

**Studies on the vectors of arthropod-borne viruses  
in central Italy: investigations on ticks (\*)**

GIUSEPPE SACCA, M. LUISA MASTRILLI(\*\*), MARCO BALDUCCI, PAOLA VERANI  
and M. CLOTILDE LOPES

*Department of Parasitology and Department of Microbiology*

**Summary.** — Following investigations on arbovirus vectors in Central Italy, nine strains of the same virus have been isolated from *Haemaphysalis punctata* collected in a hilly country in the Latina province, where goats and other domestic animals graze. A study has been conducted on bionomics of this vector and related species, which appear to be active in this area from autumn throughout all winter. These tick species are successfully reared in laboratory. The isolated viruses are now under study and it has been stated that they do not belong to the TBE complex.

**Riassunto** (*Studi sui vettori di arbovirus nell'Italia centrale: ricerche sulle zecche*). — Dal 1964 è stata condotta una ricerca sulle zecche della Provincia di Latina, per stabilire l'eventuale presenza di vettori di arbovirus. In un lavoro precedente, è stata dimostrata sierologicamente la circolazione di alcuni arbovirus, uno dei quali è trasmesso dalle zecche. In effetti, ulteriori ricerche hanno permesso di isolare alcuni virus da *Haemaphysalis punctata* Canestrini e Fanzago.

I virus isolati, in numero di 9, sono risultati eguali tra loro, ma diversi dal virus della Encefalite Centro-europea da zecche (TBE).

Delle zecche del genere *Haemaphysalis*, *H. punctata* risulta essere la specie più abbondante; mentre *H. sulcata* e *H. otophila* sono notevolmente più rare. Tutte e tre le specie abitualmente si nutrono su animali domestici (capre, pecore e bovini) sebbene alcuni esemplari di *H. punctata* siano stati anche raccolti su *Erinaceus europaeus*. Le zecche digiune sono attive dal

(\*) Communication presented at the 13th International Congress of Entomology - Moscow, August 2-9, 1968.

(\*\*) Guest of the Department of Parasitology.

principio dell'autunno e durante tutto l'inverno; sono state anche raccolte su terreno parzialmente coperto di neve e ghiaccio. La loro attività cessa durante i mesi più caldi, ma riprende in Settembre, quando la temperatura è di poco inferiore a quella estiva. La zona di raccolta è collinosa, con altitudini di 200-900 metri tra i monti Ausonii ed è parzialmente coperta da pascoli e boschi, frequentati da animali domestici, specialmente capre.

*Haemaphysalis* spp. ed altre zecche vengono ora allevate in laboratorio usando principalmente il riccio (*Erinaceus europaeus*) quale ospite per tutti gli stadi.

#### INTRODUCTION

The lack of available information on arbovirus circulation in our country prompted recent trials for the isolation of these viruses from several arthropods. Preliminary work carried out in Central Italy with human and animal sera demonstrated the circulation of viruses; at least one of these viruses is known to be transmitted by ticks (VERANI *et al.*, 1967; BALDUCCI *et al.*, 1967). In fact, further study has enabled us to obtain several isolates from *Haemaphysalis punctata* Canestrini & Fanzago collected in a hilly country in the Latina province (South of Rome), among the Ausonii mountains, where we had previous serological evidence of the circulation of a virus of the Tick-Borne Encephalitis complex (T.B.E.). These hills are of volcanic nature; their surface is partly covered with bushes interspersed with bare or almost bare rocks (Plate I). It is a rather poor area, inhabited mainly by shepherds, who practise agriculture by primitive means. The land is partly covered by low woods of oak, *Robinia*, *Crataegus*, wild pears and various other trees and shrubs. It is one of the few areas in Central Italy which still retains a rich wild fauna such as boar, porcupine and smaller mammals, as well as local and migratory birds.

The Italian species of *Ixodidae* have been reviewed in a monograph (STARKOFF, 1958). Nevertheless more information is needed on their distribution, taxonomy and biology; particularly no information was available for our country on ecology, seasonal activity and relation to diseases; rearing experience was practically nil.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Collection of ticks.*

Tick collections have been made at weekly intervals in various parts of the area. Ticks have been collected on grazing animals or on captured wild hosts; some species were also captured in fair number on the ground and on the vegetation as unfed active forms, with a white blanket.

All the specimens were classified alive, using a Petri dish filled with ice, on whose surface each specimen was placed and observed under a binocular microscope.

#### Rearing of ticks.

The fed specimens and part of the unfed ones were used for rearing experiments, using hedgehogs, 4-10 day old baby mice, sheep or lizards as laboratory hosts. The hedgehog (*Erinaceus europaeus*) was the most suitable host found for all stages of *Ixodes (ricinus and hexagonus)* and of *Huemaphysalis (punctata and otophila)*. It was also suitable for larvae and nymphs of larger ticks but not for adults, since the engorged females are hurt by the spines of the host. It is easily adapted to live in small cages, even for two years, provided it is given abundant food (70-80 grams of raw meat, milk and fruits). The hosts were maintained in cages placed in plastic containers partially filled with water (Fig. 1).

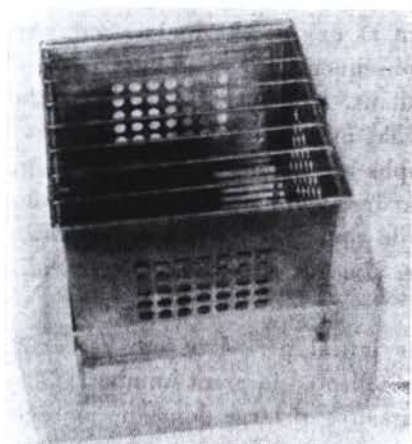


Fig. 1. — Rearing ticks by hedgehog.

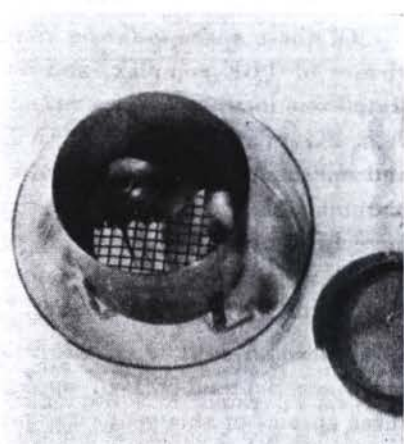


Fig. 2. — Rearing ticks by suckling mice.

The females of large species were fed on sheep by means of pierced metal dishes fixed to a flank of the host.

Baby mice, 4-10 day old, were particularly adapted for larvae and nymphs of *H. otophila* which engorge in a few hours. For ticks which feed more slowly (*Ixodes* or *H. punctata*) it is necessary to introduce the mother mouse from time to time into the cage; but she tends to reduce the number of ticks infesting her litter. Smaller cages than those used for hedgehogs were employed (Fig. 2).

Lizards (*Lacerta muralis* and *L. viridis*) have shown to be suitable hosts for rearing larvae and nymphs of *Ixodes ricinus*.

*Virus isolation and serological tests.*

Most of the unfed specimens were pooled in groups, ground in Hank's solution with 0.75 % bovine albumin (or 10 % rabbit serum) and inoculated into one-day-old mice, in order to attempt virus isolation. The techniques followed for virus isolation and identification, as well as for serological tests, are described in a previous paper (BALDUCCI *et al.*, 1967).

## RESULTS

*Collection of ticks.*

During three years of research, ten species of ticks have been found, viz: *Haemaphysalis punctata*, *H. otophila*, *H. sulcata*, *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. bursa*, *Boophilus calcaratus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum*.

Of these species, *Ixodes ricinus*, known as one of the main vectors of viruses of TBE complex, and on which consequently we had first concentrated our interest, was not the most abundant. It is active throughout the year, except during summer; it has two peaks of activity, one in December and one in April (Fig. 3). Adults and nymphs are mainly parasites of large mammals and may bite man with a certain frequency; larvae and nymphs have been often found feeding on small wild mammals (*Apodemus*, *Rattus*, *Erinaceus*), on birds (*Turdus*) and on reptiles (*Lacerta muralis*, *Lacerta viridis* and various species of snakes).

*Haemaphysalis* were scarce during the initial period of our research, but since September 1967 specimens were collected in great number. The three species of this genus are primarily parasites of large domestic animals (sheep, goats, cattle, horses, donkeys); only few specimens were collected on small wild mammals.

