

dell'Istituto Superiore di Sanità

Volume 22, N. 1, 1986

**La Parassitologia italiana nel 50° anniversario
dell'Istituto Superiore di Sanità e nel 25° anniversario
della Società Italiana di Parassitologia**

XIII Congresso della Società Italiana di Parassitologia

Atti a cura di:

E. BIOCCA, A. MANTOVANI e M. MAROLI

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ - VIALE REGINA ELENA, 299 - ROMA

**LA PARASSITOLOGIA ITALIANA NEL 50° ANNIVERSARIO
DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
E NEL 25° ANNIVERSARIO DELLA SOCIETA'
ITALIANA DI PARASSITOLOGIA**

XIII Congresso della Società Italiana di Parassitologia

*Istituto Superiore di Sanità
Roma, 3-5 Dicembre 1984*

**Atti a cura di
E. Biocca, A. Mantovani e M. Maroli**

CONTENUTO

Introduzione

Pag. 1

TAVOLA ROTONDA

Criteri di innocuità ed efficacia degli antelmintici ed anticoccidici per uso veterinario

Pag. 3

Anthelmintics and anticoccidials: introduction to round table – R. Lorenzini » 5

Host-parasite relationship and interaction with pharmacological treatment – C. Genchi » 9

Il trattamento antelmintico come misura di controllo nelle elmintiasi – R. Restani » 11

Farmaci anticoccidici e loro uso – G. Pagnini » 13

Un metodo rapido, specifico e sensibile di identificazione dei residui di farmaci antelmintici nel latte e carne mediante spettrofotometria di massa MS/MS – R. Maffei Facino e M. Carini » 19

Criteri per la valutazione tossicologica di anticoccidici ed antiparassitari nelle produzioni zootecniche – A. Macri e C. Ricciardi » 31

Coccidiostatici: problemi analitici aperti – G. Settimj » 37

Investigations on safety problems for man and animals with veterinary anthelmintics – D. Düwel » 43

Development of antiparasitic agents for livestock. Efficacy data requirements for the target animal. International aspects – R.A. Roncalli » 49

Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in animals – L.M. Crawford » 51

Relazione conclusiva – L. Bellani » 53

TAVOLA ROTONDA

Recenti studi sulla biologia dei flebotomi e loro ruolo vettore nella trasmissione di agenti patogeni Pag. 57

I pozzi come possibili focolai larvali di flebotomi nell'isola di Zante (Grecia) – E. Biocca e R. Costantini » 59

Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921: intérêt épidémiologique des approches écophysiologique, éthologique et chorologique – J.A. Rioux » 61

Osservazioni sulla biologia di una colonia di *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) – M. Maroli » 63

Genetic isolating mechanism between different forms of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) – R. Ward, A. Phillips and B. Burnet » 69

Biología de los flebotomos ibéricos (Diptera, Psychodidae) en condiciones naturales — E. Martínez-Ortega	Pag.	73
Ecologia ed epidemiologia dei virus trasmessi da flebotomi in Italia — P. Verani, S. Caciolli, A. Renzi, M.G. Ciufolini e L. Nicoletti	»	79
Sandfly control perspectives — N. Rishikesh	»	87

TAVOLA ROTONDA

Problemi di parassitologia in parchi e riserve naturali	Pag.	91
Osservazioni parassitologiche ed epidemiologiche su macro e micromammiferi di parchi naturali o di zone di protezione — T. Balbo e R. Costantini	»	93
Interazione fra ruminanti domestici e selvatici nella epidemiologia delle elmintiasi — C. Genchi, A. Bossi e W. Frigo	»	95
Problemi da roditori in aree soggette a vincoli protezionistici — L. Santini	»	103
Emoparassitosi aviarie nel parco del Ticino ed in altre zone italiane — L. Sacchi e C. Prigioni	»	111
Indagine sui parassiti presenti in volpi (<i>Vulpes vulpes</i>) della provincia di Forlì — G. Pogliayen, V. Guberti e B. Leoni	»	117
Artropodi ematofagi del parco naturale di "Migliarino - S. Rossore - Massaciuccoli" — L. Rivocecchi, C. Khoury e E. Stella	»	121
Lotta contro gli artropodi e salvaguardia dell'ambiente — G. Sacca	»	127
Il problema dei chironomidi (Diptera, Chironomidae) in laguna di Venezia — U. Ferrarese e G. Cerretti	»	129
Il "sistema-UTM" del territorio italiano ed organizzazione del suo impiego nella cartografia tematica italiana conforme ai modelli nazionali ed europei — S.L. Distefano	»	137

