

RECENTI ISOLAMENTI DI NAEGLERIA ED ACANTHAMOEBA SPP. PATOGENE DA UN'AREA TERMAL
LE E DEFINIZIONE BIO-IMMUNOLOGICA DI NAEGLERIA AUSTRALIENSIS ITALICA (DE JONCK
HEERE ET AL., 1984)

M.Scaglia (a), R.Brustia (a), S.Gatti (a), M.Strosselli (a), A.M.Bernuzzi (a),
J.F.De Jonckheere (b)

(a) Istituto di Clinica delle Malattie Infettive; Università di Pavia - IRCCS
Policlinico "San Matteo" - 27100 PAVIA

(b) Department of Microbiology - Institute of Hygiene and Epidemiology; Universi
ty of Bruxelles - Bruxelles (Belgium)

Amebe anfizoiche a diffusione cosmopolita, appartenenti alla specie Naegleria fowleri ed al genere Acanthamoeba, sono state descritte rispettivamente quali agenti etiologici di forme meningoencefalitiche a decorso acuto e sub-acuto/cronico. Recentemente una nuova specie, Naegleria australiensis, patogena sperimentalmente, è stata identificata da De Jonckheere (1981) in base a studi immunologici ed immunoenzimatici. Nel corso di ricerche condotte in una stazione termale del Nord Italia, abbiamo isolato 6 ceppi patogeni di Acanthamoeba spp. e 5 appartenenti al genere Naegleria. I campioni di acqua e fango provenienti da 17 piscine termali ed altrettanti bacini di fango usato a scopi terapeutici, sono stati incubati a 37°C e 45°C, al fine di selezionare ceppi e/o specie termofili più suscettibili di dimostrarsi patogeni, su NN-agar al 3% batterizzato in superficie con E.coli. I ceppi di Acanthamoeba isolati sono stati identificati, mediante studi immunoenzimatici, come appartenenti alle specie A.lugdunensis (2 ceppi), A.castellani, A.polyphaga (2 ceppi) ed A.hatchetti.

Uno studio morfo-biologico ed immunenzimatico più approfondito è stato condotto, in collaborazione con il Dr. De Jonckheere, sui ceppi di Naegleria isolati. Tali studi hanno permesso di identificare 2 ceppi come appartenenti alla specie non patogena N.lovaniensis, e 2 ceppi come appartenenti alla specie patogena N.australiensis. Caratteristiche del tutto peculiari sono state invece evidenziate per l'ultimo ceppo isolato, compendiabili nel fatto che risultava più sensibile alle alte temperature di incubazione, ottimamente adattabile all'axenizzazione e dotato di spiccata virulenza in vivo ed in vitro. Queste caratteristiche, insieme al profilo immunoenzimatico che rivelava una stretta somiglianza con N.australiensis, seppu non una perfetta identità, hanno condotto all'identificazione di una nuova sub-specie: N.australiensis s.sp.italica (De Jonckheere et al.- J.Protozool. 31(2): 324-331; 1984).

Acute and sub-acute/chronic meningoencephalitis infections due to soil free-living amoebae Naegleria fowleri and Acanthamoeba spp., have been reported worldwide. Recently, De Jonckheere (1981) identified a new pathogenic species of Naegleria, N.australiensis by immunologic and immunoenzymatic methods. Six pathogenic strains of Acanthamoeba spp. were isolated during further investi

gations carried out in a Northern Italian spa by our group. Several samples of polluted waters and mud were drawn from 17 thermal pools and 17 mud basins normally used for therapeutic purposes. Samples were stratified onto non-nutrient agar 3% medium, bacterized with E.coli. The specimens were then incubated at 37°C and 45°C to select only the thermophilic strains and/or species more likely to develop pathogenicity. The Acanthamoeba strains were identified by immunoenzymatic studies as A.lugdunensis (2 strains), A.castellani, A.polyphaga (2 strains) and A.hatchetti. More detailed morpho-biologic and immunoenzymatic studies were carried out on Naegleria isolates, in collaboration with Dr. De Jonckheere. Two pathogenic strains of Naegleria australiensis and two non-pathogenic strains of N.lovaniensis were identified. The last strain showed very peculiar features: sensitivity to high incubation temperature; feasibility of cultivating in axenic media; high in vivo and in vitro virulence. A similarity, but not an identity, with N.australiensis was revealed by the immunoenzymatic profile. These features allowed us to identify a new sub-species: N.australiensis s.sp.italica (De Jonckheere et al.- J.Protozool. 31(2): 324-331; 1984).

PROTOZOOSI ORALI RILEVATE NEL 1984 ALL'OSPEDALE NIGUARDA-CA' GRANDA, MILANO

L. Grassi jr. (a), R. Gatti (a) & I. de Carneri (b)

(a) Ospedale Niguarda-Ca' Granda, Milano (b) Sezione d'Igiene, Dipartimento di Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità, Università di Pavia

Riassunto.— Nel 1984 in un grande ospedale della periferia milanese la ricerca dei protozoi orali mediante coltura in pazienti ricoverati per altri motivi mostrò una prevalenza del 33% di tricomoniassi e del 56% di amebiasi orali. Non risultarono correlazioni tra queste infezioni e parodontopatie; ma la scarsa igiene orale poteva aver favorito la presenza dei protozoi. Tali eventuali correlazioni andrebbero studiate in popolazioni a più accurata igiene orale.

Summary.— (Oral protozooses found in 1984 at the Niguarda-Ca' Granda Hospital in Milan). In 1984 in a large suburban milanese hospital, culture tests for oral protozoa from patients admitted for other reasons showed a prevalence of 33% trichomoniasis and 56% oral amoebiasis. There was no correlation between these infections and periodontopathies, but poor oral hygiene may well have favoured the presence of the protozoa. Any such correlation might be worth investigating further in populations with better oral hygiene.

Materiali e Metodi

Tra fine febbraio e metà marzo 1984 abbiamo esaminato mediante coltura a 37°C in terreno bifasico di Robinson (1), con letture microscopiche eseguite quotidianamente per 6 giorni, 103 pazienti ricoverati in vari reparti dell'Ospedale Niguarda-Ca' Granda di Milano, per la ricerca delle protozoosi orali. L'età variava dai 10 agli 81 anni; 60 soggetti (58%) erano maschi e 43 (42%) femmine. L'igiene orale risultò in media scadente.

Risultati

La prevalenza di infezioni da Trichomonas tenax risultò del 33% e quella di Entamoeba gingivalis del 56%. Settanta soggetti (68%) risulta-

rono parassitati, per un totale di 92 infezioni: infatti il 21% aveva entrambi i protozoi. Le due prime tabelle mostrano le prevalenze per gruppi di età, rispettivamente per i maschi e per le femmine: non si nota un rapporto tra età e parassitismo orale. Dalla Tab. 3 risulta che nel nostro campione non v'è correlazione tra le due protozoosi, ognuna potendosi presentare indipendentemente dalla presenza o assenza dell'altra.

Tab. 1. -

Maschi

Prevalenza nei gruppi di età

anni	amebe			trichomonas		a + t	
	n.	n.	%	n.	%	n.	%
fino a 30	13	7	54	4	31	2	15
31 - 40	8	5	62	3	37	2	25
41 - 50	9	6	67	4	44	3	33
51 - 60	15	9	60	4	27	3	20
61 e più	15	9	60	3	20	3	20
Totale	60	36	60%	18	30%	13	22%

Tab. 2. -

Femmine

Prevalenza nei gruppi di età

anni	amebe			trichomonas		a + t	
	n.	n.	%	n.	%	n.	%
fino a 30	7	3	43	4	57	2	29
31 - 40	8	7	87	5	62	4	50
41 - 50	7	2	29	3	43	2	29
51 - 60	8	4	50	3	37	1	12
61 e più	13	6	46	1	8	0	-
Totale	43	22	52%	16	37%	9	21%

Sui 103 soggetti esaminati, 71 (69%) presentavano parodontopatie; 25 di questi (35%) erano parassitati da T. tenax e 46 (65%) da E. gingivalis. L'elaborazione statistica di tab. 4 mostra che le due parassitosi interessano indifferentemente i soggetti sani a quelli affetti da parodontopatie. Le infezioni doppie sono equamente distribuite tra parodontopatici (21%) e no (21%).

Tab. 3. Correlazione tra infezioni di amebe e trichomonas orali

		<u>E. gingivalis</u>		
		+	-	
<u>T. tenax</u>	+	22	12	34
	-	36	33	69
		58	45	103
$\chi^2 = 1,58$ GL= 1 P>0,05 NS				

Tab. 4. Frequenza delle parodontopatie nei 58 casi di amebiasi e 34 casi di tricomoniassi orale (totale: 92 infezioni su 70 soggetti parassitati; in 22 di essi erano presenti entrambi i protozoi).

Parodontopatie			
	+	-	
<u>E. gingivalis</u>	46	12	58
<u>T. tenax</u>	25	9	34
	71	21	92
$\chi^2 = 0,42$	GL=1	P>0,05	NS

Discussione

In conclusione, il nostro studio ha messo in evidenza solo un'alta prevalenza di queste due protozoosi orali nell'ambiente ospedaliero della periferia milanese da noi preso in considerazione, dove gran parte dei soggetti risultò praticare un'insoddisfacente igiene orale. Forse a causa di questo stato di cose non fu qui possibile evidenziare correlazioni tra queste due frequenti protozoosi e le ancor più frequenti parodontopatie. Per mettere in evidenza un'eventuale correlazione sembrerebbe più opportuno prendere in considerazione popolazioni di sezioni urbane a più alto livello socioeconomico, presumibilmente adeguate ad una più accurata igiene orale ma ancora caratterizzate da frequenti parodontopatie.

Bibliografia

I. de Carneri 1984. Parassitologia Generale e Umana. CEA, Milano, 385 p.

RILIEVI SU UN POSSIBILE RUOLO PATOGENO DI TRICHOMONAS TENAX NELLA PARADONTITE CRONICA

A. Ferrara, R. Conca, L. Grassi jr. & I. de Carneri

Sezione di Igiene, Dipartimento di Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità, Università di Pavia

Riassunto. - Uno studio delle protozoosi orali nella paradontite cronica condotto in uno studio odontoiatrico del centro di Milano mostra tendenza ad una correlazione con Trichomonas tenax, il quale è invece assente nelle gengiviti marginali. Nessuna correlazione si nota con Entamoeba gingivalis.

Summary. - (Investigation of a possible pathogenic role of Trichomonas tenax in chronic paradontitis). Findings in chronic paradontitis in a dental surgery in the centre of Milan indicate a tendency towards a correlation with Trichomonas tenax, which on the other hand is absent in marginal gingivitis. No correlation is noted with Entamoeba gingivalis.

Introduzione

Mentre fioriscono gli studi di batteriologia orale, la protozoologia orale è praticamente trascurata, nonostante l'alta prevalenza delle infezioni da Trichomonas tenax ed Entamoeba gingivalis negli adulti. Problema prioritario sarebbe il cercare correlazioni tra dette protozoosi e stato dei denti e delle gengive.

Materiali e Metodi

Dall'ottobre 1981 al giugno 1982 furono esaminati mediante prelievo di materiale ricavato dalla placca batterica e insemenzamento in terreno bifasico di Robinson 59 soggetti tra i 25 e i 60 anni, 29 maschi e 30 femmine, presentatisi ad uno studio odontoiatrico nel centro di Milano. 14 soggetti si potevano definire sani dal punto di vista dello stato dei tessuti di supporto del dente, 14 erano affetti da gengivite marginale e 31 da parodontopatie. Il prelievo fu sempre duplice in ogni soggetto: infatti in due provette di coltura venne apportato materiale prelevato sia dalla placca sopragengivale

sia da quella sottogengivale. In uno dei 31 soggetti con parodontopatia i due prelievi furono ripetuti dopo un mese dall'intervento chirurgico parodontale. Le provette insemenate vennero incubate a 37° per 6 giorni ed esaminate quotidianamente a fresco a 100 X per la ricerca di Trichomonas tenax e di Entamoeba gingivalis.

Risultati

Dei 59 soggetti esaminati, 11 (18,6%), risultarono parassitati dal flagellato e 33 (55,9%) dall'ameba. Le amebe risultarono presenti con prevalenze non molto diverse nei vari gruppi di età: 40% nei 10 soggetti tra i 25 e i 30 anni, 67% nei 9 soggetti dai 31 ai 40 anni, 67% nei 21 soggetti da 41 ai 50 anni e 47% nei 19 di età compresa tra 51 e 60 anni. Invece i tricomonas sono assenti nei due gruppi sotto i 40 anni ed hanno prevalenze del 29% e del 26% nei due gruppi di età superiore.

Non v'è correlazione statisticamente significativa tra tricomoniasi ed amebiasi orali nei singoli soggetti (tab. 1).

Tab. 1 - Correlazione tra le due protozoosi orali in 59 pazienti di uno studio odontoiatrico del centro di Milano.

		<u>E. gingivalis</u>		
		+	-	
<u>T. tenax</u>	+	6	5	11
	-	27	21	48
		33	26	59
$\chi^2 = 0,055 \quad GL = 1 \quad NS$				

La tricomoniasi è assente nei casi di gengivite, è rara sei soggetti sani ed è più di 4 volte più frequente nei casi di parodontopatie che nei soggetti sani (tab. 2). La differenza tra i 14 soggetti sani e i 45 affetti da gengivite e parodontopatie non è significativa (test esatto di Fisher $P=0,014$). Invece l'amebiasi non mostra differenze di distribuzione tra i due gruppi (50% tra i sani, 64,3% nel gruppo con gengiviti e 54,8% nelle parodontopatie; χ^2 con correzione di Yates=0,16, G.L. = 2, NS).

Tab. 2 - Correlazioni tra tricomoniasi e amebiasi orali e stato dei tessuti di supporto del dente in 59 pazienti di uno studio odontoiatrico del centro di Milano. Si veda la valutazione statistica nel testo.

Soggetti	Totale	<u>T. tenax</u>		<u>E. gingivalis</u>	
		n.	%	n.	%
Sani*	14	1	7,1	7	50
Gengivite	14	0	-	9	64,3
Parodontopatie	31	10	32,3	17	54,8
Totale	59	11	19%	33	56%

* dal punto di vista dei tessuti di supporto del dente

Su 11 casi di tricomoniasi, 4 risultarono positivi solo in una delle due localizzazioni studiate: in 1 caso risultò positiva solo la placca sottogengivale e in 3 solo quella sopragengivale. La metà (17) dei 33 casi di amebiasi risultò positiva solo in una localizzazione: 9 nella placca sottogengivale e 8 in quella sopragengivale. L'unico caso di parodontopatia controllato prima e dopo l'intervento chirurgico parodontale risultò positivo per entrambi i protozoi in entrambe le placche prima dell'intervento, mentre a un mese di distanza dallo stesso risultò del tutto negativo.

Conclusioni

Trichomonas tenax non è qui implicato nelle gengiviti marginali, dove l'ambiente risulta sfavorevole al suo attecchimento; è invece presente nelle parodontopatie, con frequenza più di 4 volte maggiore che nei soggetti sani. Tuttavia questa differenza non raggiunge il livello di significatività e solo l'aumento della casistica permetterà di chiarire la situazione ed eventualmente di assimilare, per quanto riguarda l'ecologia di Trichomonas tenax, i soggetti con gengivite marginale con i soggetti sani (nel qual caso la correlazione tricomoniasi-parodontopatie qui diverrebbe significativa).