*H. punctata* was by far the most abundant; several larvae and nymphs and one female of this species were collected on the hedgehog. A total of 5,849 specimens were collected mainly during September, October and November, 1967. It appeared more rare, or less active, during the other months. The peak of activity, assessed through the collection of the unfed forms, is in November. After a sudden awakening, there is a gradual decrease of activity until May (Fig. 3).

*H. otophila* seemed to be active mainly in winter. Most collections were made in January, even when soil was partly covered by snow. It has been collected on domestic animals, but so far only 660 specimens have been found.

*H. sulcata* seemed quite rare. We collected only 162 specimens. Of 120 found on hosts (mainly on goats and cattle during winter,) 114 were males and 6 were females.

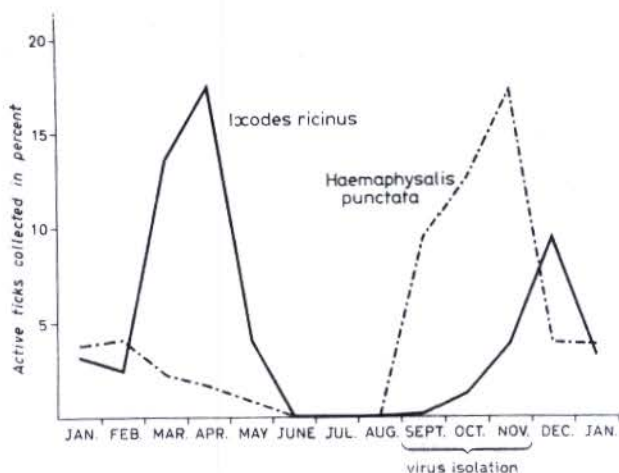


Fig. 3. — Seasonal activity of *Haemaphysalis punctata* and *Ixodes ricinus* in Central Italy expressed as number of active unfed specimens collected per man-hour (monthly averages).

#### Isolation of viruses.

1,467 *I. ricinus* ticks were processed and no viruses were isolated from them.

From a total of 2,170 adults of *H. punctata*, collected in September, October and November 1967, and pooled in groups of about 33 specimens each, we isolated 9 viruses. From 931 specimens (among which 247 were *H. otophila*) collected in the same area during the next five months, no isolates were obtained (Table 1).

All pooled ticks were unfed, having been collected either on the soil by the blanket method or on domestic animals (mainly goats), before engorging.

The nine isolated viruses have not yet been identified, nevertheless:

- 1) They have been recognized by serological tests as nine strains of the same virus;
- 2) They do not belong to the TBE complex;
- 3) Sera of a high percentage of domestic animals grazing in the area (about 70%) have hemagglutination-inhibition antibodies against this virus;

(4). We do not as yet know the potential pathogenicity of this virus for man; however a low percentage of human sera in the area contains antibodies against the new isolate.

TABLE 1.

Arbovirus isolation from «*Haemaphysalis punctata*»  
from September 1967 until April 1968

Month	Number of ticks	Number of pools	Number of isolates	Minimal infection rate	
September . . . . .	673	26	4	0.59 %	
October . . . . .	646	19	1	0.15 %	
November . . . . .	851	20	4	0.47 %	
December . . . . .	455	11	0	} 0.41 %	
January . . . . .	212	} (*)	5		0
February . . . . .	111		3		0
March . . . . .	41		1		0
April . . . . .	112		3		0
Total . . . . .	3,101 (*)		88	9	0.29 %

(\*) Of which 247 *H. otophila*.

#### Rearing of ticks.

The technique of rearing has received special attention in view of possible laboratory trials for experimental transmission of viruses. We have now established laboratory strains of most of the species found.

Colonies of *H. punctata*, *H. otophila*, *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *Dermacentor marginatus* have been established using hedgehogs, sheep, baby mice or lizards as laboratory hosts. Data on the development of ticks under experimental conditions were collected, especially for *I. ricinus*, *H. punctata* and *H. otophila*.

The duration of feeding varied remarkably in each species and it was also affected both by the biological stage of the parasite and by the species of the host. As a rule, a blood meal was taken up in shorter time by the early stages as compared with the adult ticks. The shortest feeding time occurred in larvae of *H. otophila*, which may engorge on baby mouse only in two hours, the longest in *I. ricinus* nymphs, whose blood meal on lizard may last a maximum of 31 days.

Moulting of engorged ticks took place after a maximum of 310 (*I. ricinus*), 300 (*H. punctata*), 22 (*H. otophila*) days respectively, with a very wide range in the first two species.

Resting periods after moulting did not exceed a few days in all cases.

Fasting larvae of *I. ricinus* were more resistant (one year at a temperature of 4°-10°C) than nymphs and adult ticks of the same species. *H. punctata* and *H. otophila* resulted comparatively less resistant.

TABLE 2.

Development of ticks under experimental conditions (22°C, 95% r. h.) and on various hosts: days for egg hatching, time of feeding and moulting, minimum resting period and maximum length of life of unfed ticks at low temperature.

	Egg hatching	Feeding time in days	Moulting time in days	Minimum resting period in days	Maximum length of life in days
<i>I. ricinus</i> . . . . .	38-74	♀ ♀ 7-15 (hh)	—	7	166
		n. 5-8 (hh) 11-31 (L) 4-8 (bm)	50-310	11	310
		l. 4-8 (hh) 8-22 (L) 2-9 (bm)	15-90	9	365
<i>H. punctata</i> . . . . .	24-80	♀ ♀ 6-30 (sh; hh)	—	5	240
		n. 4-7 (hh)	7-300	5	250
		l. 3-5 (hh)	14-210	2	—
<i>H. otophila</i> . . . . .	25-36	♀ ♀ 4-14 (sh; hh)	—	3	180
		n. 3-24 hours (bm; hh)	17-22	3	75
		l. 2-22 hours (bm) 3-24 hours (hh)	15-20	2	—

n. = nymphs l. = larvae.

(In parenthesis, hosts: hh = hedgehog, L = lizard, bm = baby mouse, sh = sheep).

On the basis of the data collected (Table 2), the duration of one generation, under experimental conditions, may range, in theory, from 143 to 1,383 days in *I. ricinus*, from 70 to 1,122 days in *H. punctata* and from 70 to 349 days in *H. otophila*.

#### CONCLUSIONS

The isolation of an arbovirus from a tick has never been reported in Italy. Nevertheless, among the ticks known as members of the Italian fauna is *Ixodes ricinus*, which is considered one of the most important vectors

of viruses of the TBE complex in Europe (PAVLOVSKY, 1940; MORITSCH, 1965; HOOGSTRAAL, 1966; KOZUCH *et al.*, 1967): *Haemaphysalis* ticks so far are considered at most as secondary vectors of the same viruses. Our data show the circulation in Italy of a virus which is transmitted by *Haemaphysalis punctata* and which most probably was never found in Europe. Thus far, the data on tick biology, distribution and activity as well as the improvement of rearing methods may help further knowledge of virus ecology. In fact more information is needed on the circulation of the virus in nature and on the presence of vectors other than *Haemaphysalis punctata* and on various possible reservoir hosts. Furthermore the pathogenicity of this virus for humans and domestic animals has still to be investigated.

*Addendum.* — After the preparation of the manuscript, Dr. J. Casals (Yale Arbovirus Research Unit, W.H.O. Reference Center, New Haven, Connecticut, U.S.A.), to whom the prototype virus strain was sent for identification, informed us that this virus is indistinguishable from Bhanja virus, which was isolated in India and Nigeria from Ixodid ticks, and about whose properties no published data are available at present.

November 12, 1968.

#### REFERENCES

- BALDUCCI, M., P. VERANI, G. SACCÀ & M.C. LOPES, 1967. Studi sull'ecologia degli arbovirus nelle province di Latina e di Gorizia (1964-1967). *Ann. Ist. Super. Sanità*, **3**, 705-719.
- HOOGSTRAAL, H., 1966. Ticks in relation to human diseases caused by viruses. *Ann. Rev. Entomol.*, **11**, 261-308.
- KOZUCH, O., M. GRESIKOVA, J. NOSEK, M. LICHARD & M. SEKEYOVA, 1967. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bull. World Health Organ.*, **36**, Suppl. 1, 61-66.
- MORITSCH, H., 1965. La meningo-encefalite centro-europea da zecche. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **1**, 647-657.
- PAVLOVSKY, E. N., 1940. Vectors and reservoirs of the virus of the Spring-Summer Tick-borne encephalitis. *Arch. Sci. Biol.*, **59**, 58-71. Abstracted in *Rev. Appl. Entomol.*, **31**, 70 (1943).
- STARKOFF, O., 1958. « Ixodoidea » d'Italia - Studio monografico - Ed. « Il Pensiero Scientifico », Roma.
- VERANI, P., M. BALDUCCI, M.C. LOPES, A. ALEMANNI & G. SACCÀ, 1967. Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in man and animals in Italy. I. Serologic status of human beings and animals in a Central Italian Region (Fondi). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **16**, 203-210.





