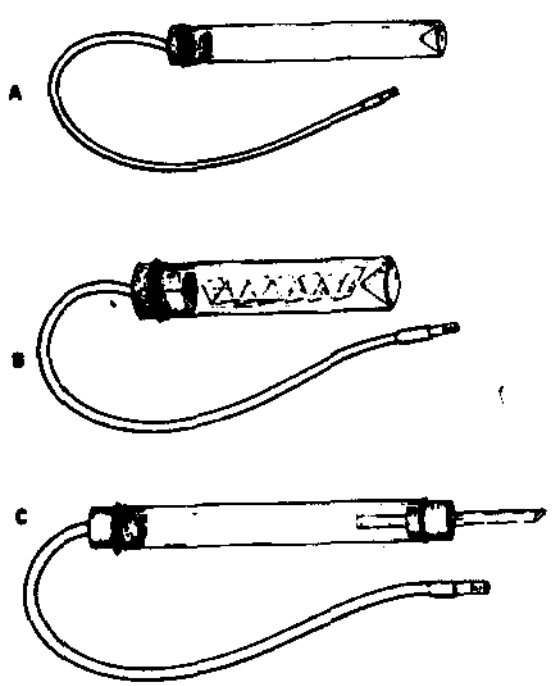

Fig. 4 - Tre tipi di catturatori a bocca: (A) Modello B tipo lungo; (B) Modello B tipo corto con all'interno carte da filtro piegati a fisarmonica che riduce il flusso d'aria e serve come appoggio per i flebotomi; (C) Modello C (vedere testo per descrizione).

Un altro modello di catturatore a bocca (Fig. 6) che potrebbe essere usato anche nelle raccolte di flebotomi è quello descritto da Coluzzi e Petrarca (1973). Le differenze fra questo catturatore e quelli precedentemente descritti sta nel fatto che gli insetti sono catturati in un contenitore di carta (bicchierino reperibile in commercio) che può essere facilmente sostituito con un altro vuoto, una volta che si è raggiunto il numero desiderato di insetti: il bicchierino può essere usato per il

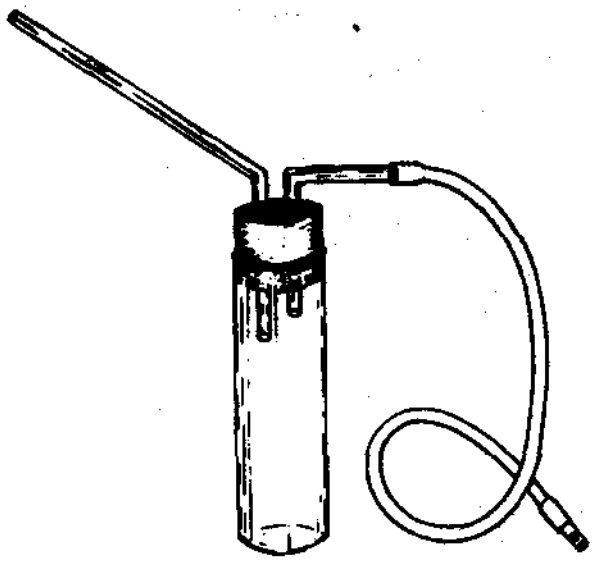

Fig. 5 - Catturatore a bocca Modello D (vedere testo per descrizione)

trasporto di materiale vivo raccolto evitando così una ulteriore manipolazione degli insetti.

3. Catturatori elettrici.

Per ovviare ad alcuni degli inconvenienti presentati dai catturatori a bocca sono stati messi a punto vari tipi di catturatori elettrici, ove il vortice d'aria per catturare l'insetto è ottenuto mediante una ventola aspirante azionata da un motorino a batterie, in genere due pile da 1,5 V.

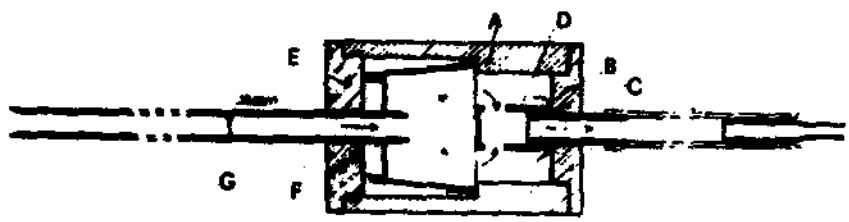

Fig. 6 - Catturatore con bicchierino di carta, in sezione longitudinale (da Coluzzi e Petrarca, 1973); per la descrizione dettagliata si rimanda all'autore.

Diversi autori hanno descritto aspiratori elettrici per la cattura di zanzare (Dell'Uomo, 1961, 1967; Bailey, 1966; Carver, 1967; Trpis, 1968; Jackson & Grothaus, 1971); lo stesso catturatore a bocca descritto da Coluzzi e Petrarca (1973) collegato con un aspiratore può essere un catturatore elettrico.

In genere, gli autori hanno utilizzato un comune aspiratore a batterie per abiti, di facile reperimento in commercio, le cui spazzole sono sostituite ogni volta da un contenitore di forma diversa oppure un ventilatore portatile. La base del contenitore è costituita da una rete a

maglia fitta, mentre l'altra estremità termina con un tubo di plastica di lunghezza variabile. Sarebbe impossibile, né tantomeno è nello scopo del lavoro, descriverli tutti o suggerire quale può essere più adatto per le catture dei flebotomi. Va comunque sottolineato il fatto che, qualora detti catturatori vengano usati per la raccolta di materiale vivo, l'aspirazione deve essere lieve per non sbattere i flebotomi contro le pareti del contenitore. Gli aspiratori elettrici che potrebbero essere usati per le raccolte dei flebotomi senza danneggiarli, sono quelli descritti da

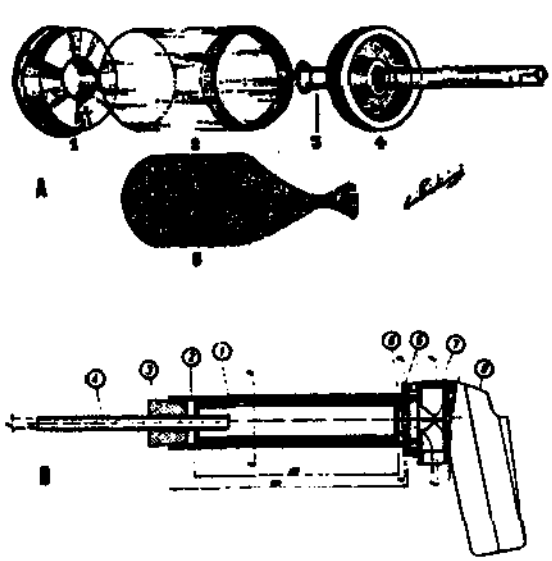

Fig. 7 - (A) Particolare dell'aspiratore elettrico descritto da Dell'Uomo (1967). Per la descrizione particolareggiata si rimanda all'autore (da Dell'Uomo, 1967). (B) Sezione longitudinale dell'aspiratore elettrico descritto da Trpis (1968). Per la descrizione particolareggiata si rimanda all'autore (da Trpis, 1968).

Dell'Uomo (1967) (Fig. 7-A), da Trpis (1968) (Fig. 7-B), in quanto in essi l'insetto viene catturato in un contenitore posto all'interno del cilindro in cui è provocato l'aspirazione. Questo accorgimento permette inoltre, una volta raggiunto il numero desiderato di insetti, di sostituire il contenitore stesso con un altro vuoto. Per la descrizione dettagliata si rimanda a quella fatta dagli autori. Va osservato comunque che per quanto riguarda il catturatore descritto da Dell'Uomo (1967) è necessario che l'intelaiatura del contenitore in tulle (Fig. 7-A,5) sia posta all'esterno.

Altri tipi di aspiratori elettrici poi possono essere costituiti dai modelli di catturatori a bocca precedentemente descritti, qualora ad essi venga applicata una aspirazione mediante una ventola azionata da un motorino a batteria: questo è il caso del catturatore della Fig. 8, riportato da Rioux e Golvan (1969).

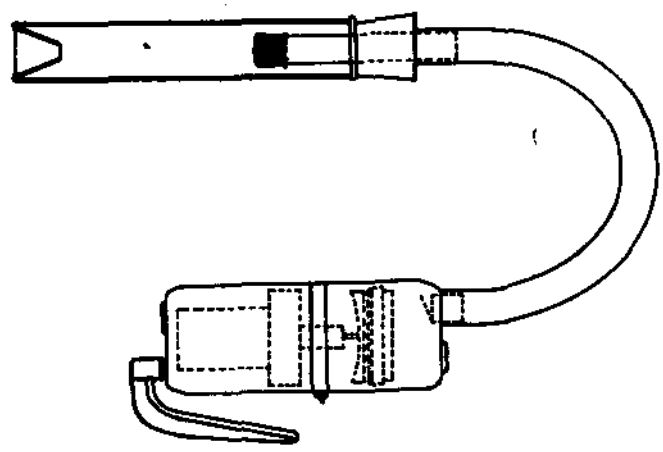

Fig. 8 - Aspiratore elettrico ricavato da un aspiratore a bocca (Modello B) cui è stata applicata una ventola azionata da motorino a batteria (ridisegnato da Rioux e Golvan, 1969)

Da qualche tempo è possibile reperire in commercio[1] un tipo di catturatore (Fig. 8-A,B,) molto simile ai precedenti, in cui il contenitore cilindrico di plastica trasparente è di dimensioni ridotte (diametro esterno cm 2,5 e altezza cm 8) e termina con un tappo di gomma a vite, attraversato da un tubicino di plastica di 1,5 cm di diametro e di lunghezza variabile. Il cilindro può essere facilmente estratto e il tappo di gomma sostituito con uno a vite semplice, cosicché vi possono essere conservati gli insetti catturati. Solo recentemente Grepin e Gonzalez (1984) hanno descritto un catturatore elettrico specificatamente messo a punto per la cattura dei flebotomi; il catturatore basato sul modello descritto da Husbands e Holten (1967) e Trpis (1968) permette di raccogliere flebotomi senza danneggiarli.

4. Impiego e limitazioni delle catture manuali.

Uno degli scopi principali delle catture manuali è quello delle raccolte di materiale vivo. Nella tabella I sono riportati alcuni degli studi sui flebotomi che si possono condurre usando tali metodi; in essa vengono riportate anche le limitazioni per ciascun metodo di cattura manuale. Poichè con questo tipo di cattura non viene esercitata nessun tipo di selezione sulle specie da identificare in una determinata area, essa risulta applicabile negli studi tassonomici ed ecologici dei flebotomi. Per quanto riguarda le limitazioni del metodo, va sottolineato senz'altro che per la cattura con provette o con catturatori a bocca non è mai possibile effettuare raccolte massive e quindi avere notizie sulla densità di specie. Con i catturatori a bocca, poi, qualora le catture vengano effettuate nei posti di riposo dei flebotomi, c'è il grave rischio

---

[1] Hauscherr's Machine Works, Trans River, N.J. 08753, U.S.A.

di inalazione di polveri e di eventuali microrganismi patogeni. Infine per i catturatori elettrici vi è la possibilità di danneggiamento degli esemplari catturati, in quanto il vortice creato dall'aspirazione potrebbe essere troppo forte da fare urtare i flebotomi contro le pareti del catturatore.

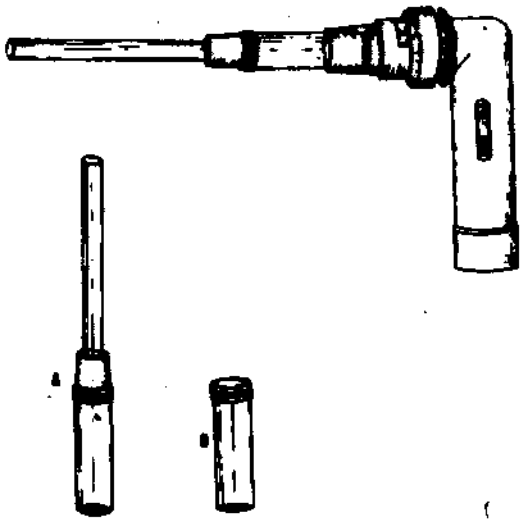

Fig. 9 - Aspiratore elettrico reperibile in commercio. Cilindro e tubo di aspirazione possono essere estratti dall'aspiratore (A) ed il cilindro può essere chiuso con un tappo a vite (B).

Tabella 1: Metodi di cattura manuale e loro impiego in alcuni campi di studio sui flebotomi con le relative limitazioni

METODO	ALCUNI CAMPI DI STUDIO SUI FLEBOTOMI IN CUI PUO' ESSERE UTILIZZATO IL METODO	LIMITAZIONI DEL METODO
PROVETTE*	(1) Studi tassonomici (2) Identificazione dei "resting sites" (3) Esofilia ed endofilia (4) Analisi del pasto di sangue (5) Determinarione dell'infezione naturale (6) Allestimento di colonie di flebotomi (7) Tests di sensibilità agli insetticidi	- Il metodo non permette catture massive
ASPIRATORI A BOCCA*	(1 - 7) e (8) Dispersione orizzontale e verticale (9) Studi sull'attività dei flebotomi	- Il metodo non permette catture massive - Possibilità di inalazione di polvere e di eventuali microrganismi patogeni
ASPIRATORI ELETTRICI*	(1 - 9)	- Danneggiamento degli esemplari catturati

* Il Metodo può essere usato per catture diurne o notturne

B- TRAPPOLE SENZA ATTRATTIVO.