La prevalenza di Entamoeba gingivalis è qui così costante che nessuna conclusione possiamo trarre sulla sua ecologia e sul suo eventuale ruolo patogeno. Ricordiamo che in altri studi abbiamo mostrato l'aumento della sua prevalenza con l'età a partire dall'infanzia, probabilmente in rapporto al progressivo deteriorarsi dell'apparato stomatognatico.

ANCORA SULLE PSEUDO-EMOGREGARINE UMANE

I. de Carneri (a), V. Luppino (b), M. Meregalli (b) & E. Dell'Orto (b)
(a) Sezione di Igiene, Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità
dell'Università di Pavia, (b) Ospedale di Garbagnate

Riassunto. - In uno striscio del sangue di una contadina lombarda sono comparsi pseudoparassiti falciformi mimanti Plasmodium falciparum, sollevando in un primo tempo dubbi diagnostici. Si ricordano le discussioni di sessant'anni fa sulle pseudo-emogregarine umane.

Summary. - (More concerning pseudo-haemogregarines from man). Falciform pseudoparasites simulating Plasmodium falciparum were found in a blood smear taken from a farm worker, and initially gave rise to diagnostic doubts. The discussions on pseudo-haemogregarines which took place sixty years ago are recalled.

Introduzione

Secondo Levine (1) le emogregarine (famiglia Haemogregarinidae) comprendono circa 400 specie di protozoi parassiti, tra le 4300 che formano il phylum Apicomplexa: ma non vi sono emogregarine parassite dell'uomo. La loro esistenza è stata autorevolmente esclusa da Wenyon nel 1926 (2, pp. 1115 e segg.). Emile Brumpt (3, pp. 551 e segg.; egli mette addirittura tra queste spurie "emogregarine" anche un reperto che Castellani reputò - e probabilmente è - riferibile a Toxoplasma) conferma le conclusioni di Wenyon, che ci sono state recentemente ribadite da Garnham (4) e da Corradetti (5).

Come emogregarine umane sono state descritte da vari autori degli pseudococcidi lunghi tra 6 e 20 µm (ma Raffaele, 6, nel 1928 ha descritto invece cellule lunghe solo 3-5 µm), arcuati, mononucleati, di norma extracellulari, che sporadicamente, con estrema rarità, si notano negli strisci di sangue preparati ad es. per la normale ricerca dei parassiti

malarici e colorati ad es. con Giemsa. Il loro citoplasma si colora in azzurro ed il nucleo, talvolta granulare, in rosso. Tipico è il notare poche forme isolate in un preparato e il non riuscire più ad evidenziarne altre in ripetuti prelievi ematici ed esami condotti sullo stesso soggetto. La conclusione di Wenyon è che "tutte queste supposte emogregarine sono in realtà cellule vegetali di origine estranea". Si tratterebbe insomma di grossi lieviti o organismi vegetali come Polytoma uvella, che vengono apportate sul vetrino dalle dita insufficientemente lavate del soggetto sottoposto a prelievo o che possono contaminare i vetrini o i liquidi usati nel processo di colorazione. Secondo Garnham, che in passato ebbe qualche perplessità di fronte a simili reperti, queste cellule sono Gram-positive, contrariamente ai protozoi (con l'eccezione dei mixosporidi). Ma purtroppo, dopo aver notato qualche forma del tipo colorata secondo Giemsa, risulta di norma impossibile riottenere per continuare lo studio con altre colorazioni.

Materiali, metodi e risultati

Il nostro reperto sta in uno striscio di sangue colorato secondo Giemsa, ottenuto il 27/7/1983 nel laboratorio dell'Ospedale di Garbagnate, preparato per determinare la formula leucocitaria di B. S., contadina di 65 anni, ricoverata per ipertermia (39°) ricorrente da circa un mese, di natura da determinare, accompagnata da brividi e che regrediva spontaneamente dopo circa 24 ore. Non fu rilevato nessun altro sintomo: milza e fegato normali. Assenza di precedenti riscontri di parassitosi. La paziente, abitante a Solaro (Mi), non ha mai compiuto spostamenti né fuori provincia né all'estero. Gli esami ematologici mostravano V.E.S. modicamente aumentata (I.K. 22,5) e leucocitosi neutrofila (16.800 bianchi, 81% neutrofili). Toxotest ripetuto più volte e sempre negativo; IgM as sentì, anche a mesi di distanza. Dopo il reperto microscopico sottode scritto e prima di una approfondita valutazione parassitologica, la paziente fu ospedalizzata per un mese con sospetto di malaria da Plasmodium falciparum; tutti gli esami specifici risultarono però negativi, come era da attendersi in base all'anamnesi geografica del tutto inconsistente con un'infezione malarica, ed essa venne dimessa con diagnosi di ricorrenti infezioni delle vie urinarie (urinocolture ripetutamente positive per Klebsiella

ozaenae), risolte con ampicillina.

Le pseudo-emogregarine umane da noi messe in evidenza in questa occasione si presentano come 4 corpi arcuati disposti a schiera convergente, con un'estremità affusolata e l'altra ottusa, lunghi da 8 a 10 μ m, larghi da 1,2 a 2 μ m, dal citoplasma colorato in azzurro. Il nucleo è sferico, di 1,2 μ m di diametro, colorato in rosso, situato in 2 casi in posizione centrale e in altri 2 casi a 3/5 e a 2/3 dalla estremità anteriore della cellula.

Discussione

E' da notare l'attività agricola cui era dedicata la contadina in oggetto. Raffaele (1928) ricorda l'origine rurale di molti dei soggetti da lui esaminati a Roma, tra 20.000 dei quali notò un solo caso simile al nostro. Egli ricorda anche un'osservazione di Wenyon, sulla presenza nelle feci dei conigli di lieviti simili alle nostre pseudo-emogregarine. Ripetuti prelievi da noi eseguiti nello stesso giorno e nelle settimane e mesi successivi e l'allestimento di una cinquantina di preparati, nonché l'esame dell'acqua e dei coloranti usati, non permisero di reperire altre forme del tipo e non fu quindi possibile sviluppare ulteriormente lo studio di questo episodio diagnostico. Si tratta di una rara conseguenza di un errore preanalitico. Grazie a una rinnovata informazione, i fantasmi delle pseudo-emogregarine umane non dovrebbero più intralciare il compito del laboratorista e del clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. LEVINE, N.D. 1984. Protozoa of the phylum Apicomplexa. Journal of Protozoology. 31: 22A-23A.
2. WENYON, C.M. 1926. Protozoology. 2 voll. Baillière, Tindall & Cox, London. 1536 pp.
3. BRUMPT, E. 1949. Précis de Parasitologie. 2 voll. Masson, Paris. 2138 pp.
4. GARNHAM, P.C.C. 1983. Comunicazione personale.
5. CORRADETTI, A. 1985. Comunicazione personale.
6. RAFFAELE, G. 1928. Su un microrganismo di dubbia natura rinvenuto in un preparato di sangue umano. Rivista di Malarologia. 7: 267-270.

LA RICERCA ROUTINARIA DELLE ELMINTIASI INTESTINALI UMANE IN ITALIA VA
CONTINUATA ED AFFINATA

I. de Carneri & G. Rodi

Cattedra di Parassitologia, Dipartimento di Igiene, Università di Pavia

Riassunto. - Contrariamente a quanto proposto in Lussemburgo, il pur drastico calo delle elmintiasi umane in Italia non autorizza per ora l'abolizione degli esami coproparassitoscopici di routine. Dal 1980 al 1984, in 18293 soggetti esaminati in 7 ospedali della fascia mediana della Lombardia, risultarono tra l'altro 18 ascariasi e, in 3 degli ospedali, 14 strongiloidiasi. Andrà anche confermato che, scomparsa la cisticercosi suina, sia stata eradicata anche Taenia solium nell'uomo, fonte della cisticercosi umana. Sia questa tenia (3 casi registrati; ma nell'unico da noi ricontrollato abbiamo trovato che si trattava di T. saginata) sia Strongyloides stercoralis sopravvivono nell'uomo anche per decenni. Anche elmintiasi esotiche sempre più frequentemente arrivano in Italia. La Regione Lombardia ha organizzato corsi di diagnosi parassitologica per laboratoristi ospedalieri.

Summary.- (Do not suspend routine diagnosis of human helminthiases in Italy). Though running counter to what was proposed in Luxemburg, the abolition of coproparasitoscopic examinations cannot be authorized by the decrease of human helminthiases in Italy, drastic though such decrease may be. An investigation made in 7 hospitals in a strip across the middle of Lombardy shows that out of 18,293 patients examined from 1980 to 1984, in addition to common helminthiases there were 14 cases of strongyloidiasis in 3 of the hospitals. It will also be necessary to confirm beforehand that disappearance of swine cysticercosis is matched by an effective eradication of Taenia solium in man, this organism being the source of human cysticercosis. Both Strongyloides stercoralis and the aforesaid taenia can survive in man for as long as decades at a time. To this there has to be added the problem of exotic helminthiases, which arrive in Italy with ever-increasing frequency.

Introduzione

In Lussemburgo (1) è stato recentemente proposto di sospendere la ricerca routinaria delle elmintiasi intestinali umane mediante esame copro-parassitoscopico. Infatti l'interruzione della trasmissione sembra essere avvenuta poco prima del 1977. Tenuto conto della longevità dei parassiti non dovrebbero esserci più nel Granducato infestazioni da nematodi (a parte gli ossiuri), mentre per le tenie la definitiva scomparsa è stata calcolata per il 1987. Nel 1983 la ricerca microscopica richiedeva già 14 ore di lavoro per rivelare un caso positivo per ascaridi, tricocefali o Taenia saginata: vermi pericolosi come Strongyloides stercoralis e Taenia solium erano già scomparsi da tempo. In Lussemburgo è stato perciò richiesto ai clinici di "restringere le richieste (diagnostiche) ai casi altamente sospetti".

Possiamo prendere una simile decisione ora in Italia? Per saggiare la situazione abbiamo rilevato nel novembre 1984 i dati disponibili per l'ultimo quinquennio in 7 ospedali lombardi.

Materiali e metodi

Ci fu gentilmente permesso di rilevare i dati registrati nell'ultimo quinquennio in 7 ospedali lombardi, situati in una fascia che attraversa la regione da Milano a Como, Bergamo e Brescia. Ecco qualche dato preliminare riguardante 18.293 soggetti le cui feci vennero esaminate dal 1980 al novembre 1984. Ovunque si è praticato l'esame a fresco, in 3 ospedali la concentrazione con MIF e in 3 la diafanizzazione di Kato (2). Si rilevò il costo unitario addebitato dai vari ospedali.

Risultati

Va premesso che presumibilmente buona parte di questi esami venne richiesta perchè sussisteva qualche dubbio sulla presenza di parassiti: non si tratta perciò di un campione della popolazione normale lombarda. A parte i protozoi (271 casi di giardiasi=1,5% e 7 infezioni da Entamoeba histolytica=0,04%) si trovarono 2 infestazioni importate da Schistosoma mansoni, 1 da Hymenolepis nana, 6 importate da anchilostomi, 1 da Dipylidium caninum, 18=0,1% da ascaridi, 77=0,4% da tricocefali, 1 da Diphyllobothrium latum, 82=0,45% da Taenia saginata, 27 da grandi tenie non meglio identificate. Vennero registrate 3 infestazioni da Taenia solium, ma noi, esaminando le proglottidi dell'unico strobilo parzialmente conservato abbiamo constatato che si trattava di T. saginata.

In 3 dei 7 ospedali sono stati inoltre diagnosticati 14 casi di strongiloidiasi.

Il costo addebitato per un'analisi è sorprendentemente basso, aggirandosi attorno alle 5.000 lire. Il costo per esame positivo risulta perciò di 180.000 lire. Segnaliamo che in qualcuno di questi ospedali si ricercano le amebe anche mediante coltura, al costo di lire 20.000.

Conclusioni

Segnaliamo che durante il quinquennio considerato abbiamo anche noi trovato Strongyloides stercoralis negli orticoltori di Lusia in Veneto e che esso è stato evidenziato ripetutamente a Pavia nella Clinica del Prof. E.G. Rondanelli. Non si può rinunciare ad una accurata (3) ricerca di questo nematode, che può perdurare per decenni e scatenarsi in caso di immunodepressione. Sarà anche opportuno attendere conferma dell'avvenuta eradicazione di Taenia solium nell'uomo: a questo punto ogni caso di teniasi andrebbe indagato a fondo per evitare confusioni tra T. solium e T. saginata, possibili soprattutto in preparati coartati per fissazione inadeguata che vengano osservati solo macroscopicamente. Ad esempio, il caso dubbio sopracitato è stato risolto solo mediante esame istologico.

Ricordiamo anche che la situazione in qualche areale del Sud potrebbe essere per ora peggiore di quella evidenziata in Lombardia (4).

Bibliografia

1. FOX, E. LIESCH, C. & SCHNEIDER, F. 1984. Eradication of medical helminths for Luxembourg in 1985? Lancet. 1: 1296.
2. de CARNERI, I. BIAGI, F.F. & GAZZOLA, E. 1968. Valutazione del metodo di Kato nella diagnosi qualitativa e quantitativa di alcune elmintiasi. Nuovi Annali d'Igiene e Microbiologia. 19: 369-379.
3. PELLETIER, L.L. jr. 1984. Chronic strongyloidiasis in world war II Far East ex-prisoners of war. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 33: 55-61.
4. de CARNERI, I. 1983. Parassitologia Generale e Umana, 8^a ed. CEA, Milano 385 p.

ANCORA SCHISTOSOMIASI DALL'AFRICA

C. Daglio (a), L. Lombardo (b), N. Ravarino (c), I. de Carneri (d).

(a) Laboratorio di Analisi, Ospedale Mauriziano, Torino; (b) Servizio di Endoscopia, Ospedale Mauriziano, Torino; (c) Servizio di Anatomia e Istologia patologica, Ospedale Mauriziano, Torino; (d) Cattedra di Parassitologia, Sezione di Igiene, Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità, Università di Pavia.

Riassunto. - Si è diagnosticato a Torino un caso di schistosomiasi mansonica acuta contratto da un tecnico italiano nel lago Kangimi, presso Kaunda, nel nord della Nigeria. La dinamica dell'infestazione fu seguita mediante oogramma. Questo metodo permise infine di documentare l'esito della terapia con praziquantel.

Summary. - (Yet schistosomiasis from Africa). Diagnosis was made in Turin of a case of acute Manson's schistosomiasis contracted by an Italian technician in Lake Kangimi, near Kaunda in the northern part of Nigeria. The dynamics of the infection was followed by oogram. Finally, this method enabled the result of the therapy with praziquantel to be documented.

Introduzione

Casi non ancor diagnosticati di schistosomiasi da Schistosoma haematobium e S. mansoni, contratti in Africa, entrano sporadicamente in Italia: in turisti che vengono portati da irresponsabili organizzatori a bagnarsi a gruppi nelle oasi sahariane (1), in singoli missionari che rientrano dal Sudan (2), persino in biologi in missione di ricerca che non resistono alla tentazione di cercare refrigerio in qualche stagno, ecc. Descriviamo qui un caso di febbre di Katayama o schistosomiasi acuta, che insorge dopo 3-6 settimane dall'esposizione della pelle alle cercarie di S. japonicum o, come nel nostro caso, di S. mansoni.