Plate. I. — Ausonii mountains. Landscapes of the area where virus-carrying *H. punctata* ticks were found.

## **Sterile male method integrated by insecticides for the control of *Musca domestica* L. in the island of Vulcano, Italy (\*)**

P. LUIGI MAGAUDDA (\*\*), GIUSEPPE SACCA and DIEGO GUARNIERA (\*\*)

*Department of Parasitology*

**Summary.** — A trial for the control of *Musca domestica* L. by the release of chemosterilized males, integrated by insecticide application, is in progress in the island of Vulcano, South Tirrenian sea. The experiment has shown that, after a drastic reduction of the fly population from 500,000 to 10,000, obtained by insecticides, the weekly release of 20,000 to 50,000 sterile males has apparently produced the eradication of the flies from the island. After the re-introduction of a new fly population, it has been observed that, although the competition from sterile males in the field does not always act according to the expectation, nevertheless the reproductive rhythm has been slowed down remarkably.

**Riassunto** (*Il metodo dei maschi sterili, integrato con insetticidi, per il controllo di Musca domestica L. nell'isola di Vulcano*). — Un esperimento di campo per la lotta chimica e biologica contro *M. domestica* è in corso nell'isola di Vulcano. Il programma consiste nella riduzione della popolazione naturale mediante l'impiego di un insetticida, seguita dalla immissione in natura di maschi sterili, resistenti allo stesso insetticida.

Come risultato di una fase preliminare, sono state raccolte le seguenti informazioni :

1) l'uso appropriato di un insetticida (striscia al Vapona, contenente DDVP come « fumigante residuo ») ha dato una riduzione drastica della popolazione estiva, da 500.000 esemplari a circa 10.000 e la completa eradicazione della popolazione invernale, stimata in 20.000 esemplari ;

(\*) Communication presented at the 13th International Congress of Entomology, Moscow, August 2-9, 1968.

(\*\*) Istituto di Parassitologia Medica dell'Università di Messina.

2) maschi sterilizzati con sciroppo zuccherino contenente lo 0,05 % di Teps sono stati liberati in natura in numero approssimativamente eguale a quello della popolazione naturale. Essi hanno dimostrato di poter competere in maniera soddisfacente con i maschi normali, causando la sterilità di un numero di femmine proporzionato.

Nell'ottobre 1967, dopo l'interruzione completa della lotta chimica, maschi sterili furono liberati in numero crescente. Essi causarono la sterilità di circa l'85 % delle femmine e in seguito sostituirono gradualmente la popolazione naturale.

Furono lanciati circa 100.000 maschi al mese da dicembre 1967 ad aprile 1968 e circa 200.000 da maggio in poi.

Il 19 aprile furono raccolte alcune femmine in una località vicino al porto: esse erano probabilmente la prole di femmine normali re-introdotte. Costituivano il 4,6 % di tutte le mosche raccolte sul posto, tuttavia, un terzo di tali femmine deposero ova fertili.

In luglio, nelle tre località dell'isola, le femmine era rispettivamente il 28 %, l'8 % e l'1 % della popolazione.

Si è osservato che quando le femmine in natura erano poche, la percentuale di quelle sterili era eccessiva rispetto all'attesa. Questo fatto imprevisto può essere dovuto alla concentrazione in piccole zone circoscritte (focolai di riproduzione) delle mosche appena schiuse, le quali probabilmente cominciano a disperdersi quando già qualche accoppiamento ha avuto luogo: pertanto l'azione competitiva dei maschi sterili, uniformemente distribuiti, incomincia con un certo ritardo.

Tuttavia si è osservato che anche in luglio la popolazione naturale, è ancora sensibilmente lontana dal massimo estivo. C'è quindi da pensare che vi siano una somma di fattori che agiscano in concomitanza con il diminuito grado di fertilità, che nel loro insieme impediscano il normale ritmo riproduttivo.

#### INTRODUCTION

The aim of our work has been that of establishing the extent to which an artificial population of male flies, chemosterilised by TEPA, maintained in nature by repeated releases, is able to compete with the males of a natural population and therefore prevent normal reproductive rhythm in the field.

Previous to present work, chemosterilants for the control of houseflies were used as field baits of various kinds by LABRECQUE, SMITH & MEIFERT (1962); LABRECQUE, MEIFERT & FYE (1963); GOUCK, MEIFERT & GAHAN (1963); SACCÀ & STELLA (1964); SACCÀ *et al.* (1966); LABRECQUE & MEIFERT (1966); MEIFERT *et al.* (1967); DUPORT, COMBIESCO & ENESCO (1968).

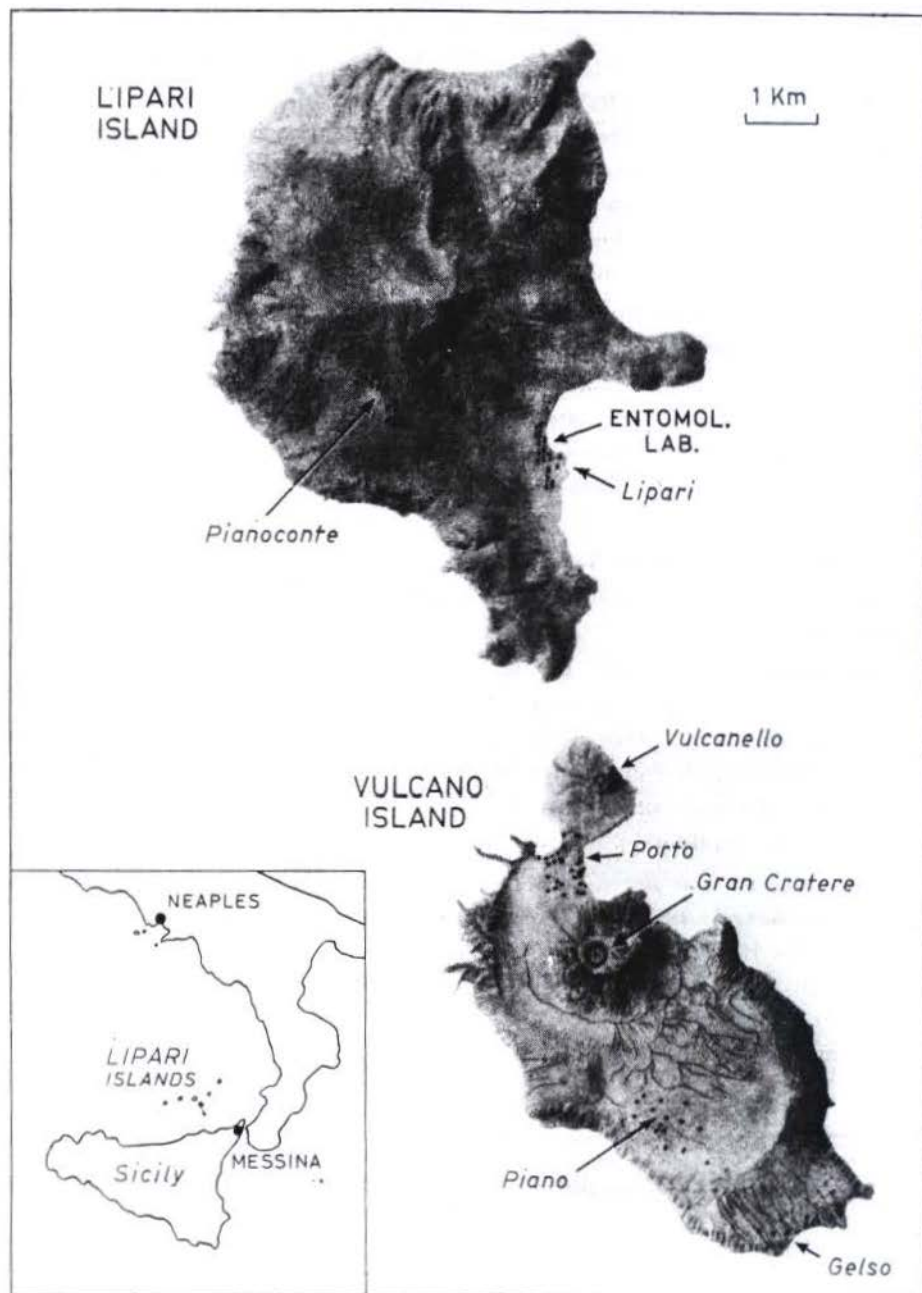


Fig. 1. — The islands of Lipari and Vulcano and their geographic location in the Tyrrhenian sea.