1. Catture con trappole adesive.

1.1. Carte oleate.

Una tipica trappola adesiva è costituita da un foglio di carta oleata o di plastica spalmato con olio di ricino o di castoro; la trappola può essere posta in posizione orizzontale, verticale o inclinata dove si sospetta possano trovarsi flebotomi (Fig. 10).

Fig. 10 - Una carta adesiva (20 x 20 cm) che ha catturato numerosi flebotomi (da Rioux e Golvan, 1969).

Le carte oleate non sono attrattive: gli insetti, che comunemente si muovono con piccoli voli e tendono a posarsi sulle superfici che incontrano lungo il loro percorso, vi rimangono facilmente attaccati.

L'olio usato varia: gli oli di ricino e di castoro sono quelli più adoperati per la loro efficacia adesiva e per la resistenza agli agenti atmosferici. La durata del potere adesivo di tali trappole chiaramente dipende dalla loro dislocazione. Dalle esperienze dei vari autori risulta che se collocate in posti esposti, possono essere efficaci per 2-3 giorni. Nella maggior parte dei casi, sembra non presentino proprietà repellenti, né deteriorano gli esemplari.

La grandezza delle carte oleate può essere diversa: la superficie più ampia è più efficace, ma considerazioni pratiche impongono delle limitazioni. Le carte oleate, come verrà detto poi, sono usate con ottimi risultati per studi sulla densità dei flebotomi e sulla variazione stagionale delle varie specie. A questo scopo sono state fatte numerose ricerche per determinare il numero e la distribuzione di tali trappole con formato standard, necessari per avere il maggior numero di informazioni possibili.

In Unione Sovietica vengono generalmente usate carte di 30 cm x 20 cm, preparate in pacchi di 20, una o due ore prima dell'uso. Nelle aree occupate da colonie animali, particolarmente gerbilli, le carte oleate sono di solito arrotolate a forma di cilindro e introdotte nelle aperture delle tane, se queste sono troppo ampie vengono attaccate alle pareti. In aggiunta a queste sono utilizzate carte oleate arcuate a forma di bandiera, fissate su un paletto a 3-4 cm dal suolo; il lato convesso è rivolto verso il terreno, parallelamente alla superficie. Per determinare la densità dei flebotomi in una certa area, i ricercatori sovietici collocano dieci di queste trappole al centro della colonia, equidistanti, per quanto possibile, dalle entrate delle tane.

Una simile standardizzazione è adottata quando le raccolte sono effettuate in centri abitati. Le carte oleate sono distribuite a coppie

negli angoli più bui delle case, ad una stessa distanza dalle pareti (5-8 cm) e dal soffitto. Su un campione di 200-300 poderi è stato calcolato che è sufficiente fare catture in 10 fattorie con 100 carte oleate esposte per 24 ore per avere un'informazione statisticamente significativa sulla densità dei flebotomi sull'intera area (Dergacheva, 1980).

Un altro tentativo di standardizzare il metodo delle carte oleate, usate nel bacino del Mediterraneo per studi quantitativi, qualitativi ed ecologici, ha portato a modificare questa trappola con l'aggiunta di una fonte di luce (Rioux e Golvan, 1969), e trattandosi di una trappola con attrattivo si rimanda per la descrizione alla apposita sezione.

Le carte oleate possono essere montate su telai quadrati di legno così da essere preparate in laboratorio e trasportate senza che si tocchino l'un l'altro.

L'olio può essere anche spalmato su quadrati di plastica su una superficie di grandezza standard (21 cm x 29,5 cm per Butticker, 1979), in modo che ne resti libera la cornice. Quest'ultima permette l'inserimento della trappola in speciali scatole appositamente preparate.

Inoltre la carta può essere sostituita da fogli di acetato sul cui lato inferiore, o sull'intero perimetro, è incollata una strisciolina dello stesso materiale, alta 1,5 cm, per evitare che l'olio coli e cada sul suolo.

Per le raccolte all'esterno degli edifici, le trappole adesive sono piazzate un'ora prima del tramonto e raccolte entro un'ora dopo il sorgere del sole, per evitare che l'olio si secchi o che gli esemplari siano danneggiati da eventuali animali presenti nell'area. La carte oleate possono essere collocate anche intorno a gabbie contenenti animali esca per la cattura di flebotomi che abbiano già punto o che si avvicinano

a pungere (Thatcher e Herting, 1966).

Le trappole oleate prelevate vengono numerate e raggruppate secondo il luogo di cattura e il periodo in cui sono rimaste esposte. I flebotomi catturati sono rimossi singolarmente mediante un pennellino e posti in contenitori con alcool a 95°, per sciogliere l'olio residuo.

2. Catture in tane di animali.

Nelle aree in cui i flebotomi hanno come luogo di riposo tane di animali o crepe del suolo, vengono usate trappole appositamente studiate. Ne esistono diversi modelli alcuni dei quali presentano proprietà adesive, mentre altri permettono la cattura di esemplari vivi.

2.1. Trappole adesive.

Un cono di carta ricoperto internamente con un film di olio di castoro può essere posto a chiusura dell'ingresso della tana. In tal modo i flebotomi che tentano di uscire rimangono attaccati alla trappola. I coni devono essere collocati e rimossi in determinate ore del giorno in modo che gli abitanti della tana non li distruggano.

2.2. Trappole non adesive.

Vengono descritti due modelli più usati per catture di flebotomi in tane di animali.

a) Uno dei modelli più semplici è costituito da un cono di carta, tronco e ricoperto da una rete a maglia fitta. I flebotomi che

escono dalla tana risalgono il cono dove rimangono intrappolati. Gli esemplari catturati sono rimossi mediante catturatori a bocca o elettrici.

b) Il modello descritto da Chaniotis e Anderson (1968) consiste in un imbuto con un diametro maggiore di 17 o 20 cm. Una striscia di mussola, attaccata al margine dell'imbuto serve a sigillare la trappola sull'apertura della tana. I flebotomi che tentano di uscire sono obbligati ad entrare in un cilindro di vetro (3 cm di diametro, 16 cm di lunghezza) che è applicato al collo dell'imbuto (Fig. 10-A). L'estremità distale del clindro è ricoperta da una rete di nailon piuttosto fitta (25 maglie per centimetro), mentre l'altra estremità è chiusa da un tappo di sughero attraversato da un foro conico il cui diametro va restringendosi da 20 mm, nella parte in cui è infilato il collo dell'imbuto, a 6 mm, all'altra estremità. Per evitare che i flebotomi catturati possano ritornare nella tana, un tubicino di vetro, lungo 3-4 cm e con un diametro di 6 mm, si protende all'interno del cilindro a partire dal foro praticato nel tappo. Una volta fatta la cattura, il contenitore cilindrico viene separato dall'imbuto e il foro chiuso con del cotone: i flebotomi vivi possono così essere trasportati. In una versione modificata di questa trappola (Fig. 10-B), il cilindro di vetro è sostituito con una scatola di cartone. La base di questo contenitore presenta un foro nel quale si inserisce il cilindro di un imbuto per circa metà della sua lunghezza, mentre il lato opposto è costituito da una rete a maglia fitta. L'interno dell'imbuto è stato spruzzato con vernice su cui, prima che si asciugasse, è stato sparso un piccolo quantitativo di sabbia. Questo

trattamento rende la superficie meno liscia e artificiale, favorendo il movimento dei flebotomi su di essa. Il contenitore di cartone con gli insetti catturati può essere rimosso facilmente, avendo l'accortezza di chiudere bene il foro in cui penetra il collo dell'imbuto.

3. Altri tipi di cattura senza attrattivi.

Esistono numerose trappole per la raccolta degli insetti ematofagi, il cui funzionamento non si base sull'azione di attrattivi che possono operare una certa selezione. Di seguito sono descritte le trappole usate anche per la cattura dei flebotomi.

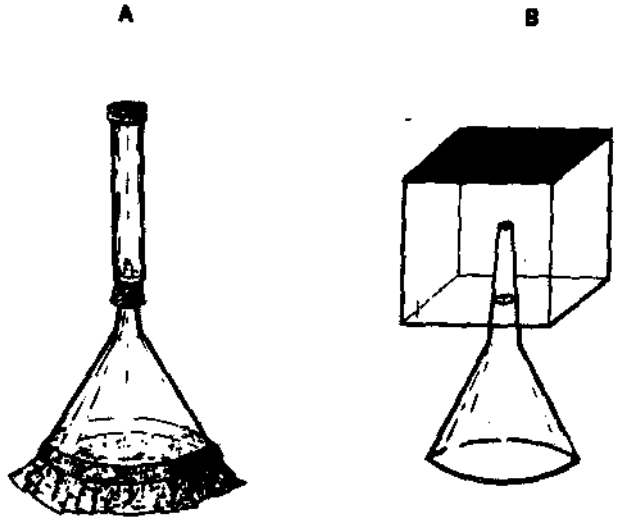

Fig. 11 - Due tipi di trappole non adesive. (A) Modello descritto da Chaniotis & Anderson, 1968; (B) Versione modificata dal modello precedente in cui il cilindro di vetro è sostituito da una scatola di cartone.

3.1. "Malaise trap".

Il principio di funzionamento di questa trappola si basa sul fatto che i flebotomi, come altri insetti, quando incontrano un ostacolo tendono a volare verso l'alto. La "Malaise trap" è composta da quattro pannelli verticali di rete nera, disposti a X, su cui è collocata una piramide rettangolare di rete bianca (Fig. 12). Sulla cima di quest'ultima è posto un cilindro metallico o di plastica che sorregge lo scheletro di un contenitore: in esso rimangono imprigionati gli insetti il cui volo è interrotto dai pannelli sottostanti. Di questa trappola esistono varie versioni riportate da Service (1976). La trappola Malaise è stata usata per catture di flebotomi da Quate (1964).

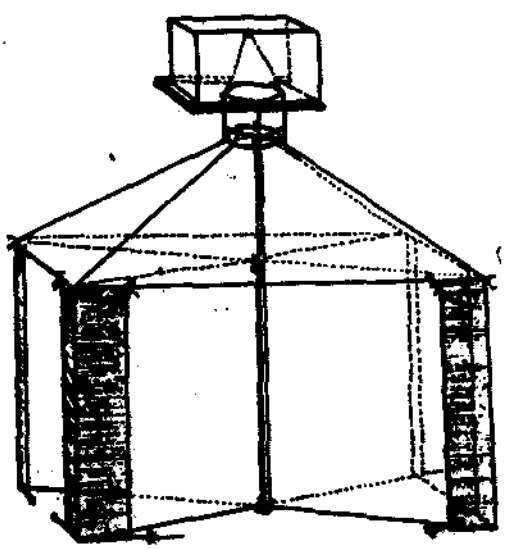

Fig. 12 - Trappola Malaise (ridisegnata da WHO, 1975).

3.2. Trappola con rampa.

Particolarmente usata per le raccolte di zanzare, questa trappola può essere usata anche per il campionamento di flebotomi. La trappola è costituita da un tunnel che va restringendosi e guida gli insetti all'interno di una gabbia in cui rimangono imprigionati. Alla trappola può essere aggiunta un'esca animale, per cui acquista proprietà attrattive.

3.3. Ripari artificiali.

La trappola è stata ideata con l'obbiettivo di imitare i posti di riposo naturali ed avere quindi una certa densità di flebotomi in luoghi conosciuti e di facile accesso.

Vengono di seguito menzionati alcuni dei ripari artificiali che possono essere usati per la cattura di flebotomi.

- Cavità artificiali possono essere realizzate con scatole o con altri contenitori (botti, vasi, ecc.), parzialmente interrate e con l'entrata chiusa da un drappo nero. Si creano così quelle condizioni di umidità, di temperatura, di penombra e di riparo dagli agenti atmosferici che caratterizzano i "posti di riposo" dei flebotomi.

- Gli stessi risultati possono essere raggiunti, qualora il terreno sia adatto, mediante pozzi artificiali coperti da una tettoia.

- Cavità scavate nei tronchi degli alberi possono essere imitate da strutture in legno appositamente costruite e poste fra i rami (Thatcher e Herting, 1966). Queste sono costituite da due pannelli di legno compensato disposti a forma di A e uniti alla base. Altri due pannelli chiudono le facce anteriore e posteriore. Una piccola porta nel pannello anteriore

permette l'ispezione dell'interno, da cui gli insetti sono rimossi mediante catturatori a bocca o elettrici.

- Capanne artificiali sono costruite in zone con densità elevate di flebotomi, qualora sia difficile la cattura nelle comuni abitazioni (Heisch, 1954). Queste presentano pareti chiare e lisce su cui gli insetti possono essere facilmente localizzati e catturati. Nell'ambito di studi su zanzare, queste costruzioni sono state dotate di trappole di entrata e di uscita e vi sono state effettuate catture con spray di piretro. Questi metodi potrebbero essere applicati anche per i flebotomi.

3.4 Catture con piretro.

Le catture con piretro possono effettuarsi in tutti quegli ambienti che sono facilmente chiudibili. Tutte le superfici orizzontali dell'ambiente scelto sono ricoperte con panni bianchi, senza lasciare nessuno spazio tra i muri e il pavimento. Finestre ed altre aperture sono chiuse con reti a maglia fitta; nell'ambiente viene quindi spruzzato piretro nebulizzato e dopo dieci minuti, quando il piretro ha esplicato la sua azione, i panni vengono rimossi e ripiegati, avendo cura che gli insetti caduti su di essi rimangano nell'interno. In laboratorio i flebotomi sono raccolti con una apposita pinzetta e sono trasferiti in provette, per poi essere sottoposti alle comuni tecniche di cui si parlerà in seguito.