In Europa si manifesta quasi esclusivamente in soggetti non immuni di ritorno da viaggi in aree endemiche tropicali (3).

Materiali, metodi e risultati

Il 18 ottobre 1983 si è presentato presso il nostro laboratorio il signor R.F. di anni 30, con febbre e inappetenza. Era appena rientrato in Italia da Kaduna (Nigeria Settentrionale) dove aveva soggiornato per lavoro per due mesi e mezzo. Il paziente presentava una leucocitosi (17.000 G.B. per mm^3) con spiccata eosinofilia (30%), un indice di Katz modestamente elevato (24), un modesto aumento degli enzimi epatici (GOT=19, GPT=43, GGT=68), una PCR intensamente positiva (+++). Risultò negativo per malaria e positivo per Entamoeba histolytica in forma minuta nelle feci.

All'esame obiettivo il paziente presentava una modesta epatosplenomegalia, mentre egli riferiva, oltre a febbre e sudorazione, anche perdita di peso, inappetenza, dolori addominali, tosse secca ma non diarrea; episodi diarroici venivano invece riferiti al soggiorno africano. Il signor R.F. segnalava inoltre di aver fatto il bagno (una diecina di volte) nel lago di Kangimí, circondato a qualche distanza da pochi villaggi sparsi e situato a una trentina di Km da Kaduna.

Un successivo esame delle feci eseguito in data 4/11/83 ha messo in evidenza la presenza di alcune uova di S. mansoni confermate poi con un successivo prelievo rettoscopico (con la tecnica del brushing); si osservavano piccoli papillomi a livello rettale; l'oogramma ha messo in evidenza un piccolo numero di uova, quasi tutte vive e vitali, di S. mansoni. Questa tecnica, messa a punto in Brasile, consiste nel prelevare sottilissimi lembi di mucosa del retto e schiacciarli fra due vetrini, osservando a fresco le uova in transito nei vari stadi di maturazione e le uova bloccate nei tessuti, a vari stadi di degenerazione. L'oogramma costituisce un sensibilissimo indice sull'epoca dell'infestazione, sulla sua evoluzione, sul successo della terapia (scomparsa di uova fresche) e su eventuali ricadute per ritorno di coppie superstiti di schistosomi dalle diramazioni portali epatiche alle vene mesenteriche.

Il paziente è stato sottoposto a terapia dapprima antiamebica con Nimorazolo (Naxogin): 750 mg 3 volte al giorno per 10 gg; poi, dopo reperimento delle uova, antischistosomica con Praziquantel (Biltricide) 60 mg/kg suddiviso in due somministrazioni in un'unica giornata.

Un controllo effettuato il giorno 15/12/83 ha evidenziato una riduzione della leucocitosi (8600 GN mm^3) e in misura minore della eosinofilia (20%), come pure degli enzimi epatici (GPT=32, GGT=30) con completa negativizzazione dell'esame parassitologico delle feci.

L'indagine sierologica effettuata con emoagglutinazione indiretta con Cellognost-Schistosomiasis (Behring) rivelava un titolo di 1/32 mentre l'esame effettuato un mese prima non aveva fornito un titolo significativo.

Nello stesso giorno si ripeté l'oogramma, che mostrò solo uova coartate e nessun uovo vitale. Un prelievo biotico rivelò la presenza di lesioni granulomatose a forte infiltrazione eosinofila a carico della sottomucosa, con al centro uova vuote, semi-collassate.

Un ulteriore controllo effettuato il 4 gennaio 1984 ha evidenziato una lieve diminuzione degli eosinofili (15%) mentre gli enzimi epatici non hanno mostrato significative modificazioni, così come l'E.A.I.; negativo l'esame parassitologico delle feci. Il paziente è poi ripartito per la Nigeria dove ha ripreso la propria attività, astenendosi questa volta da bagni del tipo sopra descritto.

Rientrato definitivamente in Italia, il 10 agosto 1984 si sentiva soggettivamente bene; nuovi esami di controllo hanno mostrato la normalizzazione dei quadri ematologici (eosinofili 3%) ed ematochimici (GOT= 13, GPT=10, YGT 23), mentre il titolo dell'E.A.I. è sceso a 1/16.

L'andamento nel tempo di questi parametri e in particolare dell'oogramma ci ha permesso di seguire la dinamica dell'infestazione e depone per una cura verosimilmente radicale.

BIBLIOGRAFIA

1. DE CARNERI, I. ORECCHIA, P. & PAGGI, L. 1970. Infestazione di un ceppo sardo e di un ceppo algerino di Bulinus (Bulinus) truncatus con miracidii di Schistosoma haematobium ottenuti da uova raccolte a Milano da soggetti infestati a El Mamoun (Sud della Tunisia). Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie. 22: 449-450.
2. DE CARNERI, I. BUSSOLATI, C. & CASTELLINO, S. 1966. Tentativi di inibire con anticoncenzionali l'ovoposizione di Schistosoma mansoni per la terapia della schistosomiasi del topo e dell'uomo. Atti della Società Peloritana di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. 12: 431-434.
3. STUIVER, P.C. 1984. Acute schistosomiasis (Katayama fever). British Medical Journal. 288: 221-222.

CISTICERCOSI SPINALE: DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO TRATTATO CON PRAZIQUANTEL

L.Minoli, G.Senaldi, A.Malfitano, M.Strosselli, M.Scaglia

Istituto di Clinica delle Malattie Infettive; Università di Pavia - IRCCS
Policlinico "San Matteo" - 27100 PAVIA

Nonostante la cisticercosi rappresenti la verminosi larvale che nell'uomo più frequentemente colpisce il SNC, l'interessamento spinale di tale elmintiasi costituisce un evento di eccezionale rarità. Gli Autori riportano un caso, osservato nel luglio 1984, occorso in una donna di 60 anni proveniente da zona rurale della provincia di Agrigento, caratterizzato dalla presenza di cisticerchi in sede subaracnoidea. La paziente riferiva consumo di carni crude o poco cotte, ma negava di aver mai compiuto soggiorni a distanza dalla propria residenza. Nell'agosto 1983 il medico curante le aveva diagnosticato un'infestazione da "verme solitario". Dal marzo 1984 lamentava lombosciatalgie, parestesie, difficoltà alla marcia e presentava tetraiperriflessia osteotendinea. La mielografia e l'esame TAC midollare rivelavano numerose immagini di minus nel mezzo di contrasto, mobili nello spazio subaracnoideo, interpretate come forme cistiche di assai verosimile natura parassitaria; si riscontravano anche chiari segni radiologici di circostante meningite. L'esame radiologico degli arti inferiori proponeva, nel contesto delle parti molli, immagini radiopache "a sigaro", ritenute patognomiche di cisticercosi muscolare. Pur in assenza di conferma diagnostica sierologica, si instaurava specifica terapia anti-C.cellulosae con praziquantel (17 mg/Kg/die t.i.d., per 14 gg.) associato a desametasone (4 mg t.i.d., per 14 gg.), che in poche settimane conseguiva completa remissione della sindrome nervosa. Si sottolinea, oltre alla rarità di tale condizione morbosa, l'origine autoctona, il riconoscimento esclusivamente radiologico ed il trattamento di successo mediante praziquantel.

Cysticercosis is the most common larval helminthiasis affecting human CNS, nevertheless its spinal localization seems to be an occurrence particularly rare. The Authors report the second Italian case of spinal cysticercosis, recognized in a 60-year-old woman from Agrigento (Sicily), admitted to hospital in July 1984. It represents the first example of subarachnoidal helminthic larvae ever seen in our Country. The patient lived in a rural area, admitted she was used to eat raw pork and denied stays away from the native district. In August 1983 the diagnosis of taeniasis was taken into consideration by her family physician. Since March 1984 she complained lombosciatalgia, paresthesiae and gait impairment. Hyperactive tendon reflexes could be noted, too. Myelography and spinal CAT scan showed multiple spheroidal lumps floating in the subarachnoidal

space, considered as parasitic cysts. Nearby radiologic features of meningeal inflammation were demonstrated. X-rays of both thighs showed cigar-like structures, held pathognomonic of muscular cysticercosis. Despite negative serologic results, the patient was put on specific therapy with praziquantel (17 mg/Kg/die t.i.d. for 14 days) and dexamethasone (4 mg t.i.d. for 14 days), which attained a total recovery within few weeks. In conclusion, the Authors point out, as well as the peculiar rarity of this case, its autochthonous origin, solely radiologic diagnosis and successful treatment with praziquantel.

STRONGYLOIDES STERCORALIS: UN VECCHIO, MA SEMPRE AGGUERRITO NEMICO. CONSIDERAZIONI SU 275 CASI AUTOCTONI DIAGNOSTICATI NEL PERIODO 1977-1984

M.Scaglia, S.Gatti, A.Malfitano, G.Senaldi, D.Capelli, L.Minoli

Istituto di Clinica delle Malattie Infettive; Università di Pavia - IRCCS
Policlinico "San Matteo" - 27100 PAVIA

Strongyloides stercoralis è un nematode responsabile di una sindrome caratterizzata da manifestazioni gastro-enteriche, respiratorie ed allergiche, diffusa soprattutto in zone tropicali e sub-tropicali a clima caldo-umido. Tuttavia, sacche di endemicità così come casi sporadici sono stati segnalati anche in aree temperate. La Pianura Padana, ed in particolare il Pavese, continua a rivelarsi zona ad alto rischio con numerosi casi diagnosticati annualmente (Scaglia et al. 1984). Nel presente studio sono esaminate le caratteristiche epidemiologico-cliniche, nonché le implicazioni terapeutiche di 275 casi autoctoni diagnosticati nel periodo 1977-1984 presso l'Istituto di Clinica delle Malattie Infettive di Pavia. I soggetti maggiormente colpiti risultano essere maschi (74.5%), di età compresa tra i 21 e 50 anni (58.1%) e residenti in ambiente rurale (60.4%). E' importante sottolineare la frequente associazione tra strongiloidosi ed immunodepressione; infatti il 10% dei pazienti da noi considerati era portatore di un deficit immunitario secondario a cause patologiche e/o iatrogene. La sintomatologia, presente in circa l'80% dei casi, è essenzialmente a carico dell'apparato gastro-enterico (71.6%) e respiratorio (32%), mentre manifestazioni allergiche orticarioidi ed epatomegalia sono presenti in oltre la metà dei casi (52.3%). La terapia di elezione è rappresentata dal tiabendazolo (25 mg/Kg/die ogni 48 h per 3 somministrazioni) che si è rivelato efficace in oltre il 95% dei casi, mentre il mebendazolo (1 g/die per 10 gg) si è dimostrato totalmente inattivo. L'albendazolo ha dimostrato di possedere buone capacità terapeutiche (8 pazienti guariti su 13 trattati) alle dosi di 400 mg/die per 3 gg, e si propone pertanto come farmaco alternativo.

The disease due to Strongyloides stercoralis is characterized by gastro-enteric, respiratory and allergic manifestations. This nematode is endemic in tropical and sub-tropical Countries, nevertheless endemic areas, as well as sporadic cases, are reported worldwide. The district of Pavia (Lombardia Region, Italy) is an high risk area accounting for several cases diagnosed every year (Scaglia et al., 1984). Epidemiological and clinico-therapeutic issues concerning 275 autochthonous cases diagnosed at the Department of Infectious Diseases - University of Pavia from 1977 through 1984, were examined. Males (74.5%), aged between 21 and 50 years (58.1%) and living and/or working in rural areas (60.4%), were found to be at highest risk. The association between strongyloidosis and under

lying immunological defects because of pathologic and/or therapeutic causes, was rather frequent (10% of overall cases). Gastro-enteric symptoms (71.6%), respiratory signs (32%), creeping eruptions and allergic diseases (52%) and epatomegaly (52.3%) were the most common clinical manifestations of symptomatic patients (80% of overall cases).

Thiabendazole (25 mg/Kg/day every other day in a week) was effective in over 95% of cases. Mebendazole (1 g/day per 10 days) was ineffective. The new drug albendazole (400 mg/day per 3 days) proved to be a valid alternative drug (8/13 patients recovered).

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLE PARASSITOSI INTESTINALI IN UNA COMUNITA' CHIUSA IN
SOMALIA: PREVALENZA DI TRICHURIS TRICHIURA, ANCYLOSTOMA E GIARDIA INTESTINALIS

I. Ilardi, Shukri C. Shiddo, Abdullahi S. Hussein, Hassan H. Moxamed, Khalif Bi-
le M., A. Sebastiani, G. Bianchini e G. Amiconi

Istituti di Malattie infettive, di Clinica Malattie tropicali e infettive e di
Chimica, Facoltà di Medicina, Università degli Studi "La Sapienza", Roma (Italia)
Facoltà di Medicina, Università Nazionale Somala, Mogadiscio (Somalia)

Riassunto— Sono riportati i risultati di una ricerca epidemiologica fatta nel-
l'autunno del 1983 sulle parassitosi intestinali di una popolazione di giovani
maschi (da 6 a 20 anni) in un collegio vicino a Mogadiscio (Somalia). Il 91%
degli ospiti è risultato infestato da uno o più parassiti. Trichuris trichiura
era presente in oltre il 66% dei campioni esaminati e il 12% di questi conteneva
più di 3000 uova del parassita per grammo di feci.

Summary— A survey of intestinal parasitic infection in a community of young male
people (6 to 20 years old) living in an orphanage near Mogadishu, Somalia, was
conducted from October through November 1983. Stools were submitted by 816 indi-
viduals, representing 96 percent of the population present in the orphanage, and
91 percent of the samples examined were positive for one or more parasites.

Trichuris trichiura was detected in more than 66% of the samples and about 12%
of these had egg counts above 3,000 per gram of feces. Other relevant infection
rates were 48% for hookworm and 36% for Giardia intestinalis. The highest preva-
lence and intensity of worm infection were found in the younger groups, with
considerable reduction after 15 years of age.

Introduzione

All'inizio del 1983 la Facoltà di Medicina dell'Università Nazionale Somala
stese un programma di ricerche parassitologiche da svolgere in istituzioni pub-
bliche ed in comunità rurali. Uno degli scopi era quello di stabilire un sicuro
punto di riferimento per giudicare tutti i cambiamenti, qualitativi e quantitati-
vi, che si sarebbero potuti verificare in seguito a: 1. miglioramento di strut-
ture igienico-sanitarie; 2. intensa educazione sanitaria; 3. trattamenti medica-
mentosi a scopo curativo e profilattico. Come studio-pilota dell'intero program-
ma si scelse di determinare la prevalenza e l'intensità dei parassiti intestina-
li dei giovani residenti in un collegio maschile situato a 15 Km a sud di Moga-
discio, chiamato Lafoole. Questa comunicazione riassume alcuni dei risultati più
salienti della ricerca epidemiologica condotta tra l'ottobre ed il novembre 1983.

Materiali e metodi

Per ogni ospite del collegio è stato esaminato al microscopio ottico un so-
lo campione di feci a) dopo diluizione con soluzione fisiologica, b) dopo colo-
razione con soluzione di Lugol e c) dopo concentrazione delle uova di elminti
con la tecnica di Kato. In quest'ultimo caso sono stati esaminati circa 50 mg
di feci. I campioni sono stati osservati entro sei ore dalla raccolta. Non è

stato fatto alcun tentativo per identificare le specie di ancylostoma.