So far no work based on the release of sterile male houseflies was reported in the literature, except by RIVOSECCHI (1962) who carried out a field trial in a small area, releasing for a 2 months' period males sterilized by X rays.

Our work is the first field trial based on the release of chemosterilized male houseflies and the first one providing the integration of this method with the chemical control. We should remind that the concept of sterile method integrated by traditional methods was repeatedly suggested by KNIPLING (1955; 1964), who pointed out as well the opportunity of releasing males resistant to the chemical used in the field.

For our purpose we have chosen the island of Vulcano, in the Lipari's archipelago, in the southern Tirrenian sea, a few miles from Sicily.

The climate in those islands is mild and flies are slightly active even in winter. Vulcano itself has a surface of 19.5 sq. Km. and 400 inhabitants, distributed in three localities: Gelso, Piano and Porto, being the first two ones rural areas and the third one a touristic village, reaching 1.000 persons in summer (Fig. 1).

The fly-population in Vulcano ranges between some 20.000 in winter and 500.000 in late autumn, when the peak is reached in the absence of any control.

The main island of the archipelago is Lipari (Fig. 1), near Vulcano: it has 7 villages reaching a total of 10.000 inhabitants. In the village of Pianoconte we have established our untreated control station, where the fly population ranges from about 20.000 to 300.000. In the main inhabited center, near the port of Lipari, we have installed the entomological laboratory for the production of the biological material.

Our program was necessarily an experiment of integrated (chemical and biological) control, because it was necessary first to reduce the field fly population by insecticides before starting the periodic release of sterile males. Actually only in this way could we introduce flies into the field in numbers which were in the same time overwhelming for the field flies and not excessive from the point of view of people and hygiene.

#### METHODS

Tris (1-aziridiny)-phosphine oxide (TEPA) has been chosen since it is one of the most effective chemosterilants and it doesn't significantly affect the mating competitiveness of the treated males (LABRECQUE, 1961; SACCÀ, STELLA & MAGRONE, 1964 a; b). Flies of both sexes, 0-24 hour old, were fed during 24-36 hours on a 0.05 % solution of this chemical in sugar syrup. At the end of this period, females were discarded and males only were used for field releases.

We have considered it advantageous to use for the production of our sterile males a strain selected with the insecticide used in the field, DDVP, in the form of Vapona strips, introduced into the dwellings at the rate of 1 strip for 30-50 cubic metres. Insecticide treatment was discontinued when, during winter 1966-67, flies resulted eradicated from the island (SACCÀ, MAGAUDDA & GUARNIERA, 1967); when flies were re-introduced, reaching about 20,000 at the end of July, a slight chemical control was applied (Vapona strips, only in the kitchens) in order to maintain their number under a moderate level.

Weekly releases of sterile males were performed since the end of July and, in the beginning, their number was approximately equal to that of the fly population in the field.

In October, the insecticide treatment was withdrawn and at the same time the releases were increased and the following month 8 releases of about 18,000 males, properly distributed in the three localities of the island, have been performed. Later on, releases were continued according to the program (see Table 1).

Estimates were periodically carried out in order to assess the consistency of the field population, by the « mark-release-recapture » method, according to FORD (1964). The sex ratio and the fertility rate were checked in the field at weekly intervals.

TABLE 1.

Summary of sterile male releases in Vulcano, percent of field collected females in Vulcano and in Lipari (control) and percent of fertile females in Vulcano from November 1967 until June 1968.

Month	Total released per month	Frequency of release	Percent field collected ♀♀		Percent fertile ♀♀ in Vulcano
			Vulcano	Lipari (contr.)	
November . . .	142,000	twice weekly	5.5 (3,854)	47.5 (307)	14.6 (41)
December . . .	93,000	weekly	1.5 (1,382)	48.4 (833)	25 (12)
January . . . .	75,000	»	0 (443)	29.6 (135)	—
February . . . .	80,000	»	0 (1,283)	56.9 (422)	—
March . . . . .	100,000	»	0 (3,256)	64.4 (292)	—
April . . . . .	90,000	»	1.7 (2,305)	44.9 (345)	35 (23)
May . . . . .	191,000	twice weekly	5.2 (7,751)	55.3 (438)	38 (149)
June . . . . .	216,000	»	9.3 (5,655)	51.6 (391)	44.5 (362)
			(in parenthesis, total flies collected).		(in parenthesis, egg batches examined).

During the preliminary phase of the work we realized how important is the careful distribution of the flies released into the field; they actually tend to concentrate in the few dwellings close to each release point. Therefore, 15 release points were chosen all over the island; furthermore, in order to compell the flies to disperse over a large area, special care has been taken in establishing the release points themselves not too close to the dwellings.

## RESULTS

In summer 1967 we could ascertain that in the field the number of females laying sterile eggs was approximately proportional to that of sterile males released. This seemed to confirm the competitive activity of those males. In that phase their number was more or less equal to that of the field population (SACCÀ, MAGAUDDA & GUARNIERA, 1967). When, in October 1967 the chemical control was discontinued, our fly population consisted of about 40,000 individuals, out of which 12,000 were estimated to be field produced flies and 28,000 laboratory produced sterile males.

The results during November were encouraging, since during three weeks all the females collected were unfertilized. Moreover, the females in our field collections represented only a small percent of the whole, showing a wild population of a few hundred individuals. Nevertheless, a few fertile individuals were found between the end of November and the beginning of December (Table 2).

TABLE 2.

Fertile females collected during 27 Oct. - 8 Dec. 1967, preceding complete lack of field collections (in parenthesis, total number of females laying eggs).

Date	Locality			Total
	Porto	Piano	Gelso	
27 October	4 (9)	2 (6)	3 (8)	9 (23)
1st November	—	1 (8)	4 (16)	5 (24)
3rd November	1 (2)	0 (1)	2 (3)	3 (6)
10 November	0 (5)	1 (5)	0 (3)	1 (13)
15 November	0 (2)	0 (5)	0 (1)	0 (8)
17 November	0 (4)	0 (3)	—	0 (7)
23 November	0 (2)	0 (4)	1 (6)	1 (12)
30 November	2 (6)	1 (4)	1 (4)	4 (14)
2 December	0 (1)	1 (5)	—	1 (6)
6 December	0 (3)	0 (1)	1 (4)	2 (8)
8 December	—	—	0 (1)	0 (1)
Total	8 (33)	6 (42)	12 (46)	26 (121)

Since the 8th of December, no further females were collected in the field, showing the apparent eradication of field population. Previous to this event, our last field estimate gave less than 10,000 flies in the field, out of which only 1.5 % were females.

During the following three months, releases were continued; the field collections (over 6,000 males) did not yield a single female, while in the control village flies were quite abundant and the *sex ratio* was 1 : 1 according to the expectation (Table 1).

In 19th April a few females were found in one locality, Porto, being probably the offspring of re-introduced normal females. They amounted 4.6 % of the total flies collected at the spot, the remainder 95.4 % being estimated as 90.8 % sterile males and 4.6 % normal males. Moreover, they were less than 2 % of the flies collected in the whole island. Nevertheless, about 35 % of these females laid fertile eggs (Table 1).

The following month, females slightly increased and some appeared in the second locality, Piano (Table 1). From that time, the percent of females in the population has gradually increased both in Porto and in Piano, and their fertility is over 40 %. Occasional females are collected in Gelso, and about 20 % of them are fertile.

In July, the frequency of the females in Porto, Piano and Gelso and the percent of fertile females in the three localities appears contradictory, the first datum being not in accordance with the second one (Table 3).

TABLE 3.

July 1968: sterile males released, percent of females in field population, percent of fertile females, total population estimates and fly density (flies per fly-paper in 24 hours) in the three localities of the island of Vulcano.