TAVOLA ROTONDA

Problemi e metodi della parassitologia molecolare	Pag.	145
Problemi della biologia di base dei plasmodi — E. Dore	»	147
Aspetti genetici e molecolari della farmaco-resistenza in <i>Schistosoma mansoni</i> — L. Pica e D. Cioli	»	153
Un DNA sincronizzatore: il kDNA dei tripanosomi — P.A. Battaglia, C. Birago e M. Ponzi	»	157
Eterogeneità della tubulina dei protozoi parassiti — P. Cappuccinelli, D. Zicconi, C. Sellitto e V. Viclicky	»	163
New technologies and classical parasitology: the use of monoclonal antibodies to identify parasites inside the vectors — F. Esposito and S. Lombardi	»	169
Modificazioni delle larve neonate di <i>Trichinella spiralis</i> durante la maturazione — F. Bruschi, M.P. Viola-Magni e R.A. Binaghi	»	173

COMUNICAZIONI

Sessione I

Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso). Livelli di trasmissione della malaria: dati entomologici — P. Rossi, L. Mancini, A. Belli e G. Sabatinelli	Pag. 181
Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso). Livelli di trasmissione della malaria: dati protozoologici — G. Sabatinelli, A. Boanan, L. Lamizana e P. Rossi	» 185
Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso): il complesso <i>Anopheles gambiae</i> nella città di Ouagadougou e villaggi limitrofi — V. Petrarca, G. Petrangeli, P. Rossi e G. Sabatinelli	» 189
Programma di lotta antimalarica a Ouagadougou (Burkina Faso). Dispersione di <i>Anopheles gambiae</i> s.l. in zona urbana — G. Sabatinelli, P. Rossi e A. Belli	» 193
Livelli di sensibilità di <i>Anopheles gambiae</i> s.l. agli insetticidi tradizionali e valutazione dell'efficacia di <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> e <i>Bacillus sphaericus</i> — G. Majori, G. Sabatinelli, P. Rossi, R. Romi e F. Villani	» 197
Valore diagnostico del numero dei rami delle setole antepalmate per l'identificazione delle specie italiane del complesso <i>Anopheles maculipennis</i> — D. Boccolini, A. Sabatini e M. Coluzzi	» 201
Ruolo della competizione nella distribuzione di vettori di malaria in Italia — M. Coluzzi e A. Sabatini	» 205
Il complesso <i>Anopheles gambiae</i> in Mozambico — V. Petrarca, G.C. Carrara, M.A. Di Deco e G. Petrangeli	» 209
Identificazione morfologica di alate di <i>Anopheles merus</i> in Mozambico in una zona di simpatria con <i>An. gambiae</i> e <i>An. arabiensis</i> — M.A. Di Deco, G.C. Carrara, V. Petrarca e S. Bagalino	» 211
Esame comparativo di tassi di infezione con sporozoi e filarie in diverse forme del complesso <i>Anopheles gambiae</i> in un villaggio del Mali — Y.T. Touré, V. Petrarca e M. Coluzzi	» 215
Zanzariere a barriera per il campionamento di culicidi in attività di puntura su animali — Y.T. Touré e M. Coluzzi	» 219
Osservazioni di laboratorio su polimorfismi da inversione originati da incroci tra popolazioni diverse di <i>Anopheles gambiae</i> s.s. — A. Persiani, M.A. Di Deco e G. Petrangeli	» 221
Osservazioni su polimorfismi da inversione in una popolazione di laboratorio di <i>Anopheles stephensi</i> — M.A. Di Deco e H. Tran Duc	» 225
Comportamento di puntura e di riposo di <i>Anopheles melas</i> e dei suoi varianti cromosomici — J.H. Bryan, V. Petrarca, M.A. Di Deco e M. Coluzzi	» 229