Risultati

La popolazione del collegio era costituita da giovani maschi di età compresa tra 6 a 20 anni, di cui il 20% fra 6 e 10 anni, il 40% fra 11 e 15 anni ed il rimanente 40% fra 16 e 20 anni. Di tutti i campioni esaminati il 90,7% conteneva almeno un tipo di uova di elminti e/o protozoi, ma oltre la metà degli individui era affetta da poliparassitosi. La tabella 1 riporta la prevalenza globale dei vari parassiti, mentre la tabella 2 indica lo stato di poliparassitosi.

TABELLA 1. Prevalenza di parassiti intestinali (740 individui positivi/816 individui esaminati).

PARASSITA	CAMPIONI POSITIVI	
	Numero totale	Percentuale
<i>Trichuris trichiura</i>	491	66,3
<i>Ancylostoma</i>	356	48,1
<i>Giardia intestinalis</i>	267	36,1
<i>Entamoeba histolytica</i>	114	15,4
<i>Ascaris lumbricoides</i>	83	11,2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	16	2,2
<i>Hymenolepis nana</i>	3	0,4

TABELLA 2. Mono- e poli-parassitosi

Numero di specie di parassiti per soggetto	1	2	3	4	5
Numero di soggetti	218	286	183	47	6
Percentuale sul totale	29,5%	38,6%	24,8%	6,3%	0,8%

Un'analisi della distribuzione delle infestazioni secondo gruppi di età (vedi Tabella 3) mostra che la prevalenza più alta è associata con l'età più giovane, eccetto per *Entamoeba histolytica* che sembra diffusa in modo omogeneo su tutta la popolazione del collegio. Parallelamente alla relazione osservata tra età e prevalenza, l'intensità dell'infestazione risulta maggiore negli individui più giovani (vedi Tabella 4).

Discussione

Poche sono le informazioni precise sulla prevalenza di parassiti intestinali in Somalia e, per quanto a conoscenza degli autori, questo è il primo studio quantitativo su tale problema. La limitazione principale di questa indagine è legata all'esame di un singolo campione di feci, raccolte con defecazione spontanea: E' stato detto (1) che in tal modo si osservano solo la metà delle infestazioni da protozoi e sfugge una frazione di elmintiasi; pertanto è probabile che l'intera popolazione del collegio sia affetta da parassitosi intestinali. Questa altissima incidenza è, fra l'altro, correlabile con la mancata utilizzazione dei servizi igienici (sia per abitudine che per difettoso funzionamento), con conseguente intensa fecalizzazione dell'ambiente. In quelle aree tropicali dove prevalgono condizioni socio-sanitarie poco soddisfacenti, è stata molto spesso descritta un'alta incidenza sia di *Trichuris trichiura* che di *Ascaris lumbricoides*. Nel nostro caso la bassa endemicità di ascaridiasi può essere imputata alle condizioni climatiche (breve periodi di pioggia seguiti da lunghi periodi secchi) e al terreno sabbioso: è noto che queste caratteristiche favoriscono una migliore sopravvivenza dell'*ancylostoma* rispetto all'*ascaride*.

(2), evidenza ben chiara nei dati sopra riportati. Infine la omogenea distribuzione di *Entamoeba histolytica* su tutto il campione può trovare una spiegazione nella facilità di trasmissione di questo protozoo nelle comunità chiuse, che può rimanere costante per anni anche a seguito di notevoli miglioramenti delle condizioni ambientali (3).

TABELLA 3. Prevalenza secondo l'età. (Ogni tripletta di numeri indica, andando dall'alto in basso, il numero totale di individui, la percentuale per età rispetto al parassita e la percentuale per parassita rispetto all'età).

Abbreviazioni: Tt=Trichuris trichiura; A=Ancylostoma; Gi=Giardia intestinalis; Eh=Entamoeba histolytica; Al=Ascaris lumbricoides; Ss=Strongyloides stercoralis.

PARASSITA	ETA' (in anni)			PARASSITA	ETA' (in anni)		
	≤ 10	11-15	≥ 16		≤ 10	11-15	≥ 16
Tt	109	206	176	Eh	20	46	48
	22,2%	42%	35,8%		17,5%	43,3%	42,2%
	79,6%	68,2%	58,5%		14,6%	15,2%	15,9%
A	72	162	122	Al	21	35	27
	20,2%	45,5%	34,3%		25,3%	42,2%	32,5%
	52,5%	53,6%	40,5%		15,3%	11,6%	8,9%
Gi	67	120	80	Ss	6	8	2
	25,1%	44,9%	30%		37,5%	50%	12,5%
	48,9%	39,7%	26,6%		4,4%	2,6%	6,7%

TABELLA 4. Numero di uova di vari elminti per g di feci riferito all'età (la percentuale è stata calcolata rispetto al totale di individui affetti dal parassita per ogni classe di età).

TRICHURIS TRICHIURA			
	≤ 10 anni	11-15 anni	≥ 16 anni
≤ 1000 uova	30 (35,8%)	100 (48,5%)	129 (73,3%)
1001-3000 uova	49 (44,9%)	79 (38,4%)	36 (20,4%)
> 3000 uova	21 (19,3%)	27 (13,1%)	11 (6,3%)
ANCYLOSTOMA			
	≤ 10 anni	11-15 anni	≥ 16 anni
≤ 1000 uova	18 (25%)	48 (29,8%)	65 (53,3%)
1001-3000 uova	30 (54,2%)	79 (49,1%)	42 (34,4%)
> 3000 uova	15 (20,8%)	34 (21,1%)	15 (12,3%)
ASCARIS LUMBRICOIDES			
	≤ 10 anni	11-15 anni	≥ 16 anni
≤ 1000 uova	7 (33,3%)	14 (40%)	17 (62,9%)
1001-3000 uova	8 (38,1%)	16 (45,7%)	7 (25,9%)
> 3000 uova	6 (28,6%)	15 (14,3%)	3 (11,2%)

BIBLIOGRAFIA

1. Andrews, J. 1934. The diagnosis of intestinal protozoa from purges and normally passed stools. J. Parasitol. 20:253-254.
2. Beaver, P.C. 1952. Observations on the epidemiology of ascariasis in a region of high hookworm endemicity. J. Parasitol. 38:445-453.
3. Jeffery, G.M. 1960. A three-year epidemiological study of intestinal parasites in a selected group of mental patients. Am. J. Hyg. 71:1-8.

INDAGINE PARASSITOLOGICA A TANGUIETA: RICERCA COPRO-URINOMICROSCOPICA E SIEROLOGICA

M.L. Ricciardi (a) & L. Bossi (b)

(a) Centro Ricerche Farmitalia Carlo Erba, Nerviano, Milano

(b) Istituto di Igiene dell'Università e Laboratorio Centrale, Ospedale Maggiore, Milano

Una indagine parassitologica condotta tra gli allievi di una scuola elementare del nord del Benin (Repubblica popolare) e tra gli insegnanti della scuola e i loro familiari ha messo in luce una situazione ambientale di particolare gravità. Il 100% dei ragazzi risulta parassitato, con preponderanza delle parassitosi protozoarie-elmintiche (75,47%) su quelle sostenute da soli protozoi (11,32%) o da soli elminti (13,21%). La prevalenza di S. mansoni, in particolare, risulta del 75,47% e pure S. haematobium, recentemente introdotto nella zona, appare nel 3,77% dei ragazzi. Meno drammatico, ma pure sempre importante, risulta il quadro parassitologico nelle famiglie dei maestri, dimostrando come le migliori condizioni socio-economiche non bastino a proteggere dalla contaminazione ambientale. Il 90% dei componenti il gruppo risulta infatti parassitato, con prevalenza delle parassitosi sostenute da soli protozoi (50%) su quelle sostenute da soli elminti (22,22%) e da associazioni protozoarie-elmintiche (27,78%); in particolare S. mansoni compare soltanto nel 22,22% dei soggetti.

La grande diffusione dei protozoi, patogeni o apatogeni, sicuramente non legata a consumo di verdura cruda, che non rientra nelle abitudini alimentari degli autoctoni, dimostra la inevitabilità del contagio oro-fecale interumano diretto in un ambiente ove anche l'adozione delle misure igieniche più elementari è ritardata dalla estrema carenza di acque. Carenza di acque che trova poi buon gioco nella diffusione della schistosomiasi tra gli abitanti della zona obbligati ad utilizzare le scarse raccolte idriche stagnanti, infestate da molluschi vettori. Risultati inferiori alle nostre aspettative ha dato il test IHA (emoagglutinazione indiretta) nelle sierodiagnosi di amebiasi e di schistosomiasi, che abbiamo potuto eseguire soltanto nel gruppo degli allievi e degli insegnanti. Se anticorpi anti-E. histolytica sono comparsi in tutti i soggetti parassitati da E. histolytica ed in un soggetto in cui l'esame delle feci non aveva rivelato la presenza del protozoo, i titoli sono tuttavia modesti, variando da 1/64 a 1/256.

Titoli decisamente marcati, varianti da 1/128 ai 1/16384, sono invece comparsi nella sierodiagnosi di schistosomiasi, comparsi, comunque, solo su 16 dei 40 soggetti parassitati da Schistosoma e su 1 soggetto in cui la ricerca di Schistosoma era risultata negativa sia nelle feci che nelle urine. Tenendo presente questo risultato ci si ripromette, in indagini future, di esaminare possibili relazioni tra carica parassitaria ed entità della risposta anticorpale, almeno per quanto riguarda la schistosomiasi.

INCHIESTA PARASSITOLOGICA IN DUE COMUNITA' INFANTILI IN DUE CENTRI DELL'ATAKORA'

M.L. Ricciardi (a) & L. Bossi (b)

(a) Centro Ricerche Farmitalia Carlo Erba, Nerviano, Milano

(b) Istituto di Igiene dell'Università e Laboratorio Centrale, Ospedale Maggiore, Milano

Una indagine copromicroscopica è stata condotta in due comunità infantili dell'Atakorà (Repubblica popolare del Benin), comunità che accolgono, con bambini ipo- e malnutriti, di età variabile dai 3 mesi ai 10 anni, anche le madri dei piccoli o altre parenti adulte, allo scopo di mantenere i legami affettivi necessari all'evoluzione psichica del bambino ed al suo reinserimento nell'ambito familiare, ma anche e soprattutto al fine di educare le accompagnatrici nelle esigenze alimentari infantili. La ricerca ha rivelato parassitosi che non risparmiano neppure i bambini più piccoli e aumentano quantitativamente e qualitativamente con il procedere delle varie fasce di età, aggravando ulteriormente il precario equilibrio metabolico. Viene suggerito di eseguire controlli copromicroscopici sistematici, non solo all'atto della ammissione dei bambini e delle accompagnatrici, ma ripetuti ad intervalli regolari per tutta la durata del soggiorno, controlli ovviamente seguiti da trattamento terapeutico, quando l'analisi riveli la presenza di parassiti. Ciò al fine di evitare la reintroduzione nella comunità di parassitosi, così facile a realizzarsi in ambiente tropicale. Viene infine auspicata un'opera di educazione sanitaria, volta a contenere queste evenienze, che potrebbe risultare utilissima per le comunità rurali alle quali le donne, una volta dimesse con i loro bambini, faranno ritorno con questo nuovo bagaglio culturale.

ANALISI DELLA SPECIE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS IN RELAZIONE ALLA SITUAZIONE EPIZOOLOGICA ED EPIDEMIOLOGICA DELL'ECHINOCOCCOSI-IDATIDOSI IN SOMALIA

G. Macchioni (a), A. Marconcini (a), F. Testi (b), T. Balbo (c), P. Lanfranchi (c), M.A. Abdullatif (d)

- (a) Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Università di Pisa, Pisa
- (b) Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria, Università di Bologna, Bologna
- (c) Istituto di Patologia Speciale e Clinica Medica Veterinaria, Università di Torino, Torino
- (d) Dipartimento Infettivistico e Parassitologico Veterinario, Università di Mogadiscio, Mogadiscio

Riassunto. - Indagini epizootologiche in Somalia hanno evidenziato una elevata frequenza dell'idatidosi nel dromedario (14,82%), bassa nel bovino (1,75%), e pressochè nulla nell'ovino e caprino. La discordanza tra l'alta incidenza dell'echinococcosi nel cane (23,40%) e l'assenza dell'idatidosi nell'uomo viene analizzata in relazione all'ambiente ed alle variazioni intraspecifiche di Echinococcus granulosus.

Summary (Epizootological and epidemiological aspects of Echinococcosis-Hydatidosis in Somalia). - Hydatid cysts were found in 142 (14.82%) of 958 camels, in 28 (1.75%) of 1598 cattle, in 1 (0.07%) of 1359 sheep and in 0 of 1937 goats in Somalia. The high incidence of Echinococcosis in the dog (23.40%) and the absence of Hydatidosis in man are analysed with reference to the environment and the intraspecific variations of E. granulosus.

Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che nei paesi in cui esiste il ciclo cane/pecora, il ceppo di Echinococcus granulosus coinvolto risulta infestante per l'uomo. La situazione epidemiologica è molto meno chiara quando nel ciclo biologico intervengono altre specie animali quali equini, suini, dromedari, etc., come ospiti intermedi.

In Somalia, dove praticamente si concentra un terzo di tutta la popolazione cammellina del mondo (1), in un'indagine condotta a Merka è stato osservato (2) che la malattia è presente nel dromedario con una frequenza del 23,40%; sorprendentemente bassa è risultata invece l'infestazione nel bovino (0,91%) e nel caprino (0,58%); l'esame parassitologico dei cani infine ha registrato una positività del 27%.

Negli anni 1980-84 presso i Macelli di Mogadiscio, Merka e Kisimaio abbiamo

esaminato per idatidosi 958 dromedari, 1598 bovini, 1359 ovini e 1937 caprini. Mentre nel dromedario sono state rilevate cisti idatidee in 142 animali pari al 14,82%, nel bovino solo 28 animali sono risultati infestati con una frequenza del 1,1,75%; un caso soltanto (pari allo 0,07%) è stato osservato nell'ovino e nessuno nel caprino. Contemporaneamente l'indagine è stata estesa ai cani randagi di Mogadiscio: su 47 animali sottoposti a necropsopia 11 presentavano in sede intestinale esemplari adulti di E. granulosus con un'incidenza pari al 23,40%.

Data una così elevata diffusione dell'echinococcosi nel cane, si dovrebbe ritenere frequente anche l'idatidosi nell'uomo. Invece l'infestione umana in Somalia non risulta sia mai stata riportata in letteratura se si esclude un caso d'idatidosi orbitaria in una donna somala segnalato da un medico italiano a Pellegrini e Sobrero nel 1960 (2). Da informazioni assunte presso l'ambiente medico di Mogadiscio non risultano accertati casi d'idatidosi, neppure in questi ultimi dieci anni in cui si è assistito ad un notevole miglioramento dei servizi sanitari per la presenza di numerosi esperti in Cooperazione Tecnica.

La discordanza tra l'elevato grado di parassitismo nel cane e l'assenza della malattia nell'uomo costituisce un problema epidemiologico assai interessante, che merita di essere attentamente analizzato al fine di individuare le cause del fenomeno, non comune nell'epidemiologia dell'idatidosi.