Locality	Released	% females in field (in parenthesis total flies observed)	% fertile females (in parenthesis number observed)	Total population estimates (before releases)	Fly density (in fly-papers)
Porto . . . . .	90,000 (10,000 × 9)	27.9 (1339)	56 (141)	8,000 (12-VII) 13,000 (24-VII)	3
Piano . . . . .	90,000 (10,000 × 9)	8.2 (854)	48 (31)	4,000 (12-VII) 12,000 (24-VII)	6.4
Gelso . . . . .	36,000 (4,000 × 9)	1 (902)	28 (7)	1,300 (12-VII) 2,300 (24-VII)	19.2
Control (Pianoconte, Lipari)				174,000 (15-VII) 368,000 (30-VII)	55.5
Total Vulcano . . .	216,000	14.6 (3095)	53.6 (179)		



As a matter of fact, when the percent of normal flies increases and becomes about the same of that of the sterile males released, the percent of sterile females in the population is according to the expectation. In fact, we have now in Porto almost 30 % females, which means a proportion of about 1 female : 1 normal ♂ : 1 sterile ♂. It is found that only 56 % of females are fertile. This is a confirmation of previous field data (SACCÀ, MAGAUDDA & GUARNIERA, 1967). But in all cases, when females (and therefore normal males) are very few, an unexpectedly high proportion of the females are fertile and lay viable eggs.

A few more words regarding fly number in the field. This datum also looked to be far removed from the expectation. According to our estimates, in July 1968 the fly population present in the whole island had risen, from a few hundreds in the beginning of May, to about 4,000 (12th July) or 9,000 (24th July) (\*). This is still very far from the summer peak (in the control locality, 174,000).

#### CONCLUSIONS

The data collected seem difficult to be explained. From one side, there is a sex ratio which seems to be enough to ensure a prevalence of sterile males, on the other side the rate of sterility in the females definitely appears to be insufficient to ensure a control of reproduction.

We could perhaps suggest a hypothesis to explain this phenomenon: although it is true that usually the males chemosterilized are able to compete effectively with the normal ones, nevertheless in the field:

- 1) the chemosterilised specimens are scattered uniformly all over the island, while only few occasional spots represent the breeding places;
- 2) in those, normal flies emerge in a comparatively high concentration and perhaps they don't disperse rapidly after emergence;
- 3) therefore, when they start dispersing, the sexual maturity has already begun and some mating may have occurred among normal flies;
- 4) for that reason, the competition from sterile males, which takes place fully only at that time, cannot be completely effective.

We suspected that perhaps several flies laying fertile eggs and therefore classified as « fertile females » were only partly fertile, due perhaps to double insemination or to insemination by insufficiently chemosterilised males or recovering chemosterilised males (SACCÀ, STELLA & MAGRONE, 1964): but only few egg batches (less than 10 %) give low percent hatching, the remainder being either normally fertile or completely sterile.

(\*) Respectively 13,000 and 27,000 including sterile males (see Table 3).

On the other hand, we know that our chemosterilised males 1) are fully sterile at the moment of the release (they are actually checked each time); 2) do not live enough to recover a certain degree of fertility: as a matter of fact, it has been ascertained that the field survival of our released flies is very low: 50 % are lost after 2-3 days and 95 % after one week. Some occasionally may survive after three weeks. The short duration of their life is due to several factors: age at the releasing day, chemical treatment with TEPA, etherisation for sexing, transportation in small cages etc.

In any case it has to be pointed out that, in spite of the above considerations, the natural increase of population was low and flies were still very few at the end of July 1968. One could not believe that, when the reproductive power of the housefly is reduced as slightly as we found, this might interfere with the normal growth of a population. But most probably there are other factors, acting in the field and the sum of which has some effect. One of them is certainly the delayed date on the annual population build up.

No doubt, much work has still to be carried out before reaching a conclusion in this matter.

November 12, 1968.

#### REFERENCES

- DUPORT, M., I. COMBIESCO & A. ENESCO. 1968. Traitement expérimental sur le terrain de l'espèce *Musca domestica* L., avec le Tiotepa. XIII Intern. Congr. Entomol. Moscow, 2-9 August 1968.
- FORD, E.B., 1964. *Ecological Genetics*. The Broadwater Press Ltd., London.
- GOUCK, H. K., D. W. MEIFERT & J. B. GAHAN, 1963. A field experiment with Apholate as a chemosterilant for the control of house flies. *J. Econ. Entomol.*, **55**, 445-46.
- KNIPLING, E. F., 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.*, **48**, 459-62.
- KNIPLING, E.F., 1964. The potential role of sterility method for insect population control, with special reference to combining this method with traditional methods. *U.S. Dept. Agr.*, ARS-33-98.
- LABRECQUE, G.C., 1961. Studies with three alkylating agents as housefly sterilants. *J. Econ. Entomol.*, **54**, 684-689.
- LABRECQUE, G.C. & D.W. MEIFERT, 1966. Control of houseflies in poultry houses by chemosterilants. *J. Med. Entomol.*, **3**, 323-326.
- LABRECQUE, G.C., D.W. MEIFERT & R.L. FYE, 1963. A field study on the control of housefly with chemosterilant techniques. *J. Econ. Entomol.*, **56**, 150-52.
- LABRECQUE, G.C., C.N. SMITH & D.W. MEIFERT, 1962. A field experiment in the control of houseflies with chemosterilant baits. *J. Econ. Entomol.*, **55**, 449-51.
- MEIFERT, D. W., G. C. LABRECQUE, C. N. SMITH & P. B. MORGAN, 1967. Control of houseflies in some West Indies Islands with Metepa Apholate and Trichlorfon baits. *J. Econ. Entomol.*, **60**, 480-85.
- RIVOSECCHI, L., 1962. Un esperimento sul campo con maschi irradiati di mosca domestica in una zona rurale della provincia di Latina. *Riv. Parassitol.*, **23**, 71.

- SACCÀ, G., P.L. MAGAUDDA & D. GUARNIERA, 1967. Un esperimento di lotta integrata (chimica e biologica) contro *Musca domestica* L., alle isole Lipari. Nota preliminare. *Riv. Parassitol.*, **28**, 295-307.
- SACCÀ, G., A. SCIROCCHI, G.M. DE MEO & M.L. MASTRILLI, 1966. Una prova di campo con il chemosterilante Hempa (Esametifosforammide) contro *Musca domestica* L. *Atti Soc. Peloritana Sci. Fis. Mat. Nat.*, **12**, 457-464.
- SACCÀ, G. & E. STELLA, 1964. Una prova di campo per il controllo di *Musca domestica* L. mediante esche liquide a base del chemosterilante Tapa (Afoxide). *Riv. Parassitol.*, **25**, 279-294.
- SACCÀ, G., E. STELLA & R. MAGRONE, 1964a. Ricerche preliminari sulla azione dell'Afoxide (Ossido di tris- (1-Aziridinil) Fosfato) su *Musca domestica* L. *Parassitologia*, **6**, 1-2.
- SACCÀ, G., E. STELLA & R. MAGRONE, 1964b. Ricerche di laboratorio sulla efficacia sterilizzante del Tapa (Afoxide) e dell'Afolato, in *Musca domestica* L. *Riv. Parassitol.*, **25**, 207-216.

## Caratteristiche dell'effetto letale delle radiazioni X e $\gamma$ sugli spermatogoni B di topo

MARILENA BIANCHI (\*) e MARCELLO QUINTILIANI

*Laboratori di Chimica Biologica*

**Riassunto.** — È stata determinata la sopravvivenza degli spermatogoni B nei testicoli di topi irradiati con raggi X da 220 KV e raggi  $\gamma$  del  $\text{Co}^{60}$ . La curva di sopravvivenza, calcolata in base ai dati relativi alla irradiazione con i raggi X all'intensità di 2,9 rad/min, è una sigmoide caratterizzata da un numero di estrapolazione di 1,3 e da una  $D_0$  di 20,2 rad. La sopravvivenza di spermatogoni B dopo irradiazione  $\gamma$  all'intensità di 4,7 rad/min, 0,3 rad/min e 0,1 rad/min è risultata sovrapponibile, entro i limiti dell'errore sperimentale, a quella ottenuta con uguali dosi di raggi X.

**Summary** (*Characteristics of the lethal effect of X and  $\gamma$  radiation on mouse type B spermatogonia*). — The survival of type B spermatogonia in testes of mice irradiated with 220 KV X-Rays and with  $\text{Co}^{60}$   $\gamma$ -Rays, has been calculated.

The shape of the calculated survival curve for X irradiation at the dose-rate of 2,9 rad/min is sigmoid with a  $D_0$  of 20,2 rad and an extrapolation number of 1,3.