3.5 Trappole di entrata e di uscita.

Particolarmente usate nello studio dell'ecologia delle zanzare,

queste trappole possono essere adoperate anche per i flebotomi. Si tratta di superfici a cono o di altra forma convergenti verso una fessura che immette in una gabbia di rete a maglia fitta (Fig. 13). Possono essere applicate alle finestre, alle porte o al muro (in capanne) con l'apertura rivolta verso l'interno (trappole di uscita) o verso l'esterno (trappole di entrata), secondo lo scopo della ricerca.

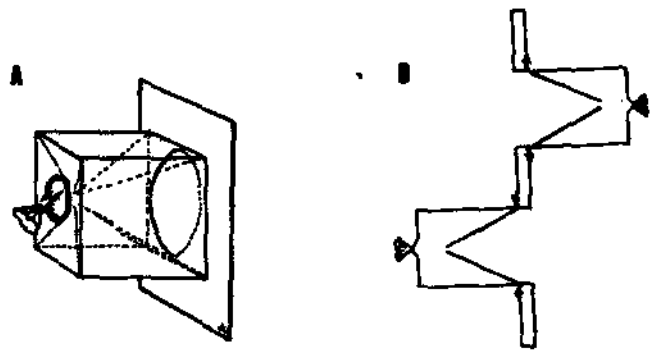

Fig. 13 - (A) Trappola di entrata ed uscita; (B) Sezione di trappola in entrata ed uscita (da WHO, 1975) ridisegnata.

4. Impiego e limitazioni delle trappole senza attrattivi.

Nella Tabella 2 sono riportati alcuni studi che si possono condurre impiegando trappole senza attrattivo, con le limitazioni del metodo.

Le trappole adesive sono largamente utilizzate nella loro forma più semplice di fogli di carta oleata. Esse infatti risultano di facile uso per l'operatore e nello stesso tempo possono essere collocate in diversi ambienti per cui permettono di raccogliere una notevole quantità di

informazioni. Inoltre è possibile effettuare catture massive simultaneamente su un vasto territorio. Il metodo è standardizzabile mediante l'uso di carte di formato fisso collocate in particolare modo: ciò rende possibile comparare dati relativi a diverse zone e quindi avere un'idea piuttosto precisa sulla distribuzione, sulla densità e sull'andamento stagionale delle varie specie di flebotomi in una determinata regione.

A seconda dell'ambiente in cui vengono collocate le trappole adesive permettono lo studio di vari aspetti dell'ecologia ed etologia dei flebotomi: all'ingresso di abitazioni catturano specie diverse nel lato interno (insetti in uscita) e in quello esterno (insetti in entrata), dando informazione sulla endofilia ed esofilia delle specie; la stessa diversità di cattura si ha quando le trappole sono poste all'ingresso di tane di animali. In questo caso se i flebotomi vengono rimossi entro poche ore (3-4), l'analisi del pasto di sangue permette lo studio del ruolo vettore delle specie. Inoltre collocate con una certa disposizione e a distanze ben definite l'una dall'altra possono dare utili informazioni sulla direzione di volo di specie antropofile, dai posti di riposo agli agglomerati umani.

Poche sono le limitazioni all'uso di queste trappole: in zone con temperatura ed umidità elevate se sono esposte all'esterno in periodi in cui le condizioni climatiche sono sfavorevoli, l'olio potrebbe seccarsi, perdendo così le proprietà adesive. Un altro inconveniente presentato dalle carte oleate è che gli insetti catturati possono essere danneggiati durante la rimozione: infatti se non si opera con le dovute cautele le parti più fragili quali ali, antenne, palpi,zampe, spine, possono rimanere attaccate alle trappole.

Per quanto riguarda le catture in tane di animali senza l'uso di attrattivi, indipendentemente dal campionamento di esemplari vivi o morti, esse permettono l'identificazione dei posti di riposo dei flebotomi. Chiaramente tali trappole, essendo selettive per le specie di flebotomi che usano le tane come posto di riposo sono limitative per lo studio di tutte le specie di una determinata zona. Inoltre le catture sono poi effettuabili in tempi limitati, in quanto le trappole possono essere lasciate in situ solo durante il periodo in cui gli ospiti della tana riposano in quanto uscendo la distruggerebbero.

Gli altri metodi di cattura senza attrattivi descritti sono stati finora largamente usati per la cattura di zanzare. Il loro impiego nelle ricerche sui flebotomi è attualmente limitato: sono necessari quindi un numero maggiore di prove in questo campo per poter valutare meglio la loro applicabilità e le loro limitazioni. Va comunque sottolineato che con le trappole con rampa si può studiare la direzione di volo dei flebotomi ma il loro uso, come quello delle trappole Malaise, è limitato a zone con alta densità di flebotomi. I ripari artificiali permettono studi sperimentali sul comportamento dei flebotomi, soprattutto l'identificazione dei posti di riposo laddove non esistono o sono di difficile accesso. Questo tipo di trappola presenta l'inconveniente di una manutenzione periodica per i possibili danni provocati dagli agenti atmosferici. Inoltre, i ripari costruiti in legno possono essere soggetti all'attacco delle termiti. Per quanto riguarda invece le catture con piretro, anch'esse largamente usate per le zanzare va sottolineato che se applicate ai flebotomi permettono la identificazione di sole specie endofile o endofaghe per cui risultano selettive. Lo studio dell'endofagia e dell'esofagia nonchè dell'endofilia ed dell'esofilia può essere compiuta

mediante l'uso di trappole di entrata ed uscita, il loro uso però dà risultati soddisfacenti solo se il resto dell'ambiente è totalmente chiuso. Una loro limitazione è costituita dal fatto che in alcune zone non è sempre facile reperire ambienti idonei dove tali trappole possono essere collocate, in quanto è impossibile chiudere tutte le aperture di tali ambienti (stalle, capanne ecc.)

Tabella 2: Metodi di cattura con trappole senza attrattivi e loro impiego in alcuni campi di studio sui flebotomi con le relative limitazioni

METODO	ALCUNI CAMPI DI STUDIO SUI FLEBOTOMI IN CUI PUO' ESSERE USATO IL METODO	LIMITAZIONI DEL METODO
Trappole adesive	(1) Studi tassonomici (2) Identificazione di posti di riposo (3) Distribuzione e densità delle specie (4) Variazione stagionale delle specie (5) Dispersione verticale (6) Esofilia ed endofilia (7) Analisi del pasto di sangue* (8) Determinazione dell'infezione naturale** (9) Zoofilia (10) Studi sull'attività dei flebotomi	- L'olio perde le sue proprietà adesive in condizioni atmosferiche sfavorevoli: umidità e temperature elevate, vento forte, ecc. - Danneggiamento degli esemplari durante la rimozione: le parti delcorpo più fragili possono rimanere attaccate alla trappola
Catture in tane animali		
a) Adesive:	(1) (2) (3) (7)* (8)* (9) Interazione vettore-serbatoio	- Valgono le stesse limitazioni delle trappole adesive
b) Non adesive:	(1) (2) (3) (7) (8) (9) (11) Raccolta di materiale vivo	- Le trappole adesive non possono essere tenute in sito solo durante il periodo di riposo degli ospiti della tana
Malaise trap	(1) (7) (8) (10) (11)	- Il metodo dà raccolte massive solo in zone ad alta densità di flebotomi
Trappole con rampa	(1) (7) (8) (10) (11)	- Il metodo dà raccolte massive solo in zone ad alta densità di flebotomi - L'esposizione della gabbia agli agenti atmosferici può abbattere i flebotomi catturati
Ripari artificiali	(1) (2) (7) (8) (11)	- Il metodo dà raccolte massive solo in zone ad alta densità di flebotomi - Le trappole in legno possono essere distrutte da termiti - I ripari artificiali hanno bisogno di manutenzione periodica per i possibili danni provocati dal maltempo.
Catture con piretro	(1) (6) (7)* (8)*	- Il metodo è selettivo per specie endofile
Trappole di entrata e di uscita	(1) (6) (7) (8) (11) (12) Esofagia ed endofagia	- Non sono sempre di facile reperibilità gli ambienti dove poter collocare le trappole

*Solo se i flebotomi vengono rimossi dopo poche ore (3-4) dalla cattura
**Se posti vicino ad esche

C- TRAPPOLE CON ATTRATTIVO.

1. Catture con esca.

1.1. Trappola Disney.

La trappola, messa a punto da Disney nell'ambito di studi sulla leishmaniosi in Belize, si basa sull'attrazione esercitata dal ratto verso alcune specie di flebotomi. Il prototipo descritto da Disney (1966) è costituito da una gabbia cuboidale con il lato di 15 cm, sospesa su una bacinella (19x19x5 cm) e mantenuta in posizione da un filo di ferro che unisce due lati della bacinella. La gabbia viene posta nella cavità centrale quadrata (15x15 cm) di una superficie metallica con il lato di 50 cm. I perimetri interno ed esterno di questa lastra presentano un bordo rialzato di un centimetro circa. La trappola è protetta da una tettoia di metallo (91x91 cm) con un foro centrale attraverso cui passa un uncino saldato ad un pezzo di legno posto esternamente. La tettoia è appoggiata ad un supporto costituito da un cerchietto di filo di ferro dal quale si diramano quattro cordicelle tese, unite ad appositi sostegni. L'uncino passa attraverso il cerchietto di filo di ferro e sospende la gabbia che prende posto nel foro praticato nella superficie di cattura. Su questa viene steso un film di olio di castoro a cui possono rimanere attaccati i flebotomi che si avvicinano al ratto, o che dopo averlo punto si allontanano. Un modello schematico di trappola Disney è riprodotto in Fig. 14; la trappola è stata impiegata da Gradoni et al. (1983) usando come esca il ratto nero (Rattus rattus).

Per aumentare la superficie di cattura, Thatcher (1968) ha aggiunto

alla trappola di Disney un altro pannello, parallelo a quello già esistente. Ambedue possono essere collocati ad altezze diverse, scorrendo su quattro assi verticali saldati agli angoli della tettoia (Fig. 15).

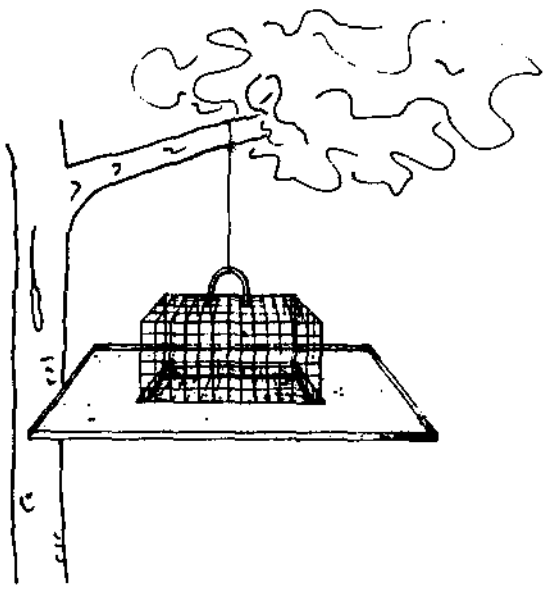

Fig. 14 - Un modello schematico di trappola Disney usata da Gradoni et al, 1983.

Nella trappola Disney e nei diversi modelli che ne sono stati costruiti, possono essere usati, oltre al ratto, vari animali di piccola taglia.

1.2. Trappole ad imbuto.

Esistono vari modelli di trappole ad imbuto che si rifanno al prototipo messo a punto da Bellamy e Reeves (1952). Questo consiste in un cilindro lungo 36,8 cm e con un diametro di 30,5 cm, nelle cui basi sono

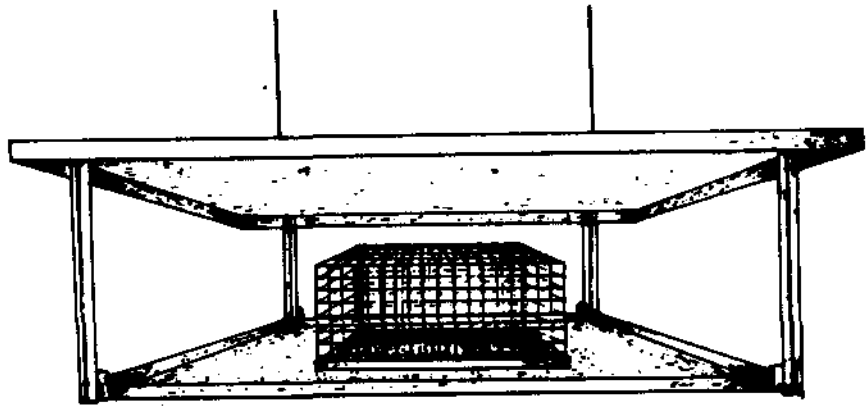

Fig. 15 - Un modello schematico di trappola Disney modificata da Thatcher (1968).

praticati due fori di 22 cm di diametro; in essi sono collocati due imbuti metallici con l'apice rivolto verso l'interno. Nel cilindro viene posto un animale esca o un blocco di ghiaccio secco ricoperto di carta spessa. Questa trappola, usata per la cattura di zanzare, è stata poi modificata da Thatcher e Hertig (1966) per flebotomi (Fig. 16-A). Tale modello è costituito da un cilindro di acciaio inossidabile, lungo 91,4 cm e con un diametro di 25,4 cm. In ciascuna delle basi viene inserito un imbuto di rete a maglia fitta con una apertura apicale di 2 cm circa. Durante le ore di cattura, generalmente dal tramonto all'alba, viene appoggiata ad un supporto o appesa in prossimità del suolo. I flebotomi, attratti dall'esca, risalgono gli imbuti, entrano nel cilindro attraverso i fori apicali e vi rimangono imprigionati. La sostituzione degli imbuti di metallo del modello di Bellamy e Reeves con imbuti di rete fitta evita la

probabile condensazione di vapore cui si va incontro nei luoghi dove vivono i flebotomi. L'efficienza della trappola dipende dal tipo di animale scelto, dall'uso di una rete appropriata nella costruzione degli imbuti e dalla posizione della trappola. I flebotomi catturati vengono aspirati con catturatori a bocca o elettrici.