Sul potere contagiante del cane i fattori che maggiormente influiscono sono il rapporto cane/uomo e l'ambiente. Prendendo come campione Mogadiscio, città nella quale abbiamo controllato la diffusione dell'echinococcosi nel cane, osserviamo temperature relativamente costanti, con minime sui 24°C e massime sui 30°C, ed umidità relativa costantemente abbastanza elevata (74-79% di media). Esistono pertanto le condizioni per una lunga sopravvivenza delle uova di E. granulosus nell'ambiente: uova che possono essere ingerite, soprattutto in conseguenza delle cattive condizioni igieniche, tramite alimenti non accuratamente puliti e lordati da animali vettori quali mosche, blatte, roditori. Un altro fattore che può favorire la contaminazione dell'ambiente è rappresentato dalle piogge che periodicamente si abbattano sulla città; non esistendo fognature le acque scorrono lungo le strade formando nei punti più bassi pozze o veri e propri laghetti, dove si possono concentrare le uova disseminate per la città dai cani infestati e dove spesso si vedono giocare i ragazzi.

Nonostante che i Somali non tocchino il cane per motivi religiosi, esiste ugualmente per chiunque l'occasione di contrarre l'infestione per trasmissione indiretta; il fatto, invece, che l'idatidosi non rappresenti per la Somalia un problema sociale ci fa ritenere l'uomo non recettivo al ceppo di E. granulosus presente nel Paese.

La tendenza alla diversificazione in popolazioni distinte fino alla sottospeciazione da parte di E. granulosus è un dato ormai accertato; tale variabilità, rilevabile non tanto sul piano morfologico quanto sul piano biologico e biochimico, risulta favorita sia dai processi di autofecondazione che sembrano verificarsi nel cestode adulto che è ermafrodita, sia dalla poliembrionia caratteristica della forma larvale. L'autofecondazione favorisce la fissazione e l'espressione di mutanti, ciascuno dei quali ha la possibilità di aumentare rapidamente di numero, cioè di clonare, a seguito della moltiplicazione asessuata che si osserva nella fase cistica. Il risultato è la selezione di ceppi (o popolazioni) differenti con cicli mantenuti in natura in ospiti recettivi diversi per situazioni ecologiche.

Mediante prove biochimiche (3) ed isoenzimatiche (4) in Kenia è stata dimo-

strata una stretta affinità della forma umana con quella ovina del parassita e, in misura minore, con quella caprina così da far ritenere molto simile il ceppo presente in questi tre ospiti intermedi. La situazione dell'idatidosi del dromedario e del bovino rimane invece oscura dal momento che il ceppo responsabile della malattia in questi animali differisce sotto l'aspetto isoenzimatico e biochimico da quello precedente. Non sappiamo se il ceppo somalo sia simile a quello dei dromedari e dei bovini kenioti; è però ammissibile ritenerlo per la vicinanza dei due paesi e per il frequente passaggio del confine da parte di mandrie guidate da nomadi somali in cerca di pascoli migliori e di mercati più favorevoli.

La situazione epizootologica ed epidemiologica dell'idatidosi in Somalia, del tutto particolare rispetto a quella delle altre regioni, offre una chiara dimostrazione della molto probabile mancanza di recettività dell'uomo ad un ceppo di E. granulosus; pone però il problema se inserire semplicemente tale ceppo tra i varianti popolazionistici della specie o se prendere in considerazione la possibilità di una differenziazione a livello specifico.

BIBLIOGRAFIA

1. F.A.O. Production Yearbook. 1982. vol. 36.
2. PELLEGRINI, D. & SOBRERO, R. 1960. Prima indagine sull'idatidosi in Somalia. Idatidologia, 15-19 Sett. 1960; 19: 944-947.
3. McMANUS, D. 1981. A biochemical study of adult stages of Echinococcus granulosus of human and animal origin from Kenya. J. Helminth. 55: 2-27
4. MACPHERSON, C.N.L. & McMANUS, D.P. 1982. A comparative study of Echinococcus granulosus from human and animal hosts in Kenya using isoelectric focusing and isoenzyme analysis. Intern. J. Parasit. 12: 515-521.

Sessione III

INDAGINI SULLA RESISTENZA AGLI ESTERI FOSFORICI IN POPOLAZIONI ITALIANE DI CULEX PIPIENS

F. Villani, R. Romi, L. Cuoci e G. Majori

Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO- Nella presente nota viene segnalata la presenza in Italia di una popolazione di Culex pipiens resistente agli esteri fosforici. I risultati dell'analisi elettroforetica hanno evidenziato la presenza dell'allele Est-3^A con la frequenza del 70%. Prove effettuate con sinergici (DEF e PB) sembrano indicare tuttavia che tali esterasi non svolgano in questa popolazione un ruolo primario nella determinazione della resistenza.

SUMMARY In the present communication the presence of an organophosphate resistant population of Culex pipiens in Italy is reported. The results of the electrophoretic analysis of non-specific esterases showed that the allele Est-3^A was present with a frequency of 70%. However, tests carried out with synergists (DEF and PB) seem to indicate that those esterases do not play the primary role in developing resistance.

Nell'ambito di ricerche svolte in Italia su Culex pipiens, aventi lo obiettivo di valutare i livelli di sensibilità agli esteri fosforici e di verificare la correlazione tra resistenza a tale classe di insetticidi e esterasi particolarmente attive, è stato saggiato un campione di Cx. pipiens di Lucca proveniente da canali di scolo urbani epigei.

Gruppi di 20 larve al 3°-4° stadio sono stati esposti per 24 ore a diverse concentrazioni di Chlorpyrifos, Malathion, Fenthion e Temephos seguendo la tecnica descritta dall'O.M.S. (1).

I risultati di tali saggi sono stati confrontati con quelli già precedentemente riportati da Villani *et al.*, 1982 (2). I valori di LC₅₀, LC₉₀ e R/S, cioè rapporto tra la LC₅₀ del campione saggiato e la LC₅₀ del ceppo sensibile di riferimento, vengono riportati in Tab. 1. Dall'esame dei valori di R/S, risulta che il campione LUCCA presenta un livello di resistenza notevolmente più elevato rispetto agli altri (R/S pari a 42,9 per il Malathion e 146,1 per il Chlorpyrifos) e valori di LC₅₀ mai osservati finora in Italia.

Sullo stesso campione LUCCA è stato condotto uno studio elettroforetico per evidenziare la presenza di esterasi con elevata attività e verificare l'esistenza della correlazione, già riportata da altri autori (3,4,5), tra queste e il livello di resistenza agli esteri fosforici. L'elettroforesi su gel di amido è stata effettuata seguendo la metodica descritta da Villani *et al.* (1983) (5) utilizzando zanzare adulte di 3-4 giorni.

I risultati dell'analisi elettroforetica su LUCCA hanno evidenziato un certo grado di polimorfismo del locus Est-3 con una frequenza dell'allele Est-3^A pari a 0,70 ed una non chiara correlazione con il livello di resistenza osservato. Infatti la presenza dell'allele Est-3^A nel 70% degli individui saggiati, non giustifica un così elevato livello di resistenza. Inoltre tale frequenza non differisce significativamente da quella osservata in LATINA (60%) (2) nonostante questo ultimo ceppo risulti marcatamente meno resistente di quello di Lucca.

Tab. 1 Confronto tra i valori di LC_{50} , LC_{90} e R/S tra il campione di Culex pipiens di LUCCA e altri ceppi di Cx. pipiens italiano.

Località	LC_{50}	LC_{90}	R/S
<u>CHLORPYRIFOS</u>			
Palo Laziale	0.00031	0.00100	0.3
Grosseto	0.00132	0.00380	1.5
Roma	0.00043	0.00155	0.5
Castel Giorgio	0.00079	0.00119	0.9
Latina	0.00333	0.01495	3.7
Lucca	0.13000	0.85300	146.1
S (ceppo di rif.)	0.00089	0.00247	-
<u>MALATHION</u>			
Palo Laziale	0.04210	0.13200	1.3
Grosseto	0.06520	0.20390	1.9
Roma	0.03130	0.07740	0.9
Castel Giorgio	0.05830	0.12830	1.8
Latina	0.17190	0.81480	5.2
Lucca	1.41300	3.78900	42.9
S (ceppo di rif.)	0.03290	0.11380	-
<u>FENTHION</u>			
Palo Laziale	0.00238	0.00580	1.2
Roma	0.00189	0.00659	0.9
Latina	0.01042	0.03513	5.1
Lucca	0.01100	0.04400	5.5
S (ceppo di rif.)	0.00204	0.00355	-
<u>TEMEPHOS</u>			
Palo Laziale	0.00019	0.00052	1.2
Grosseto	0.00012	0.00034	0.7
Roma	0.00015	0.00038	0.9
Latina	0.00038	0.00095	2.3
Lucca	0.00250	0.01200	15.1
S (ceppo di rif.)	0.00016	0.00052	-

Tab. 2- Percentuali di mortalità osservate dopo 24 ore nel campione di Culex pipiens di LUCCA trattato con Chlorpyrifos, Chlorpyrifos + DEF (2,5mg/l) e Chlorpyrifos + PB (5mg/l).

CONCENTRAZIONE (mg/l)	% MORTALITA' (24h)		
	Chlorpyrifos	+ DEF	+PB
0.001	0.00	5.00	0.00
0.005	0.00	5.00	0.00
0.010	0.00	5.00	0.00
0.050	0.00	15.00	0.00
0.100	0.00	25.00	0.00
0.500	0.00	30.00	0.00
1.000	0.28	42.00	0.20
1.500	0.61	75.00	0.53

Allo scopo di chiarire se la resistenza di LUCCA fosse comunque dovuta ad una azione esterasica, magari modificata da qualche gene regolatore, o se altri enzimi o altri meccanismi fossero coinvolti in questo fenomeno, sono state effettuate alcune prove tossicologiche implicanti l'uso di sinergici, cioè inibitori di particolari enzimi. Come sinergici sono stati usati DEF (S,S,S-Tributilfosforotioato) inibitore di esterasi e PB (piperonilbutossido) inibitore di ossidasi, enzimi che possono svolgere un'azione secondaria nel processo di degradazione dei fosfororganici e quindi essere parzialmente coinvolti nello sviluppo della resistenza a tali insetticidi (6).

Gruppi di 20 larve al 3°-4° stadio del ceppo LUCCA sono state esposte alle concentrazioni subletali di 5 mg/l per il PB e 2,5 mg/l per il DEF, 4 ore prima dell'aggiunta dell'insetticida (Chlorpyrifos). Dopo 24 ore, sono state registrate le percentuali di mortalità osservate nei campioni trattati con DEF o con PB e confrontate con quelle del controllo.

I risultati di tali prove, riportati in Tab.2 hanno mostrato solo una parziale riduzione del livello di resistenza nel campione trattato con DEF e nessuno effetto apprezzabile del PB. Da questi dati si può quindi concludere che nel ceppo di Lucca, sia le esterasi che le ossidasi non sembrano svolgere un ruolo primario nella determinazione di un così elevato livello di resistenza. Pertanto è necessario ricercare tra gli altri possibili meccanismi d'azione quello che possa spiegare questo fenomeno.

Una delle ipotesi più probabili è che lo sviluppo della resistenza agli esteri fosforici possa essere dovuto ad un variante dell'enzima acetilcolinesterasi, soggetto ad un minor grado di inibizione da parte dell'insetticida. Tale meccanismo è stato finora ritenuto il responsabile primario della resistenza agli esteri fosforici in Musca domestica (7) e in Anopheles albimanus (8). In Cx. pipiens è stato finora evidenziato il coinvolgimento dell'esterasi nella resistenza agli esteri fosforici, tuttavia non si può escludere che mutazioni indipendenti interessanti altri geni possano determinare la formazione di un variante enzimatico capace di neutralizzare l'azione tossica dell'insetticida utilizzando un meccanismo diverso da quello dell'esterasi.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - OMS/VBC (1981) 81. 807
- 2 - VILLANI F., MAJORI G. e ROMI R. (1982). Osservazioni preliminari sui livelli di sensibilità agli esteri fosforici in popolazioni italiane del complesso Culex pipiens. Parassitologia, 24, (N. 2,3): 245-253
- 3 - PASTEUR N., SINEGRE G. and GABINAUD A. (1981). Est-2 and Est-3 polymorphisms in Culex pipiens L. from southern France in relation to organophosphate resistance. Biochem. Genetics 19: 499-508.
- 4 - GEORGHIOU G.P. and PASTEUR N. (1978). Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. J.Econ. Ent. 71: 201-205.
- 5 - VILLANI F., WHITE G.B., CURTIS C.F. and MILES S.J. (1983). Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of Culex pipiens L. (Diptera: Culicidae). Bull. Ent. Res., 73: 153-170.
- 6 - RANASINGHE L.E. and GEORGHIOU G.P. (1979). Comparative modification of insecticide resistance spectrum of Culex pipiens fatigans Wied. by selection with Temephos and temephos/sinergist combinations. Pestic. Sci. 10: 502-508.
- 7 - DEVONSHIRE A.L. and MOORES G.D. (1984). Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house flies (Musca domestica). Pestic. Biochem. & Physiol. 21: 336-340.
- 8 - HEMINGWAY J. e GEORGHIOU G.P. (1983). Studies on the acetylcholinesterase of Anopheles albimanus resistant and susceptible to organophosphate of and carbamate insecticides. Pestic. Biochem. & Physiol. 19: 167-171.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA DELL'EVERMECTINA CONTRO I CULICIDI

S. Pampiglione (a), G. Majori (b), G. Petrangeli (c), R. Romi (b)

(a) Istituto Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria, Cattedra di Parassitologia, Università di Bologna

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

(c) Istituto di Parassitologia, Università di Roma

Riassunto: E' stata saggiata l'azione insetticida dell'evermectina (MK-933) nei confronti di zanzare adulte nutrite con soluzione zuccherina o con sangue contenente il farmaco.

Sono state saggiate tre specie, Anopheles stephensi, Aedes aegypti e Culex quinquefasciatus, ottenendo una mortalità del 100% dopo 60 ore ad una dose in soluzione zuccherina di 2,8 mg di p.a./ litro; le prove effettuate nutrendo le zanzare su topi trattati per via sottocutanea con varie dosi di evermectina hanno dimostrato una elevata attività tossica contro gli ectoparassiti; alla dose di 28 mg di p.a./Kg di peso corporeo si è avuta una percentuale di mortalità dopo 36 ore del 100% per Anopheles stephensi, del 60% per Aedes aegypti e del 50% per Culex quinquefasciatus.

L'elevata attività per via sistemica dell'evermectina sembra offrire nuove possibilità di lotta contro le malattie trasmesse da artropodi.

Summary: The evermectin (MK933) was shown to have lethal effects when fed to adult female mosquitoes in sucrose solution or in blood. Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus underwent complete mortality with MK-933 at 2,8 mg e.i./l in sucrose solution within 60 hours. When female mosquitoes engorged blood from mice injected subcutaneously with evermectin at 28 mg a.i./Kg of body weight, mortality rates after 36 hours were 100% for Anopheles stephensi, over 60% Aedes aegypti and over 50% for Culex quinquefasciatus.

The systemic insecticidal effect was very high, particularly against An. stephensi.

INTRODUZIONE

Le avermectine costituiscono un nuovo gruppo di sostanze antiparassitarie isolate dalla fermentazione dell'actinomicete Streptomyces avermitilis (4).

L'azione dell'evermectina si esplica a livello del sistema nervoso interferendo con la liberazione del neurotrasmettitore GABA (acido gamma-amino-butyrico).