The survival of type B spermatogonia after  $\gamma$  irradiation at 4,7 rad/min, 0,3 rad/min, and 0,1 rad/min was found to be superimposable, within the limits of experimental error, to that observed after equal doses of X rays.

La elevata radiosensibilità delle cellule germinali maschili dei mammiferi allo stato di spermatogoni è nota fin dai primordi della ricerca radiobiologica (REGAUD & BLANC, 1906; SCHINZ & SLOTOPOLSKY, 1925). Dosi assai modeste di radiazioni ionizzanti provocano la morte degli spermatogoni nei testicoli degli animali irradiati: morte che si verifica nella tarda interfase o nella profase, prima che le cellule vadano incontro alla successiva divisione (OAKBERG, 1955a).

(\*) Ospite dei Laboratori di Chimica Biologica.

Nel topo, secondo i dati riportati da OAKBERG nel 1957, la DL 50 degli spermatozoni di tipo A è di 22,5 R di raggi  $\gamma$  e quella degli spermatozoni di tipo B è di 21,4 R. Soltanto gli oociti primari, la cui DL 50 è di 8-9 R, hanno una radiosensibilità più elevata (OAKBERG, 1962).

L'effetto letale sulle cellule germinali appare unicamente dipendente dalla quantità di energia radiante assorbita dalle gonadi. Non è influenzato, infatti, dall'irradiazione delle altre parti del corpo dell'animale oltre i testicoli, nè dagli « stress » derivanti dalle manualità sperimentali (OAKBERG & CLARK, 1961).

Oltre alle caratteristiche ora ricordate, il test della sopravvivenza degli spermatozoni presenta anche quelle di permettere l'impiego di piccoli gruppi sperimentali e di essere indipendente, entro limiti assai ampi, dalla intensità con la quale la dose di radiazioni è stata somministrata (OAKBERG & CLARK, 1961). L'impiego di piccoli gruppi sperimentali deriva non solo dalla elevata riproducibilità della risposta del sistema alle radiazioni, ma anche dal fatto che ciascuna coppia di testicoli offre una larga serie di campioni da analizzare.

Tutte queste caratteristiche fanno sì che la sopravvivenza degli spermatozoni appaia come un test assai adatto per lo studio comparativo della efficacia biologica di differenti tipi di radiazioni, in particolare di radiazioni secondarie che, di norma, sono prodotte in fasci aventi sezione relativamente piccola e flusso alquanto limitato.

Le ricerche che sono qui riportate rappresentano appunto la premessa ad uno studio della *efficacia biologica relativa* di radiazioni secondarie disponibili in fasci di bassa intensità quali neutroni di alta energia e mesoni. Tali ricerche comprendono uno studio comparativo della risposta letale degli spermatozoni B di topo all'irradiazione con raggi X e  $\gamma$  e della influenza delle variazioni della intensità di dose di questi ultimi di un fattore di circa 50 volte. Queste osservazioni presentano un interesse biologico indipendente dal loro ulteriore sviluppo, per cui si è ritenuto utile di farne oggetto di una comunicazione a parte.

Tra l'altro converrà ricordare che l'indipendenza dal fattore intensità di dose era stata fino ad ora descritta solo per gli spermatozoni di tipo A (OAKBERG & CLARK, 1961).

#### MATERIALE E TECNICA SPERIMENTALE

*Materiale biologico.* — Sono stati usati topi adulti di sesso maschile, del ceppo « inbred » C3H/RL/Cas., in età compresa tra le 9 e le 12 settimane, con un peso corporeo oscillante tra i 21 e i 24 g.

*Irradiazione con raggi X e  $\gamma$ .* — Gli animali sono stati sottoposti ad irradiazione totale del corpo entro tubi di centrifuga in plastica, delle dimensioni di  $72 \times 28$  mm e dello spessore di 1,5 mm, opportunamente forati.

Ciascun gruppo sperimentale comprendeva tre animali che erano irradiati simultaneamente, disposti su un apposito supporto di legno.

Quale sorgente di raggi X è stato usato un apparecchio « Stabilipan 250 » operante a 220 KV, 8mA, con filtrazione di 1 mm Cu ; S.E.V. = 1,7 mm Cu. Le irradiazioni con raggi X sono state eseguite alla distanza di 170 cm all'intensità di 2,9 rad/min ed alla distanza di 135 cm alla intensità di 4,7 rad/min.

Per i raggi  $\gamma$  è stata usata una sorgente di telegamma terapia con  $\text{Co}^{60}$  (Picker). Le irradiazioni con raggi  $\gamma$  sono state eseguite alla distanza di 133 cm, all'intensità di 4,7 rad/min ; alla distanza di 196 cm con interposizione di uno spessore di 2,5 cm di piombo, alla intensità di 0,3 rad/min ; e alla stessa distanza con interposizione di uno spessore di 5 cm di piombo, alla intensità di 0,1 rad/min. Gli spessori di piombo erano posti immediatamente all'uscita del collimatore e cioè a 60 cm dalla sorgente.

Le dosimetrie sono state eseguite con un dosimetro « Victoreen ». È stata usata una camera di ionizzazione da 25 R che era posta negli stessi tubi di plastica ove erano ospitati gli animali. Per le misure dei raggi  $\gamma$ , la parte sensibile della camera era ricoperta di perspex dello spessore di 6 mm per raggiungere le condizioni ottimali di equilibrio elettronico.

Le dosi sono state convertite in rad assumendo che  $1\text{R} = 0,93 \text{ rad}$ .

Dopo l'irradiazione gli animali erano mantenuti nelle consuete condizioni di stabulazione ed uccisi per la dislocazione della colonna cervicale a 46 ore dall'inizio della irradiazione stessa. I testicoli erano fissati per 36 ore in liquido di Orth, inclusi in paraffina e sezionati alla spessore di 5  $\mu$ , avendo cura di raccogliere sezioni distanziate tra loro non meno di 20-25  $\mu$ . Le sezioni erano poi colorate con acido periodico-fucsina-acido solforoso (HOCHT-KISS, 1948) e con ematossilina acida di Ehrlich. L'analisi istologica consisteva nella identificazione dei tubuli seminiferi in stadio VII, in base allo aspetto dell'acrosoma (LEBLOND & CLERMONT, 1952a ; b ; CLERMONT & LEBLOND, 1953 ; OAKBERG, 1956a ; b), e nel conteggio degli spermatozoi primari e delle cellule di Sertoli contenuti nella sezione del tubulo in esame. Erano presi in considerazione solo i tubuli tagliati trasversalmente.

La sopravvivenza degli spermatozoi di tipo B è stata valutata a 46 ore dall'irradiazione, tenendo conto delle osservazioni di OAKBERG (1955b) relative al tempo necessario perchè le cellule muoiano in seguito all'irradiazione e perchè ne vengano rimossi i residui necrotici. Le nostre preparazioni infatti non contenevano praticamente cellule necrotiche. Naturalmente occorreva tenere conto, dell'andamento del processo di maturazione e di differenziamento cellulare durante l'intervallo di tempo sopra menzionato (OAKBERG, 1956b), per cui le cellule che erano state irradiate come spermatozoi B, allo stadio IV, erano poi ricercate come spermatozoi primari in preleptotene allo stadio VII. Il conteggio delle cellule di Sertoli

è stato effettuato allo scopo di controllare che la tecnica istologica era stata eseguita correttamente e che non erano intervenuti fatti atrofici tali da alterare sensibilmente il calibro medio dei tubuli seminiferi. Tali cellule infatti sono quanto mai radioresistenti ed il loro numero per sezione di tubulo è costante (OAKBERG, 1959).

Gli animali di controllo sono stati sottoposti alle stesse manualità medie degli altri animali irradiati, compreso un periodo di permanenza nei tubi da centrifuga di 6 ore. Si è osservato che il numero degli spermatoцитi primari non subiva variazioni rispetto ad altri animali lasciati del tutto indisturbati, pertanto tutti i dati relativi agli animali di controllo sono stati combinati tra loro.

### RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati nelle Tab. 1 e 2.

I risultati della esperienza eseguita con i raggi X all'intensità di 2,9 rad/min sono stati utilizzati per calcolare una curva di sopravvivenza degli spermatoцитi di tipo B. È stato calcolato pertanto, con il metodo dei minimi quadrati, il coefficiente di correlazione lineare tra la dose di raggi X

TABELLA 1.