Un altro modello di trappola ad imbuto con esca animale è stato descritto da Turner e Hoogstraal (1965). Questo è costituito da un contenitore rettangolare di legno compensato con la superficie superiore di vetro (Fig. 16-B). In ognuna delle facce laterali è praticato un foro di 15 cm di diametro. In tre dei fori sono inseriti coni lunghi 10 cm con una apertura apicale del diametro di 6 mm; nel quarto foro invece viene applicato un manicotto di stoffa. All'interno del contenitore è collocata una gabbietta con l'esca.

1.3. Altri tipi di trappole con esca.

Fra le trappole che sfruttano l'attrazione esercitata da esche animali, oltre a quelle già descritte, ne riportiamo tre tipi che possono essere usate anche per i flebotomi.

a) Trappola con tenda.

E' costituita da una tenda di mussola o di un altro tessuto leggero a trama fitta, fissata ad uno scheletro di metallo o di legno cuboidale o rettangolare, di dimensioni varie (Fig. 17). Tale struttura è sospesa sopra ad animali esca, uomo compreso, lasciando alcuni centimetri tra la base della trappola ed il suolo. I flebotomi attratti dall'ospite entrano

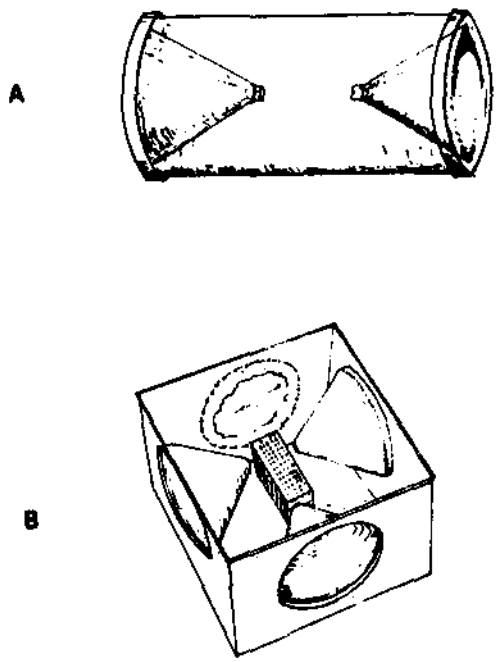

Fig. 16 - (A) Modello di trappola a doppio ingresso descritto da Thatcher & Hertig (1966) ridisegnata; (B) Modello di trappola a tre ingressi descritto da Turner & Hoogstraad (1965) ridisegnata.

attraverso questo spazio e, nella maggior parte dei casi, rimangono intrappolati non ritrovando più la via d'uscita. L'efficacia della trappola è dovuta principalmente al fatto che i flebotomi, quando urtano contro una superficie verticale, in questo caso la parte interna della tenda, tendono a volare verso l'alto. Inoltre, una volta fatto il pasto di sangue sull'esca, i loro movimenti sono più rari e lenti. Gli insetti catturati sono rimossi dalla trappola mediante catturatori a bocca o elettrici.

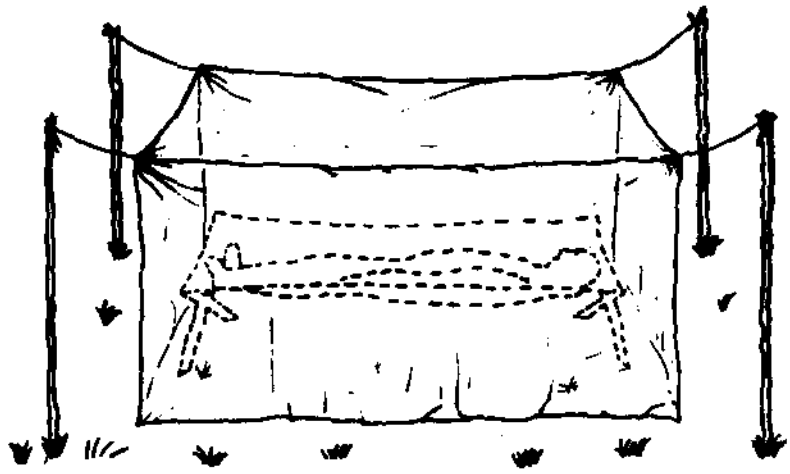

Fig. 17 - Trappola a tenda con esca umana.

b) Trappola con doppia esca.

La trappola descritta da Chaniotis e Anderson (1968) consiste in un parallelepipedo 30x20x18 cm) di legno, separato in due compartimenti attigui. Ognuno di questi presenta due aperture rotonde di 10 cm di diametro: una dotata di un manicotto di stoffa, l'altra chiusa da una rete metallica a maglie di 3 mm^2. La faccia superiore di vetro permette l'osservazione dell'interno della trappola e l'entrata di luce in essa. I flebotomi attratti dalle esche passano attraverso la rete metallica. Giunti all'interno, se effettuano il pasto di sangue, diventano troppo lenti per ritrovare la via di uscita, come è stato già detto per le trappole con tenda. D'altro canto, ingorgate non tendono a volare verso l'alto e per tendenza naturale e per l'attrazione esercitata dalla luce

proveniente dalla faccia di vetro.

c) Trappola con aspirazione ed esca.

La trappola, di cui si conoscono vari modelli (in Fig. 18 è riprodotto quello di Davies, 1973) è realizzata ponendo sulla gabbia dell'animale esca un aspiratore meccanico. Può essere aggiunta anche una sorgente di luce, nel qual caso i flebotomi sarebbero attratti contemporaneamente per chemiotassi e per fototassi, aumentando il numero delle specie catturate. Un'altra variazione che potrebbe essere apportata consiste nella sostituzione dell'esca con CO_2 solida.

L'attrazione esercitata da un'esca può essere sfruttata anche in altri tipi di trappole che normalmente non ne fanno uso. Si è visto infatti che l'aggiunta di un animale a "Malaise traps" o a trappole luminose fa aumentare l'entità delle raccolte.

D'altra parte è molto comune effettuare catture intorno ad esche usando semplici carte oleate oppure operare direttamente sull'esca servendosi di catturatori manuali.

2. Catture con trappole luminose.

2.1. Trappole luminose con carte oleate.

Questo tipo di trappola si avvale dell'attrazione esercitata dalla luce su alcune specie di flebotomi e della proprietà adesiva delle carte oleate, cui si attaccano gli esemplari attratti. Può essere impiegata in diversi modi: in ricerche sui flebotomi nel sud della Francia, Rioux e

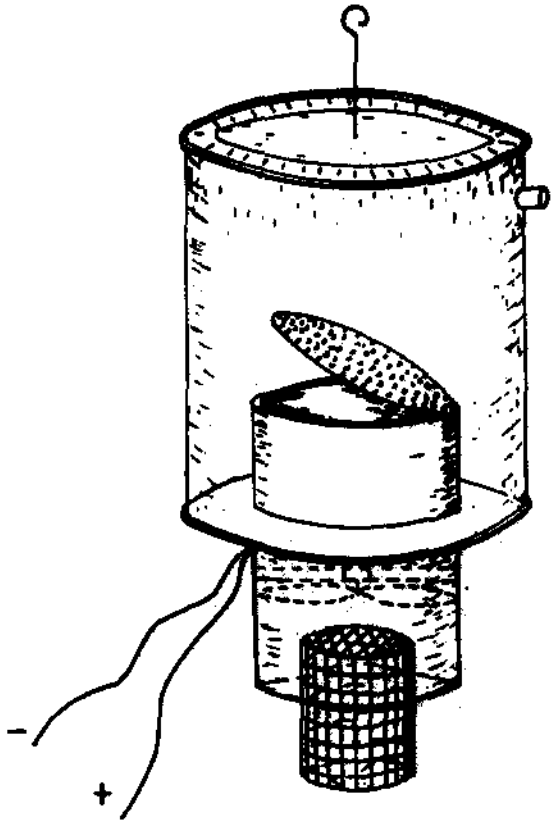

Fig. 18 - Trappola con aspirazione ed esca descritta da Davies (1973), ridisegnata. Si rimanda all'autore per la descrizione.

Golvan (1969) descrivono ampiamente il suo impiego.

Il modello più semplice consiste in un foglio di carta cosparso di olio di ricino, montato su un supporto di legno (Fig. 19). Questo viene introdotto in una anfrattuosità e illuminato dall'interno dalla luce di una lampada tascabile.

Per catture più abbondanti in spazi più ampi, viene adoperato un certo numero di carte oleate, di solito da 4 a 7, attaccate ad una certa distanza l'una dall'altra ad un supporto rettilineao di legno. Dietro

ciascun foglio viene sospesa una lampada tascabile che illumina la faccia posteriore della carta. Questo apparato è stato modificato in modo da standardizzare il più possibile i risultati. Nel sistema messo a punto da Rioux e Golvan (1969) il supporto è costituito da un rettangolo di legno di 170 cm x 20 cm, sul quale a 30 cm di distanza l'una dall'altra sono

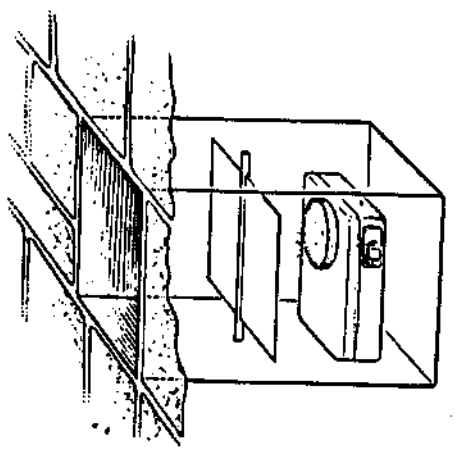

Fig. 19 - Carta oleata con l'aggiunta di una sorgente luminosa impiegata in un barbacane (da Rioux & Golvan, 1969).

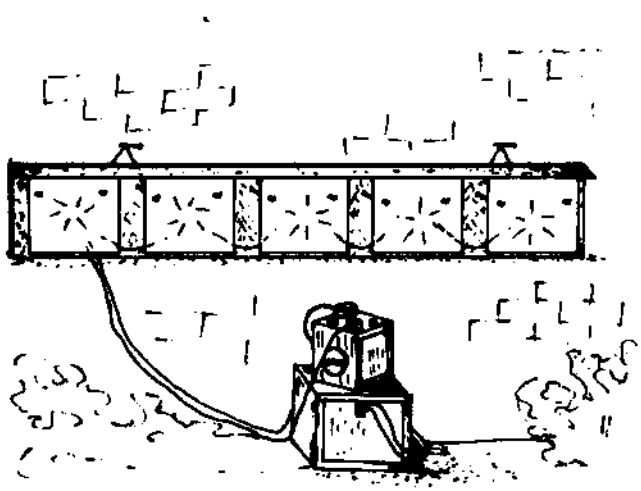

Fig. 20 - Trappola luminosa con carte oleate, ridisegnata da Maroli & Bettini (1977).

fissate sei lampade da 3,5 V. Davanti a ciascuna è sospeso un foglio di carta oleata 20 x 20 cm. Una batteria da 6 V alimenta le lampade durante le ore di utilizzazione. Un disegno schematico della trappola è riportato in Fig. 20. Alla trappola può essere collegata una valvola automatica che permette di accendere e spegnere le lampade all'ora desiderata.

2.2. Trappole luminose con aspiratore.

2.2.1. Trappole C.D.C. (Communicable Disease Centres).

Fra le trappole che si basano sull'attrazione dei flebotomi da parte della luce, le C.D.C. sono le più comunemente usate. Inizialmente sono state messe a punto per la cattura di zanzare nell'ambito di studi su arbovirus (Sudia e Chamberlain, 1962); il loro uso è stato poi esteso agli altri ditteri ematofagi. Una trappola C.D.C. è costituita da un cilindro in plexiglas su cui sono praticate due fessure che permettono l'inserzione dei bracci di sostegno per un piccolo motore che mette in funzione una ventola (Fig. 16-A). Alle fessure, mediante dadi ed alette, sono fissati due supporti che sostengono un'ampia tettoia metallica di protezione. All'apice del cilindro è situata una lampadina la cui luce è riflessa dalla tettoia metallica sovrastante. All'altra estremità del cilindro, mediante una fascia elastica, è fissato il collo di un contenitore di rete fitta tenuta tesa da due cerchi di metallo paralleli. L'energia per il funzionamento della ventola e della lampadina è fornita da una batteria da 6 V o da quattro pile a torcia da 1,5 V. I flebotomi attratti dalla luce sono aspirati nella gabbia, passando attraverso le pale in rotazione della

ventola. La trappola viene lasciata in funzione per un'intera notte; i flebotomi catturati sono rimossi mediante un catturatore a bocca o elettrico, introdotto in un manicotto laterale.