L'elevato effetto letale dimostrato dall'evermectina e derivati a dosaggi minimi su una vasta gamma di artropodi (9,7,1,2,8,4) associato ad una bassissima tossicità per gli animali vertebrati ci ha fatto pensare all'indubbio interesse che un farmaco del genere potrebbe avere nella lotta contro le malattie trasmesse da artropodi. Per gli artropodi ematofagi, infatti, l'assunzione del pasto di sangue da vertebrati trattati con evermectina potrebbe risultare letale se nel sangue vi fosse una dose sufficiente del farmaco. Alcune esperienze su zecche e su glossine parrebbero convalidare tale possibilità (8,7). Ed è evidente come la somministrazione all'ospite vertebrato di avermec-

tina nelle stagioni di trasmissione potrebbe influire notevolmente sul contatto tra vettore e ospite, selezionando popolazioni di vettori zoofili e antropofili o addirittura interrompendo il ciclo di trasmissione.

Con questo obiettivo abbiamo voluto sperimentare in via preliminare l'azione di una avermectina su Anopheles stephensi, Aedes aegypti e Culex quinquefasciatus.

MATERIALE E METODI

Il prodotto saggiato in laboratorio è stato la 22, 23 diidro avermectina B₁ (MK-933 della Merck Sharp & Dohme, Rahway, New Jersey, U.S.A.). Allo scopo di determinare la sopravvivenza di zanzare ingorgate con sangue contenente avermectina, sono state inoculate per via sottocutanea dei topi del peso medio di 35 g con diverse concentrazioni di prodotto diluito in soluzione fisiologica. Le dosi, somministrate una sola volta, variavano da 5 a 2.000 µg di principio attivo/topo, equivalente a 0,14 - 28 mg di p.a. / Kg di peso corporeo.

In un caso solo è stato inoculato una dose di 56 mg/Kg allo scopo di rilevare una attività insetticida non manifestata alla dose immediatamente inferiore.

Sono state adoperate zanzare femmine di 3-4 giorni di 3 specie allevate in laboratorio: An. stephensi, Ae. aegypti e Cx. quinquefasciatus. La temperatura durante le prove è stata mantenuta costantemente a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e l'umidità relativa al 70%. Gruppi di 50 zanzare sono state alimentate su topi dopo 12 ore dall'inoculazione. Le zanzare ingorgate sono state poste in gabbiette di tulle ed è stata rilevata la percentuale di sopravvivenza dopo 12, 24, 36, 48, 60, 72 ore dal pasto di sangue. 50 zanzare nutrite su topo non trattato sono state adoperate come controllo.

In un'altra serie di prove, le zanzare sono state nutrite su cotone impregnato con una soluzione al 5% di glucosio contenente differenti concentrazioni (0,14-28 mg. di p.a./l) di avermectina. L'esperimento è stato ripetuto due volte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dell'attività dell'avermectina delle 3 specie di zanzare sono riportati nei grafici 1-6. L'attività del farmaco è stata nettamente superiore nelle prove con soluzione zuccherina che in quelle su topo. Le dosi 2,8 mg. di p.a./l sono risultate sempre letali per tutte e tre le specie di zanzare nutritesi, in un tempo che non ha mai superato le 60 ore, mentre dosi maggiori hanno abbreviato tale periodo a 24-48 ore.

Nelle prove su topo la specie più sensibile è stata A. stephensi. Infatti, per tale specie si è registrata una sopravvivenza dello 0% alla dose di 2,8 mg di p.a./Kg dopo 36 ore.

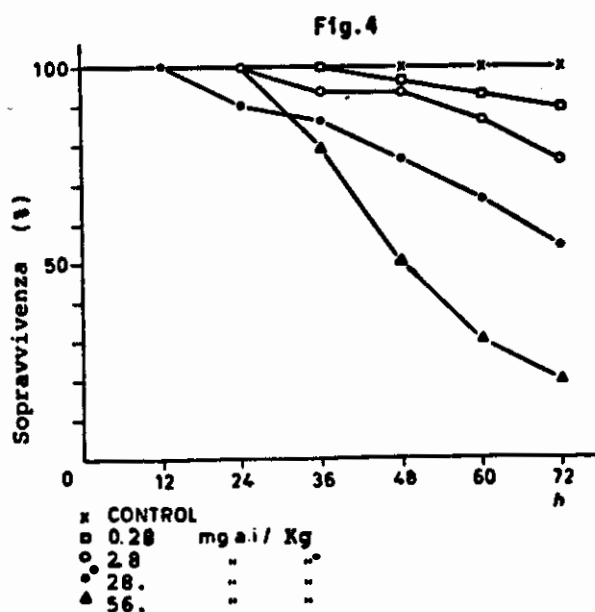
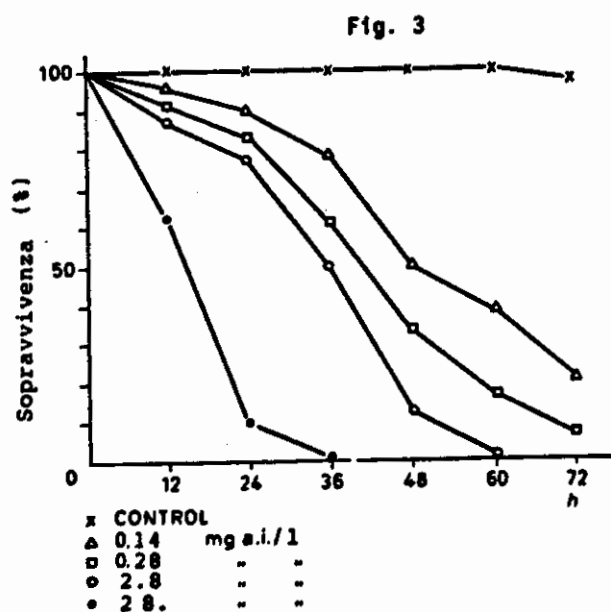
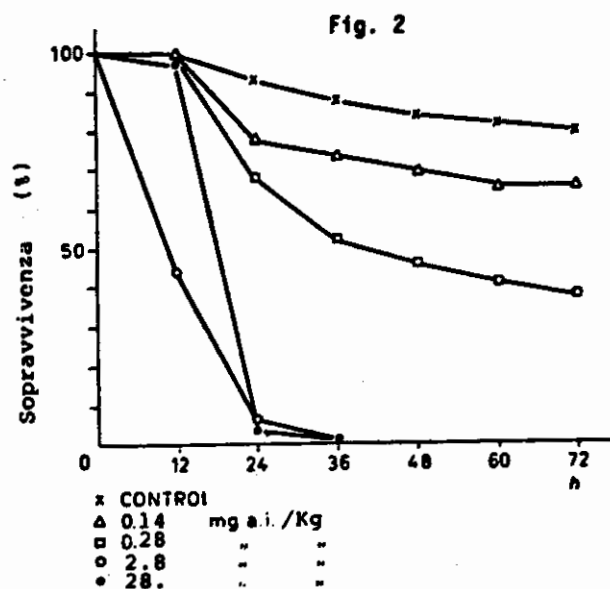
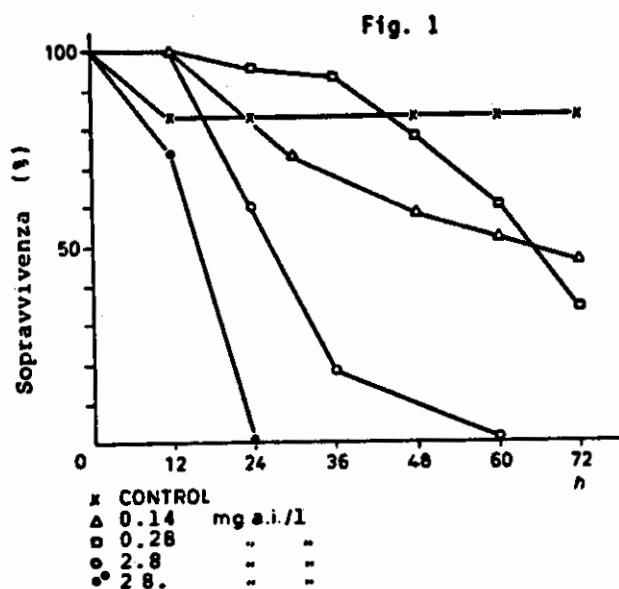
Per Ae. aegypti, dimostratasi la specie meno sensibile, si è dovuto aumentare la dose a 56 mg per ottenere una sopravvivenza di poco inferiore al 50%.

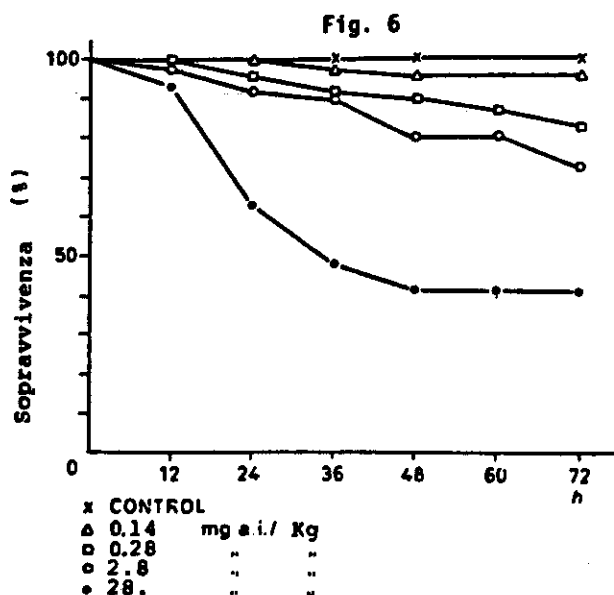
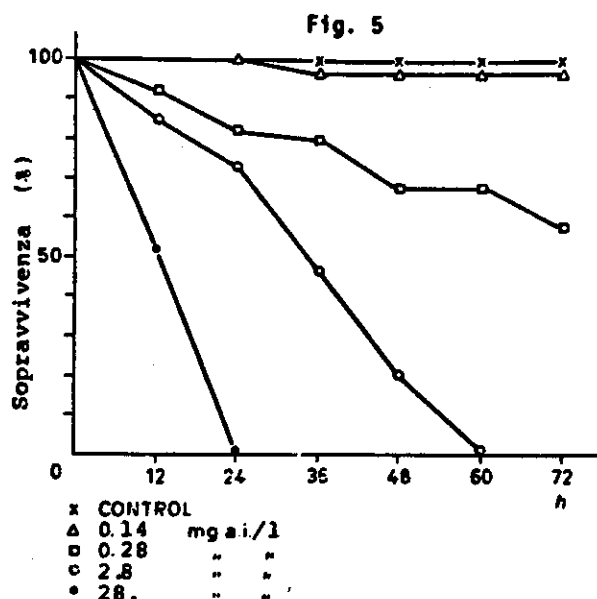
La minore attività del farmaco assunto attraverso il sangue di topo, a confronto con quella della soluzione zuccherina, si è manifestata in tutte e tre le specie ed in modo più accentuato in Cx. quinquefasciatus.

L'attività meno elevata della avermectina somministrata per via sistemica nel topo può essere dovuta alla sua metabolizzazione nell'organismo vivente del vertebrato, con parziale neutralizzazione dei siti attivi e/o all'assorbimento nei tessuti animali, data la spiccata liposolubilità del prodotto.

I risultati ottenuti ci sembrano interessanti, avendo dimostrato una netta azione del farmaco sulle specie considerate, anche se la diversa sensibilità delle varie specie non ci permette di azzardare generalizzazioni affrettate. L'effetto drammatico su A. stephensi ci autorizza a pensare che altre specie di Anopheles vettrici di malaria possano risultare ugualmente sensibili al farmaco.

Tali risultati, pertanto, sono incoraggianti per proseguire su questo filone di ricerca che potrebbe rappresentare un nuovo tipo di approccio al problema della lotta alle malattie trasmesse da artropodi ematofagi, quali la malaria, la leishmaniosi, l'oncocercosi, la theileriosi, e simili.





Figg. 1-6. Sopravvivenza (%) di zanzare femmine adulte di *A. stephensi*, *Ae. aegypti*, e *Cx. quinquefasciatus* nutrite con soluzione zuccherina al 5% contenente varie concentrazioni di avermectina (Fig. 1,3,5), o alimentate su topo trattato per via sottocutanea con avermectina (Fig. 2,4,6).

BIBLIOGRAFIA

1. BARTH, D. & BROKKEN, E.S. (1980). The activity of 22, 23-dihydro-avermectin B₁ against the pig louse, *Haematopinus suis*. *Veterinary Record*, 106, 388.
2. BARTH, D. & SUTHERLAND, I.H. (1980). Untersuchungen über die Wirksamkeit von Ivermectin gegenüber Ektoparasiten der Rinde. 9. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 26-29 March, Giessen, Germany.
3. BURG, R.W., MILLER, B.M., BAKER E.E., BIRNBAUM, J., CURRIE, S.A., HARTMAN, R., KONG, Y.L., MONAGHAN, R.L., OLSEN, G., PUTTER, I., TUNAC, J.B., WALLICK, H., STAPLEY, E.O., OIWA, R. & OMURA, S. (1979). Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15, 361-367.
4. CAMPBELL, W.C. (1981). Efficacy of the avermectins against filarial parasites: a short review. *Veterinary research communication*, 5, 251-262.
5. DISTELMAN, W., D'HAESLER, F. & MORTELMANS, J. (1983). Efficacy of systemic administration of ivermectin against tsetse flies. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, 63, 119-125.
6. DRUMMOND, R.O., WHETSTONE, T.M. & MILLER, J.A. (1981). Control of ticks systemically with Merck MK-933, an avermectin. *Journal of Economic Entomology*, 74, 432-436.
7. JAMES, P.S., PICTON, J. & RIEK, R.F. (1980). Insecticidal activity of the avermectins. *Veterinary Record*, 106, 59.
8. LEE, R.P., DOUGE, D.J. & PRESTON, J.M. (1980). The Efficacy of ivermectin against *Sarcoptes scabiei* in pigs. *Veterinary Record*, 107, 503-505.
9. OSTLIND, D.A., CIFELLI, S. & LANG, R. (1979). Insecticidal activity of the antiparasitic avermectins. *Veterinary Record*, 105, 168.

LOTFA BIOLOGICA CONTRO I CULICIDI: VALUTAZIONE DI NUOVE FORMULAZIONI A BASE DI BATTERI SPORIGENI

R. Romi e G. Majori

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto.- Vengono riportati i risultati di saggi di laboratorio effettuati con formulazioni a base di Bacillus sphaericus (ceppi 1523 e 2362) contro Culex pipiens s.l. e Anopheles stephensi ed i risultati della valutazione della persistenza d'azione di 4 formulazioni a base di Bacillus thuringiensis H-14.

Summary.- In the present paper the results of laboratory tests with formulations of Bacillus sphaericus (strains 1523 and 2362) against Culex pipiens s.l. and Anopheles stephensi are reported. The results on the efficacy of 4 formulations of Bacillus thuringiensis H-14 are also discussed.

INTRODUZIONE

I batteri sporigeni Bacillus sphaericus e Bacillus thuringiensis sono gli organismi entomopatogeni che hanno dimostrato le maggiori possibilità d'impiego nella lotta biologica contro i Culicidi, sia per la loro elevata efficacia contro gli stadi larvali, sia per l'assenza di rischi tossicologici per la fauna non- bersaglio e per l'uomo stesso (1-4).