Sessione II

Validità di un test EIA nella determinazione degli anticorpi IgG anti-toxoplasma nella prevenzione preconcezionale — E. Rigoli e M. Vianello	Pag. 233
Infezione accidentale da <i>Cryptosporidium</i> sp. nell'uomo in laboratorio: segnalazione di un nuovo caso — S. Visconti, G. Canestri-Trotti e S. Pampiglione	» 239
<i>Pneumocystis carinii</i> au microscope optique. Intérêt de la coloration de Chalvardjian et Grawe — P. Marty e Y. Le Fichoux	» 243

Recenti isolamenti di <i>Naegleria</i> ed <i>Acanthamoeba</i> spp. patogene da un'area termale e definizione bio-immunologica di <i>Naegleria australiensis italica</i> (De Jonckheere et al., 1984) — M. Scaglia, R. Brustia, S. Gatti, M. Strosselli, A.M. Bernuzzi e J.F. De Jonckheere	Pag. 247
Protozooni orali rilevate nel 1984 all'ospedale Niguarda - Cà Granda, Milano — L. Grassi jr., R. Gatti e I. de Carneri	» 249
Rilievi su un possibile ruolo patogeno di <i>Trichomonas tenax</i> nella parodontite cronica — A. Ferrara, R. Conca, L. Grassi jr. e I. de Carneri	» 253
Ancora sulle pseudo-emogregarine umane — I. de Carneri, V. Luppino, M. Meregalli e E. Dell'Orto ...	» 257
La ricerca routinaria delle elmintiasi intestinali umane in Italia va continuata ed affinata — I. de Carneri e G. Rodi	» 261
Ancora schistosomiasi dall'Africa — C. Daglio, L. Lombardo, N. Ravarino e I. de Carneri	» 265
Cisticercosi spinale: descrizione di un caso clinico trattato con praziquantel — L. Minoli, G. Senaldi, A. Malfitano, M. Strosselli e M. Scaglia	» 269
<i>Strongyloides stercoralis</i> : 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 e L. Minoli	» 271
Indagine epidemiologica sulle parassitosi intestinali in una comunità chiusa in Somalia: prevalenza di <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ancylostoma</i> e <i>Giardia intestinalis</i> — I. Ilardi, Shukri C. Shiddo, Abdullahi S. Hussein, Hassan H. Moxamed, Khalif Bile M., A. Sebastiani, G. Bianchini e G. Amiconi	» 273
Indagine parassitologica a Tanguieta: ricerca corpo-urinomicroscopica e sierologica — M.L. Ricciardi e L. Bossi	» 277
Inchiesta parassitologica in due comunità infantili in due centri dell'Atakorà — M.L. Ricciardi e L. Bossi	» 279
Analisi della specie <i>Echinococcus granulosus</i> in relazione alla situazione epizootica ed epidemiologica dell'echinococcosi-iatidiosi in Somalia — G. Macchioni, A. Marconcini, F. Testi, T. Balbo, P. Lanfranchi e M.A. Abdullatif	» 281
 Sessione III	
Indagini sulla resistenza agli esteri fosforici in popolazioni italiane di <i>Culex pipiens</i> — F. Villani, R. Romi, L. Cuoci e G. Majori	Pag. 285
Valutazione dell'attività biologica dell'ivermectina contro i culicidi — S. Pampiglione, G. Majori, G. Petrangeli e R. Romi	» 289
Lotta biologica contro i culicidi: valutazione di nuove formulazioni a base di batteri sporigeni — R. Romi e G. Majori	» 293
Dati preliminari sull'efficacia di repellenti chimici contro <i>Phlebotomus perniciosus</i> (Diptera, Psychodidae) — F.P. Fossati e M. Maroli	» 297
Trasmissione transovarica di due <i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae) dopo infezione sperimentale di <i>Phlebotomus perniciosus</i> (Diptera, Psychodidae) — M.G. Ciufolini, M. Maroli, E. Guandalini e P. Verani	» 301
Effetti di alcuni solfuri sulla riproduzione e sugli stadi larvali in <i>Aedes aegypti</i> e in <i>Culex pipiens</i> — G. Dojmi di Delupis, S. Costantini e R. Giordano	» 305