Un tipo di trappola C.D.C., modificata specificatamente per catturare flebotomi, è stato descritto da Chaniotis e Anderson (1968) (Fig. 21-B). Essa consiste in un cilindro di plastica trasparente (15 cm di diametro x 21 cm di altezza) sul quale è montato un motore che aziona una ventola a quattro pale. Una piccola lampadina è posta al centro di un'apertura circolare, di 5 cm di diametro, prodotta sul fondo del cilindro. Gli insetti attratti dalla luce sono aspirati all'interno dalla corrente d'aria provocata dalla ventola in rotazione, risalendo un condotto a forma di cono tronco che giunge al centro della trappola. Perchè i flebotomi non vengano a contatto con la ventola, al di sotto di questa è collocata una rete a maglia fitta, tenuta in sito da quattro viti. La ventola e la lampadina sono alimentate da un paio di batterie da 1,5 V. Per l'uso, la trappola è sospesa mediante una catenella esterna, attaccata a due dei supporti della rete. Le batterie restano sul suolo, su un ramo o su una roccia vicini e sono unite alla trappola mediante un filo conduttore.

2.2.2 Trappola New Yersey.

Di questo tipo di trappola, largamente usato per le catture di zanzare, esistono numerosi modelli, frutto dei tentativi dei ricercatori di renderlo sempre più pratico e manegevole. Il funzionamento delle trappole New Yersey, come quello delle C.D.C., si basa sull'azione attrattiva della luce emessa da una lampada e sull'aspirazione prodotta da una

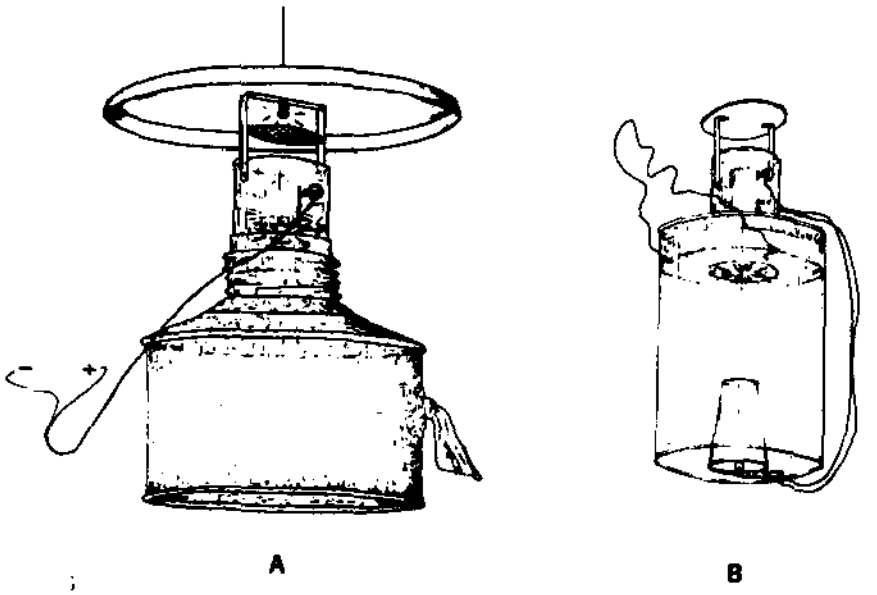

Fig. 21 - (A) Trappola CDC (ridisegnata da Sudia & Chamberlain, 1962), vedere testo per descrizione; (B) Un modello di trappola CDC messo a punto da Chaniotis & Anderson (1968) per la cattura di flebotomi (ridisegnata).

ventola. La lampada e il motore della ventola sono, nei modelli più usati, alimentati da una batteria da 6 V. Diversamente dalle C.D.C., gli insetti non sono catturati in una gabbia, ma, attraverso un imbuto, sono guidati in uno speciale contenitore (Fig. 22-B). In quest'ultimo possono essere collocati piccoli pezzi di gesso cosparsi con sostanze chimiche abbattenti. Se i flebotomi devono essere catturati vivi, il contenitore, privo di tali sostanze, può essere cambiato più volte durante la stessa notte. La trappola è protetta da una tettoia metallica conica sostenuta da alcuni supporti, uniti al corpo del cilindro. Gli insetti più grandi vengono esclusi mediante una rete a maglie piuttosto fitte applicata sopra alla ventola.

2.2.3 Trappola Monks Wood.

Il principio di funzionamento della trappola è lo stesso descritto per le trappole precedenti. In questo caso, però, la luce è fornita da un tubo fluorescente di 23 cm di lunghezza e 6 W di potenza, montato verticalmente nel punto di incontro di tre superfici rettangolari di plastica bianca o di metallo (Fig. 22-A). Questo apparato entra, in parte, nell'estremità di un cilindro trasparente in cui è posta una ventola. La gabbia applicata alla parte inferiore del cilindro è uguale a quella delle C.D.C., ma presenta una fascia superiore di cotone. Un'apertura rettilinea, estesa per circa un terzo della circonferenza della gabbia, permette di inserire del cotone umido o una spugna ricoperta da carta da filtro, per mantenere vivi i flebotomi catturati. I margini della fessura sono fatti collabire mediante velcro. L'energia necessaria per il tubo fluorescente e per la ventola è fornita da una batteria da 12 V.

Nel modello descritto da Ross e Service (1979), la luce ultravioletta continua è sostituita con luce intermittente che permette di risparmiare energia ed estendere, quindi, l'intervallo di ricarica della batteria. Il periodo di intermittenza è regolato automaticamente.

2.2.4 Trappole a luce chimica.

Esistono vari modelli di trappole a luce chimica, particolarmente usati per le catture di zanzare. Uno di questi, descritto da Service e Highton (1980), ha dato buoni risultati anche per i flebotomi. Il principio su cui si basa il funzionamento è lo stesso di quello enunciato per le

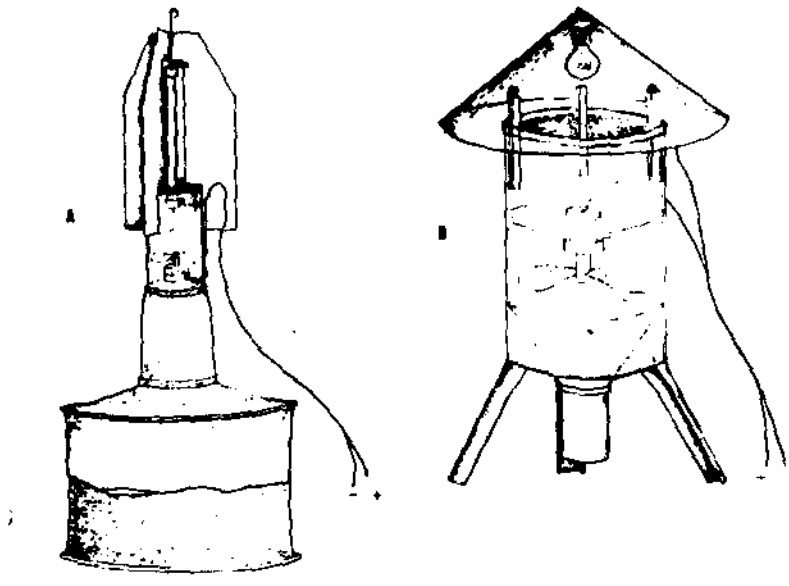

Fig. 22 - (A) Trappola "Monks Wood" da Ross & Service (1979) ridisegnata; (B) Trappola "New Yersey" da Service (1976) ridisegnata.

altre trappole luminose. In questo tipo di trappola, però, la luce fluorescente emessa da un tubicino posto alla base è prodotta dalla reazione fra due soluzioni, dalla cui natura dipende la lunghezza d'onda della emissione. L'intensità della luce e la sua durata sono temperatura dipendenti, con un rendimento massimo fra 21° e 27° C. Gli insetti attratti dalla luce sono aspirati nella gabbia a rete fitta posta sopra al cilindro in cui si trova la ventola in rotazione.

3. Catture con CO_2.

3.1 Trappole con CO_2.

La trappola sfrutta il potere attrattivo della CO_2 sugli artropodi

ematofagi. Ne esistono vari modelli, largamente usati per la cattura di diverse specie di insetti. Per i flebotomi vengono adoperate principalmente trappole in cui la CO_2, solida o gassosa, è circondata da carte adesive. Rioux e Golvan (1969) ne descrivono tre modelli:

a) Un cilindro di plastica di 25 cm di diametro è chiuso alle estremità da un disco di carta, perforata da un certo numero di buchi di 3 cm di diametro. I dischi e la superficie esterna del cilindro sono cosparsi di olio di ricino. All'interno della trappola è posto un blocco di 2 kg di CO_2 solida.

b) In un cilindro metallico di 12 cm di diametro x 15 cm di lunghezza, vengono posti 2 kg di CO_2 solida. Mediante tre sostegni laterali, tale cilindro viene sospeso all'interno di un'altro più grande (18 cm di diametro x 30 cm di lunghezza). Sulla superficie esterna di quest'ultimo, è incollato un foglio di carta oleata che la ricopre completamente.

c) Alle due estremità di un asse lungo 25 cm e con 3 cm di diametro, sono collocate perpendicolarmente due superfici quadrate di 15 cm di lato, unite fra loro da un unico foglio di carta oleata (45 x 25 cm). Un foro su una superficie permette il passaggio del tubicino attraverso cui viene introdotta CO_2 nella trappola (Fig. 23-B).

Il principio di funzionamento dei tre modelli descritti è il medesimo: i flebotomi attratti dalla CO_2 urtano contro le carte adesive e vi rimangono attaccati.

3.2 Trappole luminose con CO_2.

Numerosi studi hanno dimostrato che le trappole in cui oltre alla CO_2 è presente la luce come risorsa attrattiva sono significativamente più efficienti nelle catture di flebotomi. Rioux e Golvan (1969) descrivono due modelli di trappola luminosa con CO_2.

a) E' costituita dalla trappola a CO_2 descritta nel paragrafo precedente al punto c), cui è aggiunta all'interno, appesa all'asse centrale, una lampada da 3,5 V (Fig. 23-A).

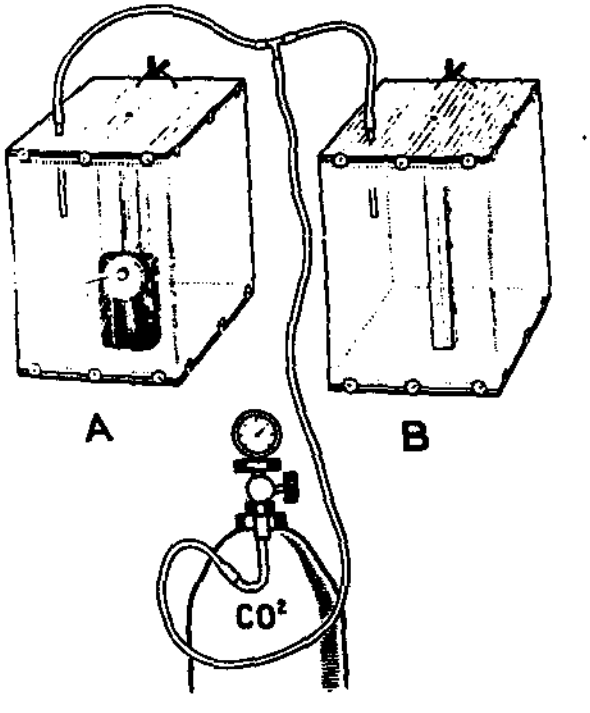

Fig. 23 - (B) Trappola con CO_2 (A) con l'aggiunta di una sorgente luminosa (da Rioux & Golvan, 1969).

b) Consiste in un cilindro di materiale plastico trasparente, dotato di un coperchio e di un fondo mobile di 1 cm di spessore (Fig. 24). Alle due estremità sono praticati due serie di fori di 0,2 cm di diametro che assicurano la circolazione del gas. Il coperchio superiore presenta una apertura circolare di 1,2 cm di diametro attraverso cui viene inserito il tubo della CO_2 gassosa nella trappola. Può anche essere usata CO_2 solida racchiusa in un cestino metallico collocato all'interno del cilindro. Tra il cestino e il cilindro sono disposte tre serie di lampade da 6 W, alimentate da corrente a 6 V; l'intensità della luce può essere regolata da un potenziometro. La superficie esterna del cilindro è ricoperta da un foglio di carta oleata (Fig 24).

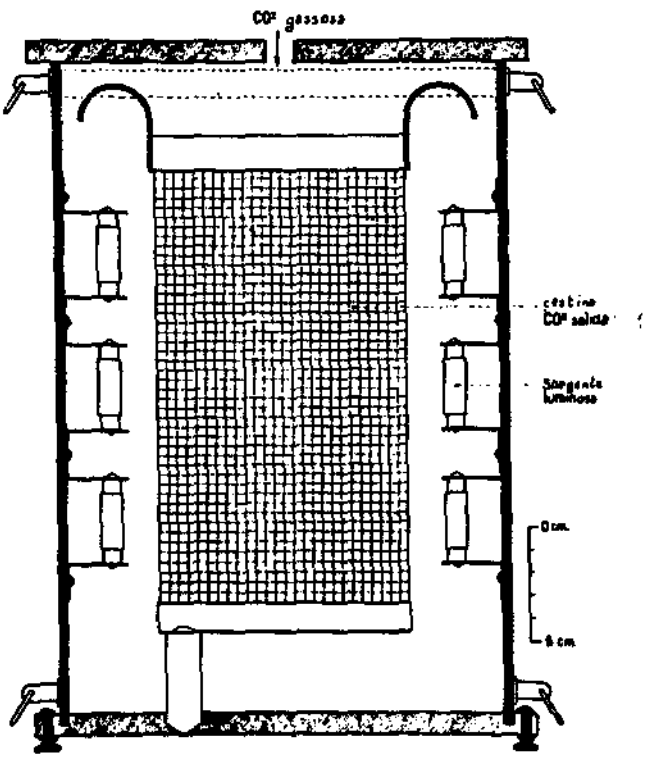

Fig. 24 - Schema di trappola luminosa con CO_2, da Rioux & Golvan, 1969 ridisegnata (vedere testo per descrizione)

La combinazione delle due sorgenti attrattive, CO_2 e luce, può essere ottenuta modificando le trappole luminose comunemente usate (C.D.C., New Yersey, Monks Wood, ecc.), cui viene aggiunta CO_2 solida in un unico blocco o in più pezzi, collocati sopra o dentro la trappola (Chaniotis, 1983). In alcune trappole con esca (trappole ad imbuto, con tenda, ecc.), questa può essere sostituita con CO_2 solida.