#### Sopravvivenza degli spermatoцитi di tipo B dopo irradiazione con raggi X

Dose in rad	2,9 rad/min			4,7 rad/min		
	Tubuli esaminati	S.P.P./tubulo media $\pm$ D.S.	C.S./tubulo media $\pm$ D.S.	Tubuli esaminati	S.P.P./tubulo media $\pm$ D.S.	S.C./tubulo media $\pm$ D.S.
0	243	33,3 $\pm$ 4,3	9,5 $\pm$ 1,9	243	30,5 $\pm$ 4,2	9,6 $\pm$ 1,4
4,7	169	30,7 $\pm$ 4,6	9,3 $\pm$ 1,9	182	27,3 $\pm$ 3,2	9,1 $\pm$ 1,6
9,3	186	27,9 $\pm$ 3,5	9,4 $\pm$ 1,8	192	23,3 $\pm$ 3,8	9,2 $\pm$ 1,7
14,0	204	20,5 $\pm$ 4,0	9,2 $\pm$ 1,7	182	19,3 $\pm$ 3,9	8,9 $\pm$ 1,3
18,6	216	13,0 $\pm$ 4,8	9,1 $\pm$ 1,7	204	14,9 $\pm$ 3,8	9,1 $\pm$ 1,7
27,9	199	11,7 $\pm$ 5,3	9,3 $\pm$ 1,9			
37,2				268	7,3 $\pm$ 3,3	8,9 $\pm$ 1,6
46,5	213	4,7 $\pm$ 3,1	9,1 $\pm$ 2,0			
65,1	251	1,6 $\pm$ 1,4	9,4 $\pm$ 1,8			
83,7	223	0,7 $\pm$ 0,9	9,3 $\pm$ 1,7			
102,3	269	0,3 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 1,7			

S.P.P. = Spermatoцитi primari in preleptotene.

C.S. = Cellule di Sertoli.

D.S. = Deviazione standard.

TABELLA 2.

Sopravvivenza degli spermatozoni di tipo B dopo irradiazione con raggi  $\gamma$ 

Dose in rad	4,7 rad/min			0,3 rad/min			0,1 rad/min		
	Tubuli esaminati	S.P.P./tubulo media $\pm$ D.S.	C.S./tubulo media $\pm$ D.S.	Tubuli esaminati	S.P.P./tubulo media $\pm$ D.S.	C.S./tubulo media $\pm$ D.S.	Tubuli esaminati	S.P.P./tubulo media $\pm$ D.S.	C.S./tubulo media $\pm$ D.S.
0	243	30,5 $\pm$ 4,0	9,2 $\pm$ 1,8	243	30,6 $\pm$ 4,5	9,5 $\pm$ 1,8	324	31,3 $\pm$ 3,9	9,3 $\pm$ 1,6
4,7	165	28,4 $\pm$ 4,0	9,2 $\pm$ 1,5	180	27,6 $\pm$ 4,0	9,4 $\pm$ 1,8	180	27,1 $\pm$ 3,0	9,3 $\pm$ 1,7
9,3	187	25,9 $\pm$ 4,2	9,1 $\pm$ 1,6	193	24,7 $\pm$ 4,5	9,2 $\pm$ 1,7	190	23,9 $\pm$ 4,1	9,5 $\pm$ 1,5
14,0	188	19,3 $\pm$ 4,2	9,1 $\pm$ 1,6	182	17,9 $\pm$ 5,5	9,3 $\pm$ 1,7	182	19,1 $\pm$ 3,4	9,2 $\pm$ 1,4
18,6	198	15,7 $\pm$ 4,6	9,1 $\pm$ 1,8	220	14,6 $\pm$ 4,7	9,5 $\pm$ 1,7	194	12,9 $\pm$ 4,1	9,2 $\pm$ 1,6
37,2	196	8,1 $\pm$ 3,4	9,2 $\pm$ 1,5	260	7,7 $\pm$ 4,6	9,2 $\pm$ 1,7	268	7,3 $\pm$ 3,8	9,4 $\pm$ 1,5

S.P.P. = Spermatoziti primari in preleptotene.

C.S. = Cellule di Sertoli.

D.S. = Deviazione standard.



e il logaritmo della percentuale di sopravvivenza, utilizzando per il calcolo i valori che riportati su carta semilogaritmica dimostravano di soddisfare un andamento rettilineo: nella fattispecie, quindi, i valori da 28 a 102 rad (KIMBALL, 1953). Quale numero di estrapolazione è stato assunto il valore dell'intersezione della retta calcolata con l'asse delle ordinate.

La curva ottenuta è riportata nella Fig. 1 insieme con i valori medi delle percentuali di sopravvivenza osservate sperimentalmente ed i relativi

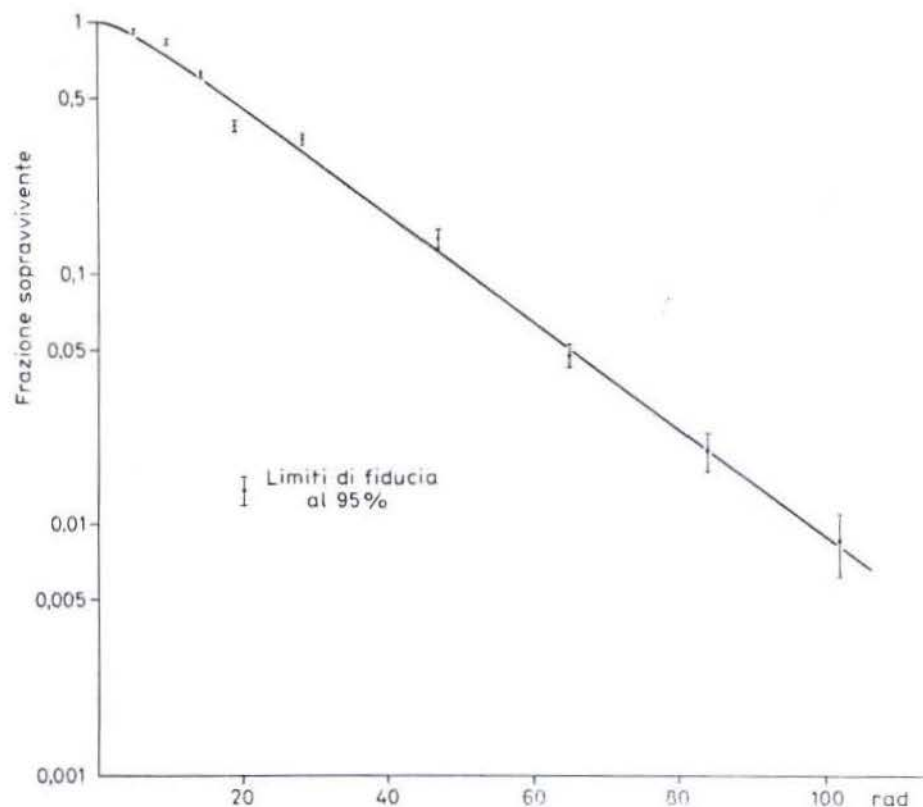


Fig. 1. — Curva di sopravvivenza degli spermatozoni di tipo B irradiati con raggi X alla intensità di 2,7 rad/min.

limiti di fiducia al 95 %. Dalla figura risulta che la curva calcolata rappresenta in modo soddisfacente l'andamento dei valori sperimentali. Detta curva corrisponde alla equazione:

$$S = 1 (1 - e^{-0,04962 D})^{1,3}$$

Da tale equazione si ricava un numero di estrapolazione uguale a <sup>1,3</sup> ed una  $D_0$  di 20,2 rad.