Effetti del rame sull'attività locomotoria di larve di <i>Culex pipiens</i> – G. Dojmi di Delupis e V. Rondo	Pag.	309
Repellenza di alcuni insetticidi su <i>Musca domestica</i> – A. Scirocchi e A. Milita	»	311
Risposte comportamentali di <i>Musca domestica</i> in presenza di superfici trattate con insetticidi – A. Scirocchi e A. Milita	»	315
Controllo della malaria: luci ed ombre – M. Maffi	»	319
Indagine entomologica sui potenziali vettori di Blue-tongue nell'Italia centro meridionale ed insulare – C. Gallo, V. Guercio, S. Caracappa, D. Rutili e P.J. Wilkinson	»	323
I biotopi larvali e l'isolamento degli stadi preimaginali di <i>Leptoconops (Holoconops) gallicus</i> Clastrier, 1973 (Diptera, Ceratopogonidae) – M. Cocchi, D. Menichetti, E. Vichi e A. Tamburro	»	327
Composizione e distribuzione di una popolazione larvale naturale di <i>Leptoconops (Holoconops) gallicus</i> Clastrier, 1973 (Diptera, Ceratopogonidae) – M. Cocchi, D. Menichetti, E. Vichi, A. Tamburro e L. Gatti	»	331
Artropodi in allergologia – G. Mariani	»	335
Prime osservazioni in Italia di episodi di rogna da <i>Notoedres muris</i> (Megnin, 1877) in <i>Cricetus cricetus</i> – M. Principato, D. Piergili Fioretti, A. Moretti e G.A. Polidori	»	337
Osservazioni sulla fauna parassitaria della popolazione di conigli selvatici presente nel parco regionale "La Mandria" – L. Rossi, R. Romano, G. Cancrini e A. Iori	»	341
Sessione IV		
Divergenza genetica di specie dei generi <i>Contracaecum</i> e <i>Phocascaris</i> (Ascaridida, Anisakidae) con diverso ciclo biologico – P. Orecchia, B. Berland, L. Paggi, G. Nascetti, S. Mattiucci e L. Bullini	Pag.	345
Due specie gemelle in <i>Contracaecum osculatum</i> (Ascaridida, Anisakidae): isolamento riproduttivo e caratteri diagnostici a livello elettroforetico – G. Nascetti, B. Berland, L. Bullini, S. Mattiucci, P. Orecchia e L. Paggi	»	349
Ulteriori dati sulla distribuzione geografica e sugli ospiti di <i>Anisakis simplex</i> A e <i>Anisakis simplex</i> B (Ascaridida: Anisakidae) – S. Mattiucci, J.W. Smith, L. Paggi, P. Orecchia, G. Nascetti e L. Bullini	»	353
Eterogeneità genetica di <i>Echinococcus granulosus</i> dell'Italia e della Somalia – L. Paggi, P. Orecchia, S. Mattiucci, G. Nascetti, L. Bullini, R. Masetti, T. Balbo e N. Catalini	»	357
Eterogeneità genetica di <i>Onchocerca volvulus</i> in Africa: differenziamento di popolazioni di savanna e di foresta – S. Kumlien, F. Villani, R. Cianchi, M. Karam, M.C. Henry e L. Bullini	»	361
Ricerche sul differenziamento genetico di popolazioni italiane del gruppo <i>reptans</i> (Diptera, Simuliidae) – R. Cianchi, L. Rivoecchi, S. Kumlien, P. Casolini e L. Bullini	»	365
Struttura genetica di <i>Culex quinquefasciatus</i> in Africa (Diptera, Culicidae) – S. Urbanelli, F. Villani e L. Bullini	»	369
Ricerche elettroforetiche su popolazioni di <i>Culex pipiens</i> egiziane e israeliane (Diptera, Culicidae) – F. Villani, S. Urbanelli, A. Gad, S. Nudelman e L. Bullini	»	373
Isolamento e comportamento <i>in vivo</i> dell'agente eziologico della leishmaniosi cutanea in Italia – E. Pozio, L. Gradoni e M. Gramiccia	»	377