4. Impiego e limitazioni delle trappole con attrattivi.

Nella Tabella 3 sono riportati alcuni campi di studi che si possono condurre con l'uso di tali trappole.

Le catture effettuate con trappole il cui principio di funzionamento si basa sull'azione di attrattivi (esca, luce, CO_2) sono ovviamente limitate alle specie che ne sono attratte. Questo tipo di trappole permette raccolte piuttosto abbondanti e studi sull'ecologia e sulla etologia dei flebotomi. Non è però possibile, adoperando esclusivamente trappole con attrattivi, avere informazioni sufficienti a determinare la densità e la distribuzione delle varie specie presenti in un territorio. Tuttavia il tentativo di standardizzazione fatto con una serie di carte oleate e di lampade (Rioux e Golvan, 1969), mediante l'uso di "unità trappola (20 x 20 cm) per notte", permette con una discreta approssimazione una stima quantitativa delle specie presenti. Ciò è possibile in quanto, pur essendo favorite le catture di specie fototropiche, tuttavia il rapporto quantitativo fra esse rimane costante, permettendo, quindi, di paragonare i dati ottenuti in zone diverse e di studiare le fluttuazioni giornaliere dei flebotomi in relazione alla variazione dei parametri ecologici.

Gli altri tipi di trappole luminose, C.D.C. in particolare, il cui uso non è stato ancora standardizzato, non consentono indagini di questo tipo. Tuttavia sono particolarmente utili nella stima del fototropismo delle varie specie e quindi nello studio sull'ecologia di questi insetti. Inoltre, permettono la raccolta di materiale vivo in discreta quantità.

Per quanto riguarda le trappole con esca, esse sono particolarmente usate per studi sull'interazione vettore-serbatoio. L'analisi del pasto di sangue dei flebotomi così catturati, nonchè la determinazione dell'infezione naturale nel vettore e nell'ospite permettono di avere importanti informazioni sul ciclo biologico in natura di leishmanie e di arbovirus. L'uso di diverse esche, separatamente o a coppia (trappole con doppia esca), in trappole collocate in vari ambienti e in posizioni diverse, risulta indispensabile nell'ambito di studi sulla preferenza d'ospite delle varie specie di flebotomi.

Le trappole con CO_2, attirando preferenzialmente specie chemiotropiche, permettono una stima di questo parametro biologico, importante soprattutto per la determinazione delle specie vettrici. L'aggiunta di un secondo attrattivo, la luce, a questo tipo di trappola, consente la cattura di un maggior numero di specie e raccolte più abbondanti in assoluto.

Per quanto riguarda le limitazioni all'uso delle trappole con attrattivi, si è già parlato della selezione operata nella cattura delle varie specie. Vanno inoltre sottolineati alcuni punti di una certa importanza, riportati nella Tabella 3.

- In tutte le trappole in cui la cattura avviene grazie all'azione di oli adesivi, a prescindere dall'attrattivo usato, si presentano gli stessi inconvenienti che si hanno per le trappole adesive in generale:

possibilità di danneggiamento degli esemplari durante la rimozione e perdita di efficacia dell'olio che può colare o seccarsi a causa delle condizioni atmosferiche sfavorevoli.

- Gli esemplari possono essere danneggiati anche adoperando trappole luminose con aspiratore, in cui gli insetti sono costretti a passare attraverso le pale della ventola e vanno a urtare, talvolta violentemente, contro la rete terminale.

- Nelle trappole con esca e in quelle con CO_2 il rapporto fra i sessi è falsato, in quanto le raccolte sono particolarmente ricche di femmine. Ciò non si verifica, o si verifica in proporzioni minori, nelle trappole luminose.

Tabella 3: Metodi di cattura con trappole con attrattivi e loro impiego in alcuni campi di studio sui flebotomi con le relative limitazioni

METODO	ALCUNI CAMPI DI STUDIO SUI FLEBOTOMI IN CUI PUO' ESSERE USATO IL METODO	LIMITAZIONI DEL METODO
Catture con esca		
a) Adesive:	(1) Studi tassonomici (2) Dispersione verticale (3) Determinazione del grado di antropozoofilia della specie (4) Analisi del pasto di sangue (5) Determinazione dell'infezione naturale (6) Interazione vettore-serbatoio	- La raccolta è ovviamente limitata alle specie che sono attratte dall'esca usata - Il rapporto sessi è favorevole alle femmine - Valgono le stesse limitazioni riportate per le trappole adesive nella Tabella 2
b) Non adesive:	(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) Raccolta di materiale vivo	- La raccolta è ovviamente limitata alle specie che sono attratte dall'esca usata - Il rapporto sessi è favorevole alle femmine
Catture con trappole luminose:		
a) Adesive:	(1) (2) (4) (5) (8) Stima del fototropismo delle (9) Distribuzione e densità delle specie (10) Fluttuazione giornaliere e stagionali	- Valgono le stesse limitazioni riportate per le trappole adesive nella Tabella 2
b) Con aspiratore:	(1) (2) (4) (5) (7)	- Gli esemplari possono essere danneggiati passando attraverso la ventola o nell'urto contro la rete terminale. - Le trappole luminose in genere selezionano specie fototropiche
Catture con CO_2:		
a) Solo con CO_2:	(1) (2) (4)* (5)* (11) Stima del chemiotropismo delle varie specie	- Valgono le stesse limitazioni riportate per le trappole adesive nella Tabella 2 - Le trappole con CO_2 in genere selezionano specie chemiotropiche - Il rapporto sessi è favorevole solo alle femmine
b) Con CO_2 e luce:	(1) (2) (4)* (5)* (8) (11)	- Valgono le stesse limitazioni riportate per le trappole con solo CO_2 - Le raccolte sono limitate a specie chemiotropiche e fototropiche

* Solo se i flebotomi vengono rimossi dopo poche ore (3-4 dalla cattura).

CAPITOLO II

IDENTIFICAZIONE DEI FOCOLAI LARVALI

Gli stadi preimaginali dei flebotomi vivono in habitat con clima caldo umido costante, riparati dalla luce e dal vento e ricchi di materiale organico in decomposizione. La molteplicità dei luoghi con queste caratteristiche (tane di animali, stalle, buchi d'albero, crepacci del suolo, ecc.) e la mancanza di metodi di ricerca adatti rendono difficile la locazzazione dei focolai larvali.

In questo capitolo vengono descritti alcuni dei metodi più usati, raggruppati in due sezioni: diretti e indiretti. I primi permettono di ricercare le larve direttamente nei campioni di suolo; nei secondi è la cattura degli adulti con particolari trappole ed in determinati habitat, che definisce i focolai larvali.

A- METODI DIRETTI.

1. Osservazione diretta al microscopio.

Dai presunti focolai larvali vengono prelevati campioni mediante una paletta, saggiando una certa superficie e diverse profondità. Il materiale raccolto viene trasportato in laboratorio mediante appositi contenitori e sottoposto all'osservazione diretta al microscopio binoculare per la ricerca dei diversi stadi larvali dei flebotomi.

Questo metodo, piuttosto noioso e di lunga durata, risulta poco efficiente, per cui sono preferite le altre tecniche descritte.

2. Flottazione.

Introdotto da McCombie-Young et al. (1926), il metodo è stato messo a punto, nella sua forma più diffusa, da Hanson (1961). Si basa sul diverso peso specifico delle sostanze che compongono il materiale raccolto:

- le particelle di suolo più pesanti vanno sempre a fondo nei liquidi usati;
- insetti e altri componenti della fauna terricola affondano in acqua, ma galleggiano in una soluzione satura di zucchero;
- il materiale più leggero (pezzettini di foglie e di legno, escrementi animali, ecc.) galleggia anche in acqua.

La procedura usata da Hanson è la seguente: nel recipiente che contiene il campione da esaminare viene aggiunta una soluzione satura di zucchero, fino a raggiungere uno spessore di 5 cm al di sopra del materiale. Dopo aver agitato, si lascia riposare per alcuni minuti. La soluzione viene poi decantata mediante dei retini di nailon a maglie di diversa grandezza: 1,2; 0,6; e 0,4 mm^2. Le frazioni separate sono poste in cilindri da 500 ml, riempiti di acqua. Dopo alcuni minuti salgono alla superficie i componenti leggeri del suolo che possono essere facilmente eliminati. Al materiale depositatosi viene aggiunta una soluzione satura di zucchero; dopo 10 minuti circa le larve di flebotomi e gli altri microrganismi si trovano in superficie. La soluzione viene quindi decantata con un retino a maglie fitte; questo, con il suo contenuto, è fissato ad una capsula di vetro per l'osservazione diretta al microscopio; il tempo aumenta se è presente parecchio materiale organico.

La procedura di Hanson è stata modificata come segue da Rutledge e

Mosser (1972). I campioni vengono passati attraverso una rete con maglie di 1,2 mm^2 e poi attraverso una seconda con maglie di 0,4mm^2. Il materiale raccolto dopo questi due passaggi è posto in un cilindro di vetro da un litro, riempito poi di acqua. Avvenuta la sedimentazione ed eliminati il sopranatante e l'acqua, viene aggiunta una soluzione di zucchero sciolto in acqua. Dopo alcuni minuti il materiale galleggiante viene raccolto con un apposito retino e guardato al microscopio. Questa procedura eviterebbe le perdite di larve cui si va incontro nei vari passaggi della procedura di Hanson (1961), eliminando materiali estranei di varia grandezza e densità che trattengono gli stadi larvali.

Il metodo della flottazione è ampiamente diffuso nelle sue varie forme. La soluzione usata può essere ottenuta con vari sali, anche se, come sembra, lo zucchero è meno tossico per i flebotomi.

3. Tecnica di Macfadyen.

La tecnica di Macfadyen (1961) si basa sull'azione repellente verso le larve dovuta al disseccamento prodotto da lampade incandescenti. Nella Fig. 25 viene riportato uno schema di una singola camera di estrazione. L'apparato messo a punto dall'autore per l'estrazione di artropodi dal suolo è costituito da un parallelepipedo di plastica sul cui fondo sono praticati dei fori circolari per la collocazione dei cilindri con il materiale da esaminare. Alla parete superiore sono applicate alcune resistenze che sviluppano calore e che possono essere avvicinati mediante delle carrucole ai corrispettivi campioni. Al di sotto di ogni imbuto è posto un cilindro, accessibile mediante una porta anteriore. Nella camera del parallelepipedo una ventola crea una corrente d'aria che partendo

dalla camera superiore vi ritorna dopo essere passata per quella inferiore. L'aria, riscaldata dalle resistenze e priva di umidità, essicca la superficie superiore dei campioni. Nella camera sottostante, invece, l'acqua fredda che passa attraverso una serie di tubi fa sì che l'ambiente

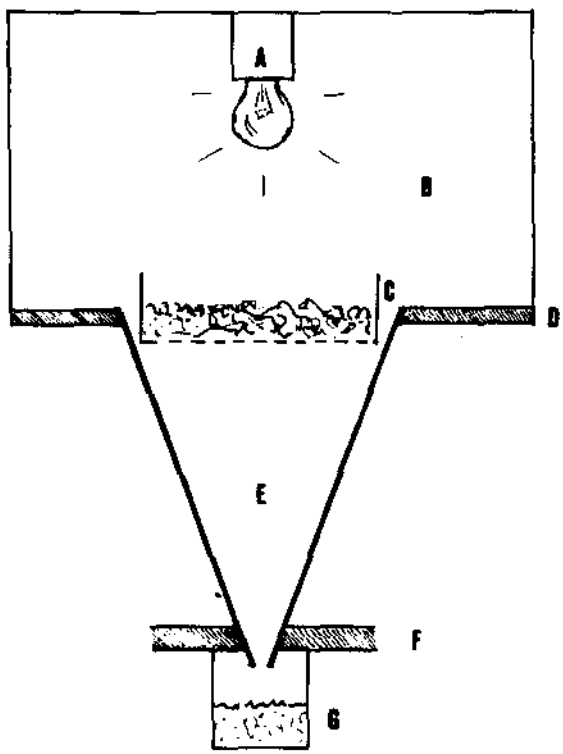

Fig. 25 - Schema di una camera di estrazione: (A) lampada; (B) camera di essiccamento; (C) campione; (D) e (F) setti di separazione; (E) imbuto; (G) contenitore di raccolte degli insetti. (ridisegnata da Macfayden, 1961).

sia fresco e umido. Gli artropodi presenti nel campione tendono a migrare dalla parte superiore a quella inferiore, cadendo negli imbuti e, quindi, nei contenitori di vetro posti al di sotto di questi.

La tecnica sopra descritta è stata usata per l'estrazione degli stadi larvali dei flebotomi da Sayedi Rashti e Nadim (1972). Gli autori hanno usato nella camera superiore alcune lampade che emanano contemporaneamente calore e luce, cosicchè le larve si muovono verso il basso alla ricerca di un ambiente non solo fresco e umido, ma anche scuro.