Nella Fig. 2 è stata riportata la parte della curva di sopravvivenza compresa tra 0 e 40 rad insieme con i punti relativi alle percentuali di sopravvivenza osservate in tutte le esperienze qui riportate. Come si può rilevare

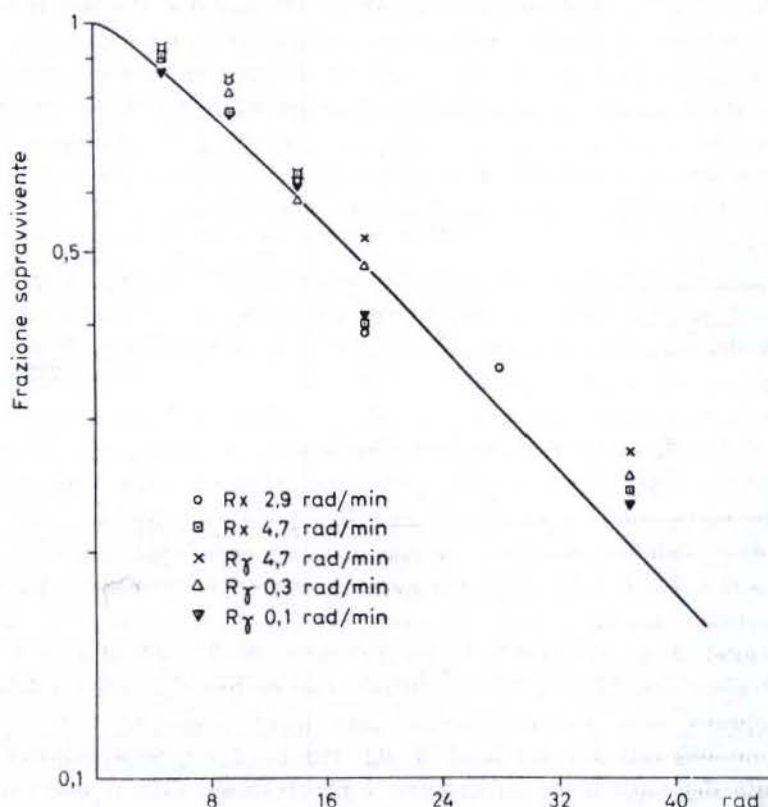


Fig. 2. — Sopravvivenza degli spermatozoni di tipo B irradiati con raggi X e raggi  $\gamma$  del  $\text{Co}^{60}$  a diverse intensità di dose (Nella figura è riportata la curva di cui alla Fig. 1, nel tratto fra 0 e 40 rad).

dalla figura, in tutte le esperienze l'andamento della sopravvivenza degli spermatozoni B appare essenzialmente uguale e quindi può essere rappresentato dalla stessa curva. Tale affermazione ha valore, naturalmente, entro i limiti di dose che sono stati studiati nelle presenti esperienze.

#### DISCUSSIONE

La curva di sopravvivenza degli spermatozoni B di topo calcolata in base ai nostri risultati è molto simile a quella ottenuta da OAKBERG (1957). La curva mostra essenzialmente che gli spermatozoni di tipo B sono cellule altamente radiosensibili con un basso numero di estrapolazione.

La tendenza attuale è quella di mettere in rapporto il numero di estrapolazione con la maggiore o minore capacità che le cellule hanno di riparare il danno da radiazioni. Vari AA. ritengono che sia il danno a livello dell'ADN quello che determina la morte cellulare da radiazioni e che la capacità di riparare tale danno sia un fattore determinante di radiosensibilità (HUTCHINSON, 1966; KAPLAN, 1967). Potrebbe essere perciò attraente mettere in relazione la elevata radiosensibilità degli spermatozoni B con il loro numero di estrapolazione, indice di una ridotta efficienza dei fenomeni riparativi. Tale relazione sarebbe tuttavia per lo meno prematura, mancando a tutt'oggi di una chiara base sperimentale, soprattutto a livello degli organismi superiori.

È quanto mai evidente inoltre, dall'analisi dei risultati qui esposti, la notevole riproducibilità dei dati ottenuti nelle diverse esperienze, la uguale efficacia dei raggi X e dei raggi  $\gamma$  del  $\text{Co}^{60}$  e la indipendenza di essi dalla intensità con la quale ciascuna dose di radiazioni è stata somministrata. Il reperto di una efficacia biologica relativa uguale a 1 per i raggi X e  $\gamma$  nei riguardi della sopravvivenza degli spermatozoni B, corrisponde con quanto riportato da OAKBERG & CLARK (1961) nei riguardi della sopravvivenza degli spermatozoni A. Ugualmente può dirsi per l'indipendenza della intensità di dose. Tale indipendenza, verificata nelle nostre esperienze entro limiti di intensità variabili di 50 volte, era già stata osservata dai suddetti AA. (1961) in esperienze analoghe sulla sopravvivenza degli spermatozoni di tipo A. OAKBERG & CLARK (1961) hanno riportato che l'irradiazione con raggi X a intensità variabili tra 86 e 9,3 R/min non dà luogo ad alcuna differenza nella sopravvivenza spermatogoniale, ugualmente dicasi per i raggi  $\gamma$  del  $\text{Cs}^{137}$  somministrati alla intensità di 0,8 R/min. L'ulteriore riduzione dell'intensità dei raggi ai livelli di 0,009 e 0,001 R/min faceva osservare una sopravvivenza più elevata a parità di dose. Non completamente in accordo con i risultati di Oakberg e Clark sono le osservazioni di MOLE (1958-59). Tale A., infatti, misurando la perdita di peso dei testicoli, che comunemente viene ritenuta collegata alla mortalità degli spermatozoni di tipo A, ha osservato che il grado di atrofia testicolare era uguale somministrando la stessa dose di radiazioni in 30 minuti o in 14 giorni. A parte le discrepanze, anche queste osservazioni potrebbero trovare una conveniente interpretazione nella teoria della ridotta capacità da parte degli spermatozoni di riparare il danno da radiazioni. Di nuovo, tuttavia, torna appropriata la considerazione già formulata poc'anzi.

In conclusione, appare ben accertato che la sopravvivenza degli spermatozoni ed in particolare degli spermatozoni di tipo B, offre delle possibilità pressochè uniche per gli studi di radiobiologia cellulare nell'animale in toto, specialmente quando tali studi riguardino la valutazione della efficacia biologica relativa di radiazioni secondarie disponibili in fasci di intensità

assai limitata. È probabile che l'uso relativamente modesto che è stato fatto fino ad oggi di tale tecnica di indagine, sia da attribuire alla sua laboriosità ed alla necessità di un lungo e delicato addestramento. Sembra evidente tuttavia, sia in base ai dati della letteratura, che a quelli della nostra personale esperienza, che i vantaggi, specialmente nel campo di irradiazioni a bassa intensità, siano tali da compensare ampiamente il pesante lavoro di valutazione.

Gli autori ringraziano calorosamente il Prof. V. Monesi del Laboratorio di Radiobiologia Animale del C.R.N. della Casaccia, per la preziosa assistenza nella messa a punto dei metodi di allestimento e di esame delle sezioni istologiche; il Dr. M. Monaco, dello stesso Laboratorio, per aver fornito gli animali usati nelle presenti esperienze; il Prof. L. Turano, direttore dell'Istituto di Radiologia dell'Università di Roma, per aver messo a disposizione la sorgente di telegramma-terapia ed il Sig. Bernardini per la intelligente collaborazione tecnica.

22 gennaio 1969.

#### BIBLIOGRAFIA

- CLERMONT, Y. & C. LEBLOND, 1953. *Am. J. Anat.*, **93**, 475.  
 HOCHKISS, R.D., 1948. *Arch. Biochem.*, **16**, 136.  
 HUTCHINSON, F., 1966. *Cancer Res.*, **26**, 2045.  
 KAPLAN, H. S., 1967. *Proc. Third Intern. Congr. Radiation Res.* Editore G. Silini, p. 397.  
 KIMBALL, A.W., 1953. *Biometrics*, **9**, 201.  
 LEBLOND, C.P. & Y. CLERMONT, 1952a. *Am. J. Anat.*, **90**, 167.  
 LEBLOND, C.P. & Y. CLERMONT, 1952b. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **55**, 548.  
 MOLE, R.H., 1958-59. *Lectures Sci. Basis Med.*, **8**, 65.  
 OAKBERG, E.F., 1955a. *Radiation Res.*, **2**, 369.  
 OAKBERG, E.F., 1955b. *J. Morphol.*, **97**, 39.  
 OAKBERG, E.F., 1956a. *J. Anat.*, **99**, 391.  
 OAKBERG, E. F., 1956b. *Am. J. Anat.*, **99**, 507.  
 OAKBERG, E.F., 1957. *J. Exptl. Zool.*, **134**, 343.  
 OAKBERG, E.F., 1959. *Radiation Res.*, **11**, 700.  
 OAKBERG, E.F., 1962. *Proc. Soc. Exptl. Biol. N.Y.*, **109**, 763.  
 OAKBERG, E.F. & E. CLARK, 1961. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **58**, Suppl. 1, 173.  
 REGAUD, C. & J. BLANC, 1906. *Compt. Rend.*, **61**, 163.  
 SCHINZ, H.R. & B. SLOPOLSKY, 1925. *Ergeb. Med. Strahlenforsch.*, **1**, 443.