In particolare i ceppi 1523 e 2362 di B. sphaericus ed il serotipo H-14 di B. thuringiensis esplicano un elevato potere patogeno nei confronti dei Culicidi. L'attività larvicida dimostrata è paragonabile a quella dei più efficaci insetticidi tradizionali (2-3).

B. sphaericus non ha ricevuto finora nessun tipo di formulazione su scala industriale, mentre B. thuringiensis H-14 è stato formulato in vari modi (polvere bagnabile, emulsione, granuli, ecc.) allo scopo di conferire al prodotto una permanenza la più lunga possibile nel corpo dell'acqua ai vari livelli di attività trofica delle larve di zanzare.

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di saggi di laboratorio sull'efficacia di 3 prodotti a base di B. sphaericus (1 polvere primaria e 2 polveri bagnabili) contro Culex pipiens ed Anopheles stephensi, ed i risultati sulla valutazione in laboratorio della persistenza d'azione di 4 prodotti a base di B. thuringiensis H-14.

MATERIALE E METODI

I prodotti a base di B. sphaericus saggiati in laboratorio sono stati la polvere standard prodotta dall'Istituto Pasteur di Parigi e due formulazioni in polvere bagnabile dei ceppi 1523 e 2362. Le prove sono state condotte su larve di Cx. pipiens s.l. e A. stephensi mantenuti in laboratorio.

Le prove di laboratorio sono state effettuate seguendo il metodo riportato

da Majori & Ali (5) per B. thuringiensis, rilevando la LC_{50} e LC_{90} a 48 ore in modo da evidenziare il massimo dell'attività larvicida esplicata da B. sphaericus.

Gruppi di 20 larve di 3° stadio-inizio del 4° sono stati esposti per 48 ore a varie concentrazioni di prodotto in 100 ml di acqua deionizzata (pH 7,8 + 0,1). Sono state preparate sospensioni all'1% (peso/volume) delle polveri di B. sphaericus, agitando per pochi minuti; l'agitazione è stata mantenuta per le diluizioni successive necessarie per i trattamenti. Ogni formulazione è stata saggiata 3 volte in occasioni diverse. Ogni volta sono state usate 4-5 concentrazioni con 3 repliche per ognuna e 3 controlli. E' stata sempre adoperata una sospensione madre preparata poco prima dell'impiego. La temperatura ambiente durante l'esposizione ai prodotti è stata di 26 ± 1 °C. La mortalità osservata è stata corretta adoperando la formula di Abbott, ed i valori della LC_{50} e LC_{90} sono stati calcolati con l'analisi dei probit secondo il metodo di Finney (6).

B. thuringiensis è stato saggiato in una formulazione granulare (Vectobac, Abbott Laboratories), in forma di briquets (Bactimos, Biochem Inc.) ed in forma di pellets realizzati dalla Biochem Inc.. Le prove sono state condotte in ambiente chiuso usando vasche di cemento (m 2x1) contenenti circa 600 litri di acqua di rubinetto esente da tracce di cloro. L'altezza del livello dell'acqua era di 30 cm.

Le dosi d'impiego sono state rispettivamente di 5,6 Kg per ettaro, 15 Kg/ha, e 5,6 Kg/ha.

Per le prove sono state adoperati gruppi di 300 larve di Cx. pipiens al 3°-4° stadio, introdotti ogni 24 ore nella vasca di sperimentazione fino a che si è ottenuto il 100% di mortalità.

Le larve sono state alimentate a giorni alterni con mangime integrato a base di farina di pesce. La temperatura ambiente è stata di 22 ± 2 °C.

Una vasca allestita nella medesima maniera è stata adoperata come controllo. In questa la mortalità larvale non ha mai superato il 10%.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati esposti nella Tabella A indicano che tutte e tre le formulazioni a base di B. sphaericus sono attive sui ceppi di laboratorio utilizzati.

L'attività biologica dimostrata è stata in accordo con le caratteristiche dei prodotti: la polvere primaria si è dimostrata circa dieci volte meno efficace delle due formulazioni dei ceppi 1523 e 2362. Queste ultime non hanno dimostrato una differenza apprezzabile di efficacia tra loro.

Per quanto riguarda la persistenza d'azione delle 4 formulazioni di B. thuringiensis, il risultato migliore è stato dato dai briquets, con una mortalità del 100% fino a 34 giorni dalla immissione del prodotto in vasca. E' da considerare a questo riguardo che il non allontanamento delle larve morte, ha contribuito al mantenimento della disponibilità delle spore e del corpo parasporale per le larve immesse successivamente. Dopo il trattamento con la formulazione granulare, e con le due formulazioni in forma di pellets, la persistenza d'azione è stata rispettivamente di giorni 10 e 12, con una percentuale di riduzione non inferiore al 100%.

In conclusione in base ai risultati delle prove eseguite è emersa una notevole efficacia delle due formulazioni di B. sphaericus 1523 e 2362, nonché la notevole attività larvicida delle formulazioni di B. thuringiensis H-14.

Tabella A. - Attività di Bacillus sphaericus su larve (3°-4° stadio) di Culex pipiens e Anopheles stephensi mantenute in laboratorio

Prodotto	Specie	Concentrazione letale a 48 h (ppm)			
		LC ₅₀	LC ₉₀	X ²	gdl
Polvere Primaria ceppo 1593	<u>Culex pipiens</u>	0,319	1,757	2,25	2
	<u>Anopheles stephensi</u>	0,686	1,889	7,39	3
Polvere bagnabile ceppo 1593	<u>C. pipiens</u>	0,033	0,097	2,90	2
	<u>A. stephensi</u>	0,080	0,205	2,21	2
Polvere bagnabile ceppo 2362	<u>C. pipiens</u>	0,024	0,062	4,82	2
	<u>A. stephensi</u>	0,088	0,266	4,86	3

BIBLIOGRAFIA

1. SINGER, S. 1980. Bacillus sphaericus for the control of mosquitoes Biotechnol. Bioengin. 22: 1335-1355.
2. ALI, A.- BAGGS, R.D.- STEWART, J.P. 1981. Susceptibility of some Florida chironomids and mosquitoes to various formulations of Bacillus thuringiensis var. israelensis. J. Econ. Entomol. 74: 672-677.
3. DE BARJAC, H. & COZ, J. 1979. Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à Bacillus thuringiensis var. israelensis. Bull. O.M.S. 57: 139-141.
4. GARCIA, R.- DESROCHERS, B.- TOZER, W. 1980. Studies on the toxicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis against organisms found in association with mosquito larvae. Proc. Pap. Calif. Mosq. Vector Contr. Assoc. 48: 25-27.
5. MAJORI, G. & ALI, A. 1984. Laboratory and field evaluations of industrial formulations of Bacillus thuringiensis var. israelensis against some mosquito species of central Italy. J. Invert. Pathol. 43: 316-323.
6. FINNEY, D.T. 1952. Probit analysis. Cambridge University Press, Londra.

DATI PRELIMINARI SULL'EFFICACIA DI REPELLENTI CHIMICI CONTRO PHLEBOTOMUS
PERNICIOSUS (DIPTERA, PSYCHODIDAE).

F.P. Fossati e M. Maroli

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Vengono riportati i dati preliminari sull'efficacia di tre repellenti per uso topico contro Phlebotomus perniciosus. L'Indalone ed MGK,11 hanno mostrato una efficacia maggiore del repellente standard Deet. I dati ottenuti indicano che P.perniciosus risulta più sensibile ai repellenti rispetto ad altre specie di artropodi ematofagi.

Summary. - Preliminary data on the effectiveness of three topical repellents against Phlebotomus perniciosus are reported. Indalone and MGK,11 were more effective than standard Deet. The data obtained indicate that P.perniciosus is highly sensitive to the repellents compared with the other bloodsucking arthropods.

Introduzione

L'uso appropriato di repellenti topici può fornire una buona protezione contro le punture di artropodi ematofagi ed è soprattutto consigliabile quale misura di profilassi ove non è possibile per situazioni ambientali, impiantare una lotta efficace contro i vettori di agenti patogeni per l'uomo e per gli animali. Ora, mentre sono state effettuate numerose ricerche di laboratorio e di campo sulla loro efficacia contro le zanzare, estremamente scarse sono le notizie sulla loro efficacia contro i flebotomi. In particolare vi sono dati in letteratura solo per quanto riguarda Phlebotomus papatasi (1) e recentemente su Lutzomyia longipalpis (2).

Nella presente comunicazione riportiamo i dati preliminari sull'efficacia di tre repellenti (Indalone, MGK,11 e Deet) contro P.perniciosus, specie ampiamente diffusa in Italia e di cui è stato ormai accertato sperimentalmente il ruolo vettore nella trasmissione di leishmaniosi viscerale umana e animale (3); inoltre da recenti studi sembra essere implicata anche nella trasmissione di alcuni arbovirus.

Materiali e Metodi

I flebotomi usati negli esperimenti provenivano da una colonia di P.perniciosus allestita da uno di noi (M.M.) nel 1981. Le tecniche di mantenimento della colonia sono state precedentemente descritte da Maroli *et al.* (4).

Sono state usate complessivamente 1.800 femmine adulte della specie di età compresa fra i 2 e 15 giorni; l'ampio intervallo dell'età dei flebotomi riproduceva situazioni naturali in cui l'uomo può trovarsi ad essere punto dai flebotomi.

I repellenti usati erano: Deet (N-N-dietyl-m-toluammide); Indalone (Butil-3,4-diidro-2,2-dimetil-4-ossi-2H-piran-6-carbossilato); MGK,11 (1,5a,6,9,9a,9b,-

esaidro- 4a(4H)-dibenzofuran carbossialdeide).

I volontari umani erano complessivamente 21, appartenenti ai due sessi, di età compresa fra 24 e 58 anni. In ogni test sono stati utilizzati 15 volontari, ognuno ha effettuato due prove, per un totale di 30 repliche per repellente. 12 volontari hanno effettuato il ciclo completo per i 3 repellenti, sei prove in totale; 9 volontari hanno effettuato due repliche per un solo repellente.

Il test usato per la determinazione della dose efficace al 50%, e che è stato descritto da Buescher et al. (2) consisteva nel trattare cinque aree circolari dell'avambraccio di un volontario con dosi scalari di repellente sulle quali veniva applicata la gabbia contenente 20 femmine di P. perniciosus. Dopo alcune prove iniziali è stata necessaria apportare una modifica alla gabbia per evitare la fuga dei flebotomi e il mescolamento di vapori di repellente a diverse concentrazioni. Le condizioni sperimentali e la modifica apportata alla gabbia saranno descritte dettagliatamente in un prossimo lavoro più esteso sull'argomento.

L'elaborazione dei risultati è stata effettuata con il metodo dell'analisi probabilistica di Finney (5). Per il calcolo dei limiti di confidenza statistica è stata utilizzata la statistica "g" di Goldstein (6).

Risultati

Per stimare l'ED₅₀ (Effective Dose) di ogni repellente sono state necessarie 30 prove. La valutazione dell'efficacia è basata sulla stima dell'ED₅₀ e dei suoi limiti di confidenza statistica al 95%.

Per il Deet si è ottenuta un'ED₅₀ di 0,858 ug/cm² (limiti di confidenza statistica al 95%: 0,647-0,987); per l'MGK,11 si è ottenuta un'ED₅₀ di 0,375 ug/cm² (0,087-0,567); per l'Indalone si è ottenuta un'ED₅₀ di 0,188 ug/cm² (0,034-0,0342).

Confrontando i limiti di confidenza statistica si può quindi notare che l'ED₅₀ del Deet è significativamente maggiore di quella dell'MGK,11 e dell'Indalone, indicando così una minore attività repellente contro questa specie. Poiché l'MGK,11 e l'Indalone hanno un ED₅₀ non statisticamente differente, la loro repellenza intrinseca è quindi equivalente.

Da un confronto dei nostri dati con quelli di Buescher et al. (2), è possibile notare che l'Indalone e l'MGK,11 si sono mostrati più efficaci nei confronti di P. perniciosus rispetto a L. longipalpis, mentre il Deet ha rivelato una repellenza intrinseca equivalente contro le due specie.

Dai nostri risultati e da quelli di Buescher (2) e di Dremova e Markina (7) risulta evidente che i flebotomi sono notevolmente più sensibili ai repellenti rispetto a diverse specie di zanzare, pulci e zecche.

L'estrema sensibilità dei flebotomi alle sostanze repellenti suggerisce che la profilassi delle malattie da essi trasmesse debba tener in debito conto l'uso di repellenti, i quali possono rivelarsi estremamente importanti come mezzo di prevenzione, riducendo l'opportunità di contatto (e quindi di trasmissione della malattia) tra l'uomo e il vettore.

BIBLIOGRAFIA

1. SCHMIDT, M.L. & SCHMIDT, J.R. 1969. Relative effectiveness of chemical repellents against Phlebotomus papatasi. J. Med. Entomol. 6: 79-80.
2. BUESCHER, M.R., RUTLEDGE, L.C., WIRTZ, R.A., GLACKIN, K.B. & MOUSSA, M.A. 1982. Laboratory tests of repellents against Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol., 19: 176-180.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1984. The Leishmaniases. Tech. Rep. Ser., 701.
4. MAROLI, M., GUANDALINI, E. & FIORENTINO, S. 1983. Colonie di flebotomi in laboratorio: tecniche di allevamento, ciclo di sviluppo e loro impiego in progetti di ricerca. Parassitologia, 25 (in corso di stampa).

5. FINNEY, D.J. 1977. Probit analysis. Cambridge University Press, New York.
6. GOLDSTEIN, A. 1964. Biostatistics: an introductory text. McMillan, New York.
7. DREMOVA, V.P. 1 MARKINA, U.V. 1975. The problem of minimum effective doses of repellents. Angew. Parasitol., 16: 1977-81.

TRASMISSIONE TRANSOVARICA DI DUE PHLEBOVIRUS (BUNYAVIRIDAE) DOPO INFEZIONE SPERIMENTALE DI PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS (DIPTERA, PSYCHODIDAE)

M.G. Ciufolini (a), M. Maroli (b), E. Guandalini (b) & P. Verani (a)

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

Riassunto. - Allo scopo di verificare la possibilità di un ciclo di trasmissione transovarica di virus da parte di flebotomi, esemplari di una colonia di Phlebotomus perniciosus sono stati infettati mediante le tecniche di inoculazione intratoracica e di "membrane feeding" con i virus Toscana ed Arbia, due Phlebovirus isolati in Italia da questa specie di flebotomi. Dopo inoculazione intratoracica, il virus Toscana risultava trasmesso (verticalmente) al 77% degli adulti della progenie F_1 ed al 70% di quelli della progenie F_2 , mentre solo due larve al III stadio della progenie F_1 delle femmine infettate per ingestione orale risultavano positive. Il virus Arbia risultava trasmesso al 47% degli adulti della progenie F_1 , al 37% della F_2 ed al 29% della F_3 delle femmine infettate mediante inoculazione intratoracica. E' questa una conferma sperimentale della possibilità che la trasmissione transovarica sia uno dei meccanismi di sopravvivenza in natura di questi virus.

Summary. In order to demonstrate the possibility of a transovarial transmission cycle, laboratory reared Phlebotomus perniciosus were infected by intrathoracic inoculation and membrane feeding techniques with two Phleboviruses (Toscana and Arbia viruses) isolated in Italy from this sandfly species. Toscana virus was transovarially transmitted to 77% of F_1 and 70% of F_2 adults progeny of inoculated flies, and two larvae of orally infected sandflies. Arbia virus was transmitted to 47% of F_1 , 37% of F_2 and 29% of F_3 adults progeny of sandflies infected by intrathoracic inoculation. These results indicate that transovarial transmission could be one of the mechanism by which Toscana and Arbia viruses may be maintained in nature.

Il virus Toscana ed il virus Arbia (famiglia Bunyaviridae, genere Phlebovirus) sono stati isolati da esemplari della specie Phlebotomus perniciosus e P. perfiliewi raccolti in natura (1). I numerosi isolamenti virali ottenuti da maschi di flebotomo ed il fatto di non aver ancora trovato un vertebrato che sviluppi una viremia ad alto titolo, che quindi possa fungere da serbatoio, induce ad ipotizzare per questi, come già dimostrato per altri Phlebovirus (2), l'esistenza di un ciclo di trasmissione transovarica. Questo meccanismo permetterebbe la sopravvivenza del virus nel proprio vettore durante i mesi invernali indipendentemente dalla presenza di un ospite vertebrato suscettibile all'infezione. Recentemente, avevamo dimostrato la capacità del virus Toscana e del virus Arbia di replicarsi in P. perniciosus sia dopo inoculazione intratoracica che dopo ingestione orale di sangue infetto (3), ci è sembrato perciò interessante verificare la possibilità di una trasmissione transovarica dei due virus in P. perniciosus dopo infezione sperimentale.

I flebotomi usati nel nostro studio provenivano da una colonia di P. perni-

ciosus allestite da uno di noi (M.M.) nel 1981 (4). Poiché la colonia originava da femmine di P. perniciosus raccolto in Toscana, sono state condotte prove di isolamento del virus dalla colonia stessa; il risultato è stato negativo.

In ogni esperimento circa 100 femmine di P. perniciosus sono state infettate o mediante inoculazione intratoracica o per ingestione orale di sangue infetto con il virus Toscana e con il virus Arbia.

Il virus Toscana, ceppo I.S.S.Ph1.3 ed il virus Arbia, ceppo I.S.S.Ph1.35, sono stati usati come sospensione al 10% di cervello di topo. Alcuni flebotomi sono stati congelati a -70 subito dopo l'infezione per valutare il titolo virale al tempo iniziale. Le rimanenti femmine, dopo il pasto di sangue, sono state poste in container per ovodeporre ed alcune di esse sono state congelate a -70 subito dopo l'ovodeposizione per controllarne la positività per il virus. La progenie è stata allevata fino allo stadio adulto e quindi saggiata in parte per la presenza di virus, e in parte mantenuta per ottenere le successive generazioni. Per la valutazione del titolo virale, ogni flebotomo è stato saggiato individualmente, dopo omogeneizzazione, in piastrine microtiter di cellule VERO (rene di cercopiteco). Il titolo virale è stato espresso secondo Kärber come la dose infettante il 50% delle colture di tessuto ($TCID_{50}$). Nel fluido soprannatante di alcuni esemplari infetti è stata identificata la presenza del virus Toscana o Arbia mediante un saggio di fissazione del complemento.

Sia il virus Toscana che il virus Arbia sono risultati trasmessi alle generazioni successive dopo infezione mediante inoculazione intratoracica, che, sebbene fosse una via artificiale, si era rivelata, la più efficiente con questi due virus (3) e con Phlebovirus diversi in studi di altri autori (5).

Il virus Toscana è risultato infatti trasmesso sia alla prima che alla seconda generazione di insetti infettati per questa via. Un piccolo numero delle femmine inoculate era stato saggiato subito dopo l'ovodeposizione e tutte erano risultate positive per il virus. Degli adulti della progenie F_1 , progenie di 25 femmine inoculate, il 77% (40/52) è risultato positivo per il virus Toscana. Dalla ovodeposizione di 8 femmine F_1 ha avuto origine una progenie F_2 i cui individui erano infetti per il 70% (38/54). Tale percentuale di trasmissione transovarica è risultata essere superiore a quella attesa, in quanto solo il 77% della progenie F_1 è risultato infetto e quindi in grado di trasmettere il virus. La media e l'intervallo dei titoli virali quindi risultavano in ambedue le generazioni più alti nelle femmine che nei maschi, ma non superavano mai i $3-4 \log_{10} TCID_{50}/ml$. La media dei titoli virali in totale risultava la stessa nelle due generazioni ($2.5 \log_{10} TCID_{50}/ml$).

Dopo inoculazione intratoracica del virus Arbia abbiamo esaminato la progenie di 3 generazioni. La percentuale di trasmissione transovarica negli adulti F_1 è stata del 47% (28/60). Da 21 femmine F_1 si è ottenuta una F_2 i cui individui risultavano infetti per il 37% (18/24), mentre della generazione F_3 ottenuta dalla ovodeposizione di 20 femmine F_2 , il 29% degli individui (7/24) risultava positivo per il virus Arbia. La percentuale di trasmissione transovarica risultava quindi meno elevata di quella del virus Toscana, ma più alta, anche in questo caso, di quella attesa. I livelli di virus per flebotomo risultavano inoltre essere simili a quelli ritrovati nei flebotomi dopo infezione con il virus Toscana.

In una prova di infezione con virus Toscana, mediante "membrane feeding", in cui venivano saggiati i diversi stadi del ciclo di sviluppo della F_1 (uova, larve, pupe, adulti), sono risultate positive due larve al III stadio. Tale risultato, sebbene preliminare, ci permette di ritenere possibile questo meccanismo di trasmissione anche dopo ingestione di sangue infetto. E' inoltre necessario tener conto della possibilità di cambi nella suscettibilità all'infezione derivanti dal fatto che i flebotomi della colonia vivono in condizioni artificiali.

I nostri risultati sperimentali suggeriscono quindi che i due Phlebovirus Toscana e Arbia possono essere mantenuti parzialmente od esclusivamente mediante trasmissione transovarica nella popolazione di P. perniciosus da cui vengono trasmessi in natura. Rimane ancora da dimostrare tuttavia il meccanismo di

sopravvivenza del virus nel lungo periodo di diapausa larvale.

E' importante inoltre notare che gli insetti infettati transovaricamente hanno gli stessi bassi livelli di virus ritrovati nei flebotomi infettati sperimentalmente o nei flebotomi raccolti infetti in natura (3). Possiamo perciò ipotizzare che sia caratteristica di queste associazioni virus-flebotomo una bassa concentrazione virale che sarebbe tuttavia sufficiente a permetterne la trasmissione ad un vertebrato.

Ringraziamenti: Gli autori esprimono il loro ringraziamento al Sig. G. Caricati per la preziosa assistenza editoriale. Il lavoro è stato in parte eseguito con contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetto Finalizzato "Controllo delle Malattie da Infezione" (No. 84.03102.52) e del W.H.O. T.S.A.(B) Reg. file V/2/181/189.

BIBLIOGRAFIA

1. VERANI, P., CIUFOLINI, M.G., NICOLETTI, L., BALDUCCI M., SABATINELLI, G., COLUZZI, M., PACI, P. & AMADUCCI L. 1982. Studi ecologici ed epidemiologici del virus Toscana, un arbovirus isolato da flebotomi. Ann.Ist.Super. Sanità 18: 397-400.
2. ENDRIS, R.G., TESH, R.B. & YOUNG, D.G. 1983. Transovarial transmission of Rio Grande Virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) by the sandfly Lutzomyia anthophora. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 862-864.
3. CIUFOLINI, M.G., MAROLI, M. & VERANI, P. 1985. Growth of two Phlebovirus after experimental infection of their suspected sandfly vector. Phlebotomus perniciosus (Diptera: Psychodidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 174-179.
4. MAROLI, M., GUANDALINI, E. & FIORENTINO, S. 1983. Colonie di flebotomi in laboratorio: tecniche di allevamento, ciclo di sviluppo e loro impiego in progetti di ricerca. Parassitologia XXV.
5. TESH, R.B. & MODI, G.B. 1984. Studies on the biology of Phleboviruses in sandflies (Diptera: Psychodidae) I. Experimental infection of the vector. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 1007-10016.

EFFETTI DI ALCUNI SOLFURI SULLA RIPRODUZIONE E SUGLI STADI LARVALI IN AEDES AEGYPTI E IN CULEX PIPIENS

G. Dojmi di Delupis (a), S. Costantini (b) e R. Giordano

(a) Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Laboratorio di Tossicologia Applicata Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto - Sono stati messi a punto due modelli sperimentali per studiare gli effetti di solfuri solubili ed insolubili sulla deposizione e vitalità delle uova e sulla sopravvivenza delle larve di Culicidae (Aedes aegypti e Culex pipiens molestus).

Summary - Two experimental models have been carried out to study the effects of soluble and insoluble sulfides on oviposition, eggs and larvae in Culicidae (Aedes aegypti and Culex pipiens molestus).

Introduzione

Al fine di iniziare uno studio sugli effetti della presenza di solfuri nelle acque sui Culicidi, sono stati messi a punto due modelli sperimentali.

L'enorme abbondanza di larve di Culex pipiens riscontrata in acque solfuree naturali (1) e l'osservazione fatta in laboratorio sulla facilità per Aedes aegypti nel deporre le uova su campioni delle stesse acque, hanno condotto ad escogitare un modello sperimentale adatto allo studio degli effetti di solfuri in soluzione sulla deposizione di uova di Culicidi e sulla loro vitalità.

La constatazione dello sversamento, con notevole diffusione, di solfuri insolubili in acque superficiali, causato da industrie estattive di produzione dell'antimonio (2), ha condotto alla messa a punto di un secondo modello sperimentale diretto allo studio di possibili effetti su larve di Culicidi.

Materiali e metodi

Nel primo modello sperimentale, realizzato con due esperimenti, femmine di Aedes aegypti, alimentate con un pasto su cavia, sono state collocate in una gabbia di dimensioni 60 x 40 x 40 cm. In essa sono stati posti in fila ed in posizione randomizzata 9 becher da 100 ml, di cui uno contenente 50 ml di acqua distillata e gli altri 8 la stessa quantità di soluzioni di solfuro di sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) a concentrazioni variabili da 1 g/l (0.00416 M) a 8 g/l, ad intervalli di unità. Le femmine venivano lasciate a deporre le uova più volte in un periodo di 5-6 giorni a 25°C. Le soluzioni utilizzate venivano rinnovate ogni giorno.

Nel secondo modello sperimentale, circa 100 larve al quarto stadio di Culex pipiens molestus sono state collocate in un contenitore con circa 500 ml di acqua a 25°C, sul fondo del quale sono state poste delle masserelle algali a forma di lamine composte da fitti intrecci di filamenti (Cianoficee). Queste lamine sono state previamente poste a contatto con un solfuro insolubile, nel caso specifico trisolfuro di antimonio, il quale, fatto depositare sul fondo del recipiente con acqua, ha potuto impregnare con il suo fine particolato (setacciato con setaccio a 400 mesh) le masse algali, penetrando tra i filamenti. Dopo il trattamento, alcune larve sono state osservate al microscopio e dopo 4 giorni è stata controllata la mortalità larvale mediante confronto con altro lotto costituito dallo stesso numero di larve poste però a contatto con sole alghe; su di un gruppo di 31 larve è stato determinato il contenuto di antimonio mediante spettrofotometria di assorbimento atomico a fornace di grafite.

Risultati

Nel primo modello sperimentale i conteggi delle uova deposte mettono in evidenza che solo in corrispondenza delle concentrazioni di 3 e 4 g/l vi è una marcata diminuzione delle uova (0.46 - 5.55 % delle uova deposte in tutte le soluzioni contro il 37.22 - 55.13 % rappresentato dalle uova deposte in acqua distillata). A concentrazioni più elevate non ne appaiono più.

Sostanzialmente, le uova fornivano larve solo nella soluzione a concentrazione di 1 g/l, ove quest'ultime, in numero notevolmente inferiore rispetto alla acqua distillata, morivano tutte se si rinnovava la soluzione. In corrispondenza delle concentrazioni di 3 e 4 g/l le uova sono state trovate tutte sul fondo; in esse veniva a mancare il processo di annerimento dell'endocorion, che in Aedes aegypti normalmente avviene entro circa 2 ore dalla loro deposizione.

Nel secondo modello sperimentale, appare che la mortalità delle larve in presenza di trisolfuro di antimonio è più di tre volte maggiore (78%) di quella riscontrata nel controllo. Le larve, attratte dalle alghe, ingerivano in notevole quantità le particelle della sostanza in studio, come appariva dall'esame microscopico del loro intestino. Il loro contenuto di antimonio è stato di 34 mg/g di peso secco.

Discussione

Il primo modello sperimentale dimostra una scarsa selettività in Aedes aegypti nel deporre le uova su acqua o soluzioni di solfuro di sodio, contrariamente a quanto avviene tra i Culicidi nei riguardi di altre sostanze tossiche (metalli pesanti) scartate dalle femmine nella deposizione delle uova anche a bassissime concentrazioni (3).

Le uova deposte però, per la maggior parte, non sono vitali: nel brevissimo periodo di 2 ore dopo la deposizione, le uova di Aedes aegypti sono permeabili all'acqua e sono quindi presumibilmente meno protette dall'aggressione di sostanze tossiche. La tossicità del solfuro di sodio in soluzione per uova e larve, può attribuirsi alla complessa sequenza di reazioni che i solfuri possono provocare in mezzo acquoso (4). La mortalità delle larve, riscontrata appena si rinnovava la soluzione, può essere spiegata con l'ipotesi di una maggiore partecipazione del gruppo HS^- , tra i prodotti di queste reazioni, ad una azione tossica combinata.

Esperimenti sono in corso per l'applicazione di questo modello sperimentale a Culex pipiens, al fine di effettuare un confronto tra le due specie.

Il secondo modello sperimentale, applicabile anche ad altre sostanze tossiche, conduce a considerazioni di carattere generale, in quanto mette in luce la importanza dell'azione tossica del sedimento, anche quando la colonna d'acqua sovrastante sia priva di sostanze tossiche in soluzione. Nel caso che più comunemente si può verificare in acque superficiali, in cui la probabilità d'incontro con le particelle tossiche, prodotta dall'attrazione verso il cibo, sia sufficientemente bassa da non avere conseguenze letali, le larve di questa specie possono comunque diffondere e veicolare sostanze tossiche nella colonna d'acqua o in seno a catene trofiche.

Bibliografia

1. RIVOSECCHI L., DOJMI DI DELUPIS G., NOCCIOLI M., RUBECA L. 1975 .
Stato di conservazione delle sorgenti pedemontane dell'Agro Pontino e anofelismo residuo. In: Atti del V simposio nazionale sulla conservazione della natura.
Bari, 22-27 Aprile 1975.
2. UGOLINI G. e OTTAVIANI M. 1978 . Alterazioni ambientali connesse con la industria estrattiva di produzione dell'antimonio e derivati. *L'ingegnere* 54:19-27
3. SALAMA H.S and ATA M.A .1972. Reactions of mosquitoes to chemicals in their oviposition sites . *Z. angew. Entomol.* 71:53-57
4. WEGNER G.S and HAMILTON R.W. 1976. Effect of calcium sulfide on Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae) egg hatchability. *Env. Ent.* 5:256-258