Recentemente è stato messo a punto da uno di noi (M.M.) un apparecchio basato sul principio di Macfadyen, rifacendosi alla descrizione del prototipo modificato da Bieri et al. (1978). Tale apparato, che permette di processare contemporaneamente 72 campioni di suolo, è stato saggiato usando larve di flebotomi allevate in laboratorio ed ha mostrato un'efficienza di estrazione del 60%.

B- METODI INDIRETTI.

1. Trappole di sfarfallamento.

Le trappole di sfarfallamento rappresentano uno dei metodi più usati per la ricerca dei focolai larvali dei flebotomi. Queste sono composte da una gabbia in ferro o in legno da 50 cm di diametro nella descrizione che ne fa Perfil'ev (1968) oppure da semplici bacinelle (Pozio et al., 1980) o coni tronchi di metallo cui sono applicati pezzi di rete a maglia fitta per l'areazione. Le pareti interne di tali contenitori sono cosparse di olio di ricino oppure sono ricoperte da fogli di carta oleata. Questo tipo di trappola può essere modificata applicando un cilindro di plastica all'apice del cono o a chiusura di un foro praticato sul tetto della bacinella (Fig. 26). L'olio è spalmato esclsivamente sulle pareti interne del cilindro la cui base superiore è costituita de una rete a maglia

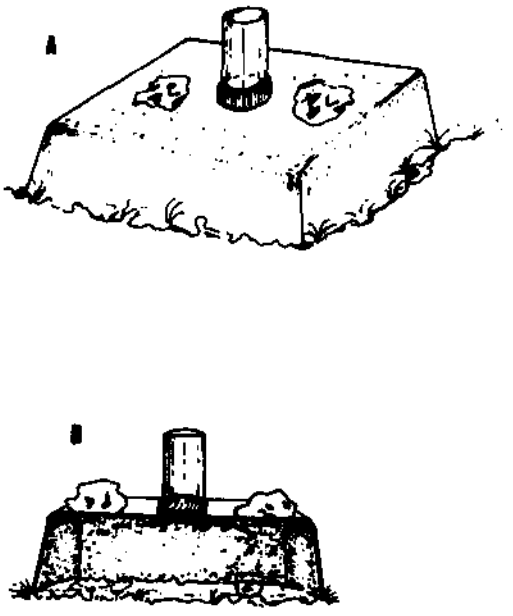

Fig. 26 - (A) Trappola da sfarfallamento costituitá da una bacinella di plastica; (B) in sezione (vedere testo per descrizione).

fitta. I flebotomi attratti dalla luce che filtra attraverso questa rimangono attaccati all'olio. Tale metodo risulta più comodo del precedente, in quanto i cilindri con i flebotomi catturati sono facilmente sostituiti e la trappola può essere lasciata in sito per più giorni. Per catturare flebotomi vivi, vengono usate gabbie di rete a maglia fitta; gli esemplari imprigionati vengono rimossi mediante catturatori a bocca o elettrici introdotti attraverso un manicotto laterale o direttamente dal

lato aperto.

2. Sfarfallamento in laboratorio.

La tecnica è stata recentemente descritta da Hati et al. (1982) e applicata in India con risultati soddisfacenti. Con una paletta vengono prelevati campioni di suolo di circa 10 g, in cui si pensa possano trovarsi stadi larvali di flebotomi. Questi sono posti in contenitori di terracotta di 6 cm di diametro, possibilmente sterili, chiusi da una rete a maglia fitta. I campioni così preparati sono collocati in recipienti con sabbia umida e tenuti in ambiente scuro, a temperatura ottimale (26-28°C). Giornalmente si osserva se si verifica lo sfarfallamento dei flebotomi adulti. Per avere informazioni significative i campioni devono essere prelevati nello stesso posto su un'ampia superficie e a profondità diverse. L'operazione deve essere compiuta più volte durante la stagione favorevole.

Capitolo III

METODI DI CONSERVAZIONE E DI MONTAGGIO DEGLI ESEMPLARI

A- TRASPORTO MATERIALE VIVO.

Il trasporto di materiale vivo deve essere effettuato in condizioni di temperatura ed umidità costanti (25-30°C e 80-90% UR), evitando contaminazioni dei contenitori usati e disturbi prolungati provocati dal movimento del veicolo. A questo scopo ci si può avvalere di metodi diversi:

- I flebotomi rimossi dalle trappole mediante catturatori a bocca o elettrici sono introdotti in speciali contenitori (Barraud, 1929), costituiti da una gabbia di mussola legata agli otto angoli ad un telaio di ferro (Fig 27). Su uno dei lati è presente un manicotto attraverso cui viene introdotta la canna del catturatore. Il contenitore, nella descrizione di Barraud (1929), viene chiuso in una scatola di legno; oggi si preferisce un involucro di plastica in cui è posto un pezzo di cotone bagnato per mantenere la necessaria umidità.

- Un contenitore per il trasporto più sicuro e più conveniente del precendente è rappresentato da un cilindro di metallo di 13 cm di diametro e 16 cm di altezza, il cui interno è cosparso di gesso. Il tappo di plastica presenta un buco nel centro, chiuso da una rete che permette la ventilazione. Durante il viaggio, i contenitori sono protetti dalla luce in apposite scatole. Le pareti interne di gesso, sulle quali è spruzzata dell'acqua, forniscono un'ottima superficie ruvida per il riposo dei flebotomi e, nello stesso tempo, mantengono l'umidità necessaria. I

flebotomi sono introdotti nel contenitore inserendo la canna del catturatore nel buco del tappo e soffiando oppure dopo breve anestesia con CO_2 o con fumo di sigaretta. Possono essere mantenuti in questi cilindri per più giorni.

- Un contenitore semplice e pratico per il trasporto dei flebotomi vivi è costituito da cilindri di carta (per esempio i comuni bicchieri di plastica). All'estremità aperta viene fissata mediante un elastico una retina a maglia fitta. I contenitori sono avvolti in un involucro di plastica in cui viene mantenuta un'alta umidità mediante un pezzo di cotone o una spugna bagnata. Il riparo dalla luce e da variazione di temperatura può essere fornito da scatole di polistirolo.

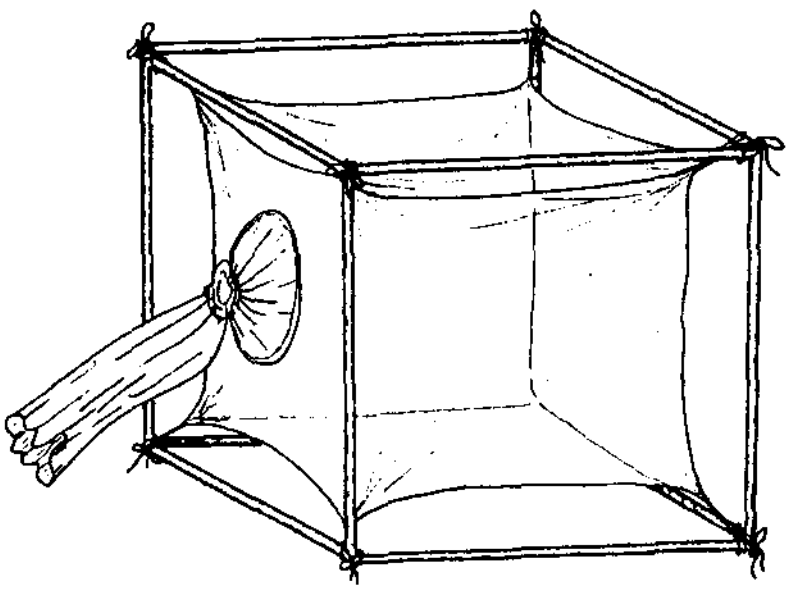

Fig. 27 - Gabbia di mussola con intelaiatura di ferro.

B- CONSERVAZIONE ESEMPLARI.

I flebotomi catturati, morti o uccisi con diverse tecniche dopo la

cattura (etere, cloroformio, basse temperature o luce solare), possono essere conservati in vari modi. Comunemente si usano contenitori con alcool etilico al 70%. Se provengono da catture fatte con carte oleate, i flebotomi prelevati uno ad uno con un apposito pennellino, come già riportato, sono dapprima mantenuti in alcool al 95% fino a quando l'olio di ricino non si è sciolto e quindi passati in alcool al 70%.

Un metodo efficace, se si vuole ottenere buoni preparati per studi tassonomici, è quello di far seccare gli esemplari catturati fra due strati di cotone o di soffice carta. Si può aggiungere qualche cristallo di paradicloro benzene, per meglio conservarli.

Se i flebotomi sono usati per lo studio della potenzialità vettrice ed è necessario quindi isolare leishmanie e phlebovirus, gli esemplari devono essere catturati vivi e conservati a bassissime temperature. L'azoto liquido sembra essere particolarmente adatto a questo scopo.

C- TECNICHE DI MONTAGGIO.

1. Preparati permanenti.

I flebotomi usati per studi tassonomici sono dapprima sottoposti a particolari trattamenti che ne mettono in evidenza le parti chitinizzate e quindi montati in speciali soluzioni per l'osservazione al microscopio. Tali procedure possono essere eseguite con metodi diversi.

1.1 Montaggio in balsamo del Canadà:

Prima di essere montati in questa soluzione, i flebotomi vengono

chiarificati e colorati. Una delle tecniche più usate è descritta da Abonnenc (1972) e consiste nel tenere gli esemplari, conservati dopo la cattura in alcool al 70%, in potassa caustica per qualche ora, a freddo. Dopo aver risciacquato in acqua, sono lasciati per due ore o più nel liquido di Marc Andrè e quindi colorati con fuxina acida (soluzione acquosa all'1%). I flebotomi vengono poi deidratati mediante passaggi successivi in alcool al 70%, 80% e 95% e infine in creosoto. Gli esemplari così trattati sono montati in una goccia di balsamo del Canadà. La tecnica descritta da Fairchild e Hertig (1948) è molto simile alla precedente. Gli esemplari vengono posti in potassa caustica al 10-20% a caldo per pochi minuti o a freddo per qualche ora. Sono poi risciacquati in acqua distillata e colorati in una soluzione satura di fuxina acida in fenolo. Il colorante in eccesso viene rimosso trasferendo gli esemplari in fenolo puro. Il montaggio viene fatto in una miscela di balsamo del Canadà e fenolo. Secondo Young e Perkins (1984) per avere una buona chiarificazione, gli esemplari non devono essere conservati in alcool, ma seccati mediante la tecnica precedentemente descritta. Inoltre, la potassa caustica è sostituita con soda caustica al 10-25%.

Gli esemplari possono essere montati in balsamo del Canadà senza essere colorati, purchè vengano osservati al microscopio a contrasto di fase.

Nelle zone a clima temperato o tropicale secco il balsamo del Canadà si indurisce in poche settimane a temperatura ambiente. Nelle zone con clima caldo umido, invece, i campioni sono tenuti in termostato a circa 37°C per accellerare il processo di indurimento.

Per mantenere a lungo i preparati, i margini del vetrino coprioggetto sono siggillati con dello smalto trasparente, dopo aver eliminato

l'eccesso di balsamo con un ago.

1.2 Montaggio in gomma al cloralio.

La gomma al cloralio è un composto costituito da gomma arabica, idrato di cloralio e glicerina (liquido di Hoyer). A queste sostanze miscelate in proporzioni diverse può essere aggiunto liquido glaciale (liquido di Puri); inoltre, la glicerina può essere sostituita con glucosio per accelerare il processo di purificazione della gomma arabica.

Gli esemplari possono essere montati direttamente dall'alcool e chiarificare quindi nello stesso liquido di montaggio oppure essere sottoposti prima ad un processo di chiarificazione (Quate e Steffan, 1966). A questo scopo possono essere usate varie sostanze:

- KOH, seguendo la procedura precedentemente descritta;
- lattofenolo, che pur dando soddisfacenti risultati, richiede un tempo di azione piuttosto lungo (da alcuni giorni ad una settimana per temperature comprese tra i 40 e i 50°C);
- soluzione di Marc Andrè, lasciata agire per pochi minuti a caldo o per circa due ore a freddo.

Rispetto al montaggio in balsamo del Canadà, quello in gomma al cloralio, grazie alla minore manipolazione degli esemplari, permette di allestire preparati in cui i flebotomi sono integri ed è quindi possibile osservarne le varie strutture nella loro forma e nel loro colore naturale.

1.3 Montaggio in liquido di Faure.

I flebotomi sono lasciati a chiarificare per alcuni giorni in

clorallattofenolo. Oppure seguendo la tecnica elaborata da Corradetti et al. (1961), il preparato deve essere sottoposto ad ebollizione fino a quando il liquido non assume una colorazione brunastra. Dopo il raffreddamento, gli esemplari vengono trasferiti in nuovo clorallattofenolo per 24 ore. Per il montaggio si usa il liquido di Faure così composto:

acqua distillata	$50cm^3$
glicerina	$20cm^3$
gomma arabica	30g
idrato di cloralio	50g

Sul vetrino portaoggetti viene posta una goccia di questa soluzione, nella quale il flebotomo, trasferito direttamente dal clorallattofenolo, viene dissezionato e poi coperto con un vetrino coprioggetto. Quando il liquido di Faure si è indurito, i margini del preparato vengono sigillati con ceralacca, caucciù sciolto in benzolo (Corradetti et al., 1961) o smalto trasparente.

3.2.4 Montaggio in alcool polivinilico (P.V.A.):

I flebotomi sono chiarificati in lattofenolo e montati in una soluzione composta da alcool polivinilico, acido formico, idrato di cloralio e fenolo. Questa tecnica di montaggio, pratica per la sua rapidità, non è però consigliabile per i flebotomi, le cui caratteristiche possono venire alterate quando la soluzione si secca.