Il genere <i>Leishmania</i> in Italia — M. Gramiccia, L. Gradoni e E. Pozio	Pag.	381
Stato attuale della tassonomia di <i>Leishmania</i> nel bacino mediterraneo — L. Gradoni, M. Gramiccia e E. Pozio	»	385
Tipizzazione isoenzimatica di ceppi di <i>Plasmodium berghei</i> e <i>Plasmodium yoelii</i> — O. Casaglia, E. Dore, C. Frontali, P. Zenobi e D. Walliker	»	387
Probabile annullamento della clorochino-resistenza nel <i>Plasmodium berghei</i> inoculato in <i>Mus musculus</i> precedentemente panirradiato con dosi subletali (300 _r) di raggi X — E. Brambilla e L. Galli-Mandarini	»	391
Azione di due antibiotici a struttura aminoglicosidica sull'infezione da <i>Plasmodium berghei</i> in <i>Mus musculus</i> — E. Brambilla e L. Galli-Mandarini	»	395
Prove di immunità crociata in tre ceppi di <i>Plasmodium berghei</i> a differente virulenza in <i>Mus musculus</i> guariti dalla infezione mediante stress termico (+ 35 °C) — L. Galli-Mandarini e E. Brambilla	»	399
Aspetti ultrastrutturali della criptosporidiosi naturale degli ovini — A. Leoni e G. Garippa	»	403
Ridescrizione di <i>Ancylostoma iperodontatum</i> Le Roux e Biocca, 1957 — F. Mancianti, M. Magi e G. Macchioni	»	407
Sessione V		
Risposta immune del topo nella infestazione con <i>Hymenolepis nana</i> : andamento delle mast-cells intestinali — G. Bortoletti, M. Conchedda, F. Gabriele, O. Limongelli e C. Palmas	Pag.	411
Ruolo dei linfonodi mesenterici e della milza nelle infestazioni con <i>Hymenolepis nana</i> nel topo — F. Gabriele, C. Palmas, M. Conchedda e G. Bortoletti	»	415
Influenza del ceppo dell'ospite nella risposta immune alle infestazioni con <i>Taenia taeniaeformis</i> e <i>Hymenolepis nana</i> nel topo — M. Conchedda, S. Capra, F. Gabriele, C. Palmas e G. Bortoletti	»	419
Ruolo di alcune subpopolazioni di linfociti T nella risposta immune a <i>Trichinella spiralis</i> nel topo — C. Palmas, M. Conchedda, G. Bortoletti e F. Gabriele	»	423
Immunità crociata tra <i>Trichinella spiralis</i> e <i>Trichinella pseudospiralis</i> nelle infestazioni sperimentali nel topo — C. Palmas, D. Wakelin e W. Cabaj	»	427
Isolamento e caratterizzazione di un anticorpo monoclonale diretto verso l'antigene "5" di <i>Echinococcus granulosus</i> e suo impiego nella diagnosi sierologica della idatidosi umana — C. Pini, C. Afferri, G. Di Felice e G. Vicari	»	431
Antigeni di <i>Echinococcus granulosus</i> stimolano <i>in vitro</i> la trasformazione dei linfociti di pazienti affetti da idatidosi — A. Siracusano, S. Notargiacomo e A. Toggi	»	433
Indagine sui casi di idatidosi umana operati in Sardegna nel periodo 1974-1981 — M. Conchedda, S. Capra, F. Putzolu, G. Bortoletti, C. Palmas e F. Gabriele	»	435
Risultati preliminari di una indagine sulla diffusione dell'echinococcosi/idatidosi nel nostro paese — R. Lorenzini, A. Ruggieri e R. Verticchio	»	439
Indagine coprologica a São Tomé e Príncipe (Africa equatoriale) — S. Pampiglione, S. Visconti e G. Pezzino	»	443
Inchiesta sulle condizioni e l'uso delle latrine nella Repubblica democratica di São Tomé e Príncipe — M. Pirazzi e G. Pezzino	»	445

Indagine sugli aspetti culturali relativi alle elmintiasi intestinali nella Repubblica democratica di São Tomé e Príncipe (Africa equatoriale) — M. Pirazzi e S. Pampiglione	Pag.	447
Ricerche sulla diffusione delle filariosi canine in alcune province della Pianura Padana — G. Canestri-Trotti, S. Pampiglione e S. Visconti	»	449
<i>Trichinella spiralis</i> : evidenza di una ritenzione polmonare delle larve "new-born" — F. Bruschi, S. Solfanelli, F. Ambrogi, C. Giuntini e R.A. Binaghi	»	453
Possibilità di variazione antigenica nelle larve "new-born" di <i>Trichinella spiralis</i> — R.A. Binaghi, S.M. Venturiello e F. Bruschi	»	457
Infezione sperimentale del suino con un ceppo italiano di <i>Trichinella</i> sp. e resistenza delle larve in alcuni prodotti salumieri — E. Pozio, M. Gramiccia, Al. Mantovani, O. Massi e A. Mantovani	»	461
Interazione <i>in vitro</i> tra cellule immunocompetenti e larve L ₂ di <i>Toxocara canis</i> : aspetti immunologici — S. Lombardi, F. Esposito, P. Orecchia e L. Paggi	»	465
La larva L ₂ di <i>Toxocara canis</i> come agente immunomodulatore — T. Lari, L. Banchieri, S. Lombardi e F. Esposito	»	469
Anticorpi anti <i>Toxocara canis</i> in pazienti con sospetta sindrome da larva migrans — C. Genchi, F. Brunello, M. Boero, P. Piantino, C. Sioli e P. Falagiani	»	473
 Sessione VI		
Gambusie ed anofelismo residuo nelle piscine di Castel Porziano — E. Stella, I. Di Girolamo, L. Rivo-secchi e G. Dell'Uomo	Pag.	477
Indagine preliminare sulla fauna ixodologica nel Boscone della Mesola (Ferrara) — G. Canestri-Trotti, L. Corradini e S. Visconti	»	481
Infestazioni naturali da nematodi parassiti dell'apparato digerente del camoscio (<i>Rupicapra rupicapra</i> L.) e del capriolo (<i>Capreolus capreolus</i> L.) nella provincia di Trento e Bolzano — G. Traldi, M.T. Manfredi, E. Zanin e W. Frigo	»	483
Diffusione di elmintiasi in fagiani liberi della provincia di Pavia — L. Galli-Mandarini e E. Brambilla ...	»	487
Sull'infestazione sperimentale e spontanea di ovini e caprini con nematodi gastro-intestinali di camosci e stambecchi del Parco Nazionale Gran Paradiso — L. Rossi, P. Lanfranchi e P.G. Meneguz	»	491
Indagine orientativa sulla presenza di parassiti gastrointestinali nei suini degli allevamenti industriali del circondario di