3.2. Preparati non permanenti.

Per una identificazione rapida, i flebotomi possono essere montati

in modo provvisorio, cosicchè sia possibile sottoporli ad ulteriori manipolazioni, qualora si renda necessario. Vengono di seguito descritti alcuni dei metodi usati a questo scopo.

2.1 In liquido di Marc Andrè.

Gli esemplari chiarificati in potassa caustica e risciacquati in acqua distillata, sono passati nella soluzione di Marc Andrè (acqua distillata, 30 ml; idrato di cloralio, 40 g; acido acetico cristallizzabile, 30 ml) e montati direttamente in questa, dopo essere stati convenientemente sezionati. La chiarificazione può essere effettuata anche nella sola soluzione di Marc André per 2-8 ore a freddo o per pochi minuti a caldo (Leger, 1983).

2.2 In clorallattofenolo.

I flebotomi vengono lasciati chiarificare in clorallattofenolo (2 parti di cloralio, 1 parte di fenolo, 1 parte di acido lattico) a temperatura ambiente per qualche giorno o a 40°C circa per un tempo minore. Gli esemplari sono poi montati nello stesso liquido che, grazie al suo basso indice di rifrazione, permette una buona visione della struttura interna del flebotomi. Inoltre, dà turgore agli esemplari, mantenendo i normali rapporti fra gli organi (Langeron, 1949).

Una volta effettuata l'identificazione, poichè gli insetti tenuti per molto tempo in queste sostanze si deteriorerebbero, vengono allestiti i preparati definitivi.

Quando il flebotomo viene posto sul vetrino portaoggetti in una goccia del liquido prescelto per il montaggio, prima di coprire con il vetrino coprioggetti, si cerca di metterne in evidenza le strutture che più interessano. Con l'aiuto di aghi sottilissimi, la testa viene staccata dal resto del corpo e posta con la parte ventrale in alto, in modo che il faringe e il cibarium siano ben visibili. Torace e addome sono disposti lateralmente con gli arti e le ali distesi. Nei maschi l'ipopigio può essere scisso dal resto dell'addome, o comunque disposto in modo tale da mettere in evidenza le guaine peniene.

BIBLIOGRAFIA

ABONNENC, E. 1972. Les phlébotomes de la Région Ethiopienne (Diptera, Psychodidae). Memories ORSTOM, n. 55, Paris.

BAILEY, S.F. 1966. A suction type collecting apparatus for mosquitoes. Mosq. News, 26: 585.

BARRAUD, P.J. 1929. A simple method for the carriage of living mosquitoes over long distances in the Tropics. Indian J. Med. Research, 28: 281-285.

BELLAMY, R.E. & REEVES, W.C. 1952. A portable mosquito bait-trap. Mosq. News, 12(4): 256-258.

BIERI, M., DELUCCHI, V. & LEINHARD, C. 1978. Ein obgeänoberter Macfayden-Apparat für die dynamische Extraktion von Bodenerthropoden. Bull. Soc. Entomol. Suisse, 51: 119-132.

BUTTIKER, W. 1979. An improved sampling method for phlebotomine sandflies developed in Saudi Arabia. Bull. Soc. Entomol. Suisse, 52: 117-120.

CARVER, H.D. 1967. A portable aspirator for collecting mosquitoes. Mosq. News, 27(3): 428-429.

CHANIOTIS, B.N. & ANDERSON, K. 1968. Age structure, population dynamics and vector potenzial of Phlebotomus in northern California. Part. II. Field Population Dynamics and natural flagellate infectious in parous females. J. Med. Entomol, 5: 273-292.

CHANIOTIS, B.N. 1983. Improved trapping of phlebotomus sandflies (Diptera, Psychodidae) in light traps supplemented with dry ice in a neotropical rain forest. J. Med. Entomol, 20(2): 222-223

CHANIOTIS, B.N., CORREA, M.A., TESH, R.B. and JOHNSON, K.M. 1971a. Daily and seasonal man-biting activity of phlebotomus sandflies in Panama. J. Med. Entomol., 8(4): 415-420.

CHANIOTIS, B.N., NEELY, J.M., CORREA, M.A., TESH, R.B. & JOHNSON, K.M. 1971b. Natural population dynalics of phlebotomus sandflies in Panama. J. Med. Entomol., 8(4): 339-352.

CHANIOTIS, B.N., TESH, R.B., CORREA, M.A. and JOHNSON, K.M. 1972. Diurnal resting sites of phlebotomus sandflies in a Panamanian tropical forest. J. Med. Entomol., 9: 91-98.

CHANIOTIS, B.N., CORREA, M.A., TESH, R.B and JOHNSON, K.M. 1974. Horizontal and vertical movements of phlebotomus sandflies in a Panamanian rain forest. J. Med. Entomol., 11(3): 369-375.

COLUZZI, M. & PETRARCA, V. 1973. Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and other insects. Mosq. News., 33(2): 249-250.

CORRADETTI, A., NERI, J., VEROLINI, F., PALMIERI, C., PROIETTI, A.M.. 1969. Procedimento tecnico per lo studio del faringe dei flebotomi e descrizione dei faringi dei flebotomi italiani. Parassitologia, 3(1-2):101-103.

DAVIES, J.B. 1973. A simple battery operated suction trap for insects attracted to animal, light or chemical bait. Mosq. News, 33(1): 102-104.

DELL'UOMO, G. 1961. Un catturatore automatico per insetti per uso di laboratorio. Riv. Parassit., 22: 75-77.

DELL'UOMO, G. 1967. Un aspiratore portatile per cattura di zanzare, azionato a batteria. Riv. Parassit., 28(3): 221-223

DERGACHEVA, T.I. 1980. Field methods of studies of sandflies in leishmanioses foci. WHO Travelling Seminar on Leishmanioses Control, Moscow.

DISNEY, R.H.L. 1966. A trap for phlebotomine sandflies attracted to rats. Bull. Ent. Res., 56: 445-451.

FAIRCHILD, G.B. & HERTIG, M. 1948. An improved method for mounting small insects. Science, 108: 20-21.

GRADONI, L., POZIO, E., GRAMICCIA, M., MAROLI, M. & BETTINI, S. 1983 . Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, Rattus rattus, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77(4): 427-431.

GREPIN, G. et GONZALEZ J.P. 1984. Une aspirateur èlectrique pour la collect des phlébotomes. Archs. Inst. Pasteur Tunis, 61: 447-452.

HANSON, W.J. 1961. The breeding places of Phlebotomus in Panama (Diptera, Psychodidae). Ann. Ent. Soc. Amer., 54: 317-322.

HATI, A.K., MANJULIKE AUDDY, DAS, S. & GHOSH, K.K. 1982. A new simple technique for detection of sandfly larval in nature. Document WHO/VBC/82.855.

HEISCH, R.B. 1954. Studies in Leishmaniosis in East Africa. I. The epidemiology of an outbreak of kala-azar in Kenya. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 48(5): 449-469.

HUSBANDS S.C. and HOLTEN J.R.1967. An improved mechanical method of aspirating insects. Calif. Vector. Views., 14: 78-80.

JACKSON, S.C. & GROTHAUS, R.H. 1971. A combination aspirator and killing tube for collecting mosquitoes and other insects. Mosq. News, 31(1): 112-113.

KIRK, R. & LEWIS, D.J. 1940. Studies in Leishmaniasis in the Anglo-Egyptian Sudan. III. The Sandflies (Phlebotomus) of the Sudan. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 36(6): 623-634.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. (1968). Laishmaniasis in Brazil: 1. Observations in enzootic rodent leishmaniasis-incrimination of Lutzomyia flaviscutellata (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 62(2): 385-395.

LAINSON, R., SHAW, J.J., WARD, R.D. & FRAIHA, H. 1973. Leishmaniasis in Brazil: IX. Considerations of the Leishmania brasiliensis complex: importance of the sandflies of the genus Psychodopygus (Mangabeira) in the transmission of L.brasiliensis in north Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 67(2): 184-196.

LANGERON, M. 1949. Précis de Microscopie. Masson et Cie. Edit., Paris.

LEGER, M., PESSON, B., MADULO-LEBLONA, G. & ABONNENC, E. 1983. Sur la differentiation des femelles du sous-genre. Larroussius Nitzulescu, 1931 (Diptera-Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 58(6): 611-623.

McCOMBIE-YOUNG, T.C., RICHMOND, A.E. & BRENDISH, G.R. 1926. Sandflies and sanfly fever in the Peshower District. Indian Jour. Med. Res., 13: 961-1021.

MACFAYDEN, A. 1961. Improved Funnel-type extractor for soil arthropods. J. animal ecology, 30: 171-184.

MAROLI, M. & BETTINI, S. 1977. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). I. An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 71(4): 315-321.

PERFIL'EV, P.P. 1968. Fauna of USSR, Diptera, Phlebotomidae (sandflies). Ed. O. Theodor, Wiener Bindery Ltd., Jerusalem.

POZIO, E., GRADONI, L., BONARELLI, R., SQUITIERI, N., BETTINI, S., MAROLI, M. & COCCHI, M. Indagine sui focolai larvali dei flebotomi in Provincia di Grosseto. Atti XII Congr. Naz. Entomol, 2: 395-400.

QUATE, L.W. 1964. Phlebotomus sandflies of the Paloich area in the Sudan. (Diptera, Psychodidae). J. Med. Entomol., 1(3): 213-268

QUATE, L.W. & STEFAN, W.A. 1966. An alternative method of mounting Phlebotomus and other small Diptera. J. Med. Entomol., 3(2): 126.

RIOUX, J.A. & GOLVAN, V.J. 1969. Epidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. Monographie de INSERM, n. 37, Paris.

RIOUX, J.A., KILLICK-KENDRICK, R., LEANY A.J., TURNER, D.P., BAILLY, M. & YOUNG, C.J. 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 12. Dispersion transversale de Phlebotomus ariasi, 1921. Experiences preliminnaires. Ann. de Parasit., 54(6): 673-682.

ROSS, D. & SERVICE M.W. 1979. A modified monks wood light trap incorporating a flashing light. Mosq. News, 39(3): 610-616.

RUTLEDGE, L.C. & MOSSER, H.L. 1972. Biology of immature sandflies (Diptera, Psychodidae) at the bases of trees in Panama. Environ. Entomol., 1(3): 300-309.

SAYEDI RASHTI, M.A. & NADIN, A. 1972. The use of Macfayden's tecnique for the collection of sand-fly larvae. Bull. Soc. Path. Exot., 65: 881-884.

SERVICE, M.W. 1976. Mosquito ecology. Field sampling methods. Applied Science Publishers, LTD, London.

SERVICE, M.W. & HIGHTON, R.B. 1980. A chemical bait trap for mosquitoes and other biting insects. J. Med. Entomol., 17(2): 183-185.

SHAW, J.J. & LAINSON, R. 1968. Leishmaniasis in Brazil: II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower Amazonian region. The feeding habits of Lutzomyia flaviscutellata in reference to man, rodents and other animals. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 62(3): 396-405.

SHAW, J.J. & LAINSON, R. 1972. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of Lutzomyia flaviscutellata in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (Leishmania mexicana amazonensis). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 66(5): 709-717.

SHAW, J.J., LAISON, R. & WARD, R.D. 1972. Leishmaniasis in Brazil:VII. Further observations on the feeding habits of Lutzomyia flaviscutellata (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at differents heights. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 66(5): 718-723.

SUDIA, W.A. & CHAMBERLAIN, R.W. 1962. Battery-operated light trap: an improved model. Mosq. News, 22(2): 126-129.

TESH, R.B., CHANIOTIS, B.N., ARONSON, M.D. & JOHNSON, K.M. 1971. Natural host preferences of Panamian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. Am. J. Trop. Med. Hyg., 20(1): 150-156.

THATCHER, V.E. & HERTIG, M. 1966. Field studies on the feeding bahits on diurnal shelters of some Phlebotomus sandflies (Diptera: Psychodidae) in Panama. Ann. Ent. Soc. Amer., 59: 46-52.

THATCHER, V.E. 1968. Studies of phlebotomus sandflies using castor oil traps baited with panamian animals. J. Med. ent., 5(3): 293-297.

THEODOR, O. 1958. Die Fliegen der Palalarktischen Region. Lief 201, 9C. Psychodidae, Phlebotomine, E.Schweizerbartsche Verlafshrchhandlung, pp. 1-55

TRPIS, M. 1968. A suction apparatus for collecting mosquitoes and other insects. Mosq. News, 28: 647-648.

TURNER, E.R. & HOOGSTRAAL, H. 1965. Leishmaniasis in the Sudan Republic: 23. Sandflies (Phlebotomus) attracted to roden-baited traps (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol., 2(2): 137-139.

WARD, R.D., SHAW, J.J., LAINSON, R. & FRAIHA, H. 1973. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the phlebotomine faune of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis in the Serra dos Carajas, Para State. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 67(2): 174-183.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1975. Manual on Practical Entomology in malarie, Parte II. Mehotds and Techniques, Geneva, pp. 1-191.

YOUNG, D.G. & PERKINS, P.V. 1984. Phlebotomine sandflies of North America (Diptera: Psychodidae). Mosq. News, 44: 263-306.

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei rapporti ISTISAN è dei singoli autori

La riproduzione parziale o totale dei "Rapporti ISTISAN"
deve essere preventivamente autorizzata dai
competenti Direttori di Laboratorio o Servizio
e dal Direttore dell' Istituto Superiore di Sanità

Stampato dalla Biblioteca - Settore editoriale
dell' Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Roma, maggio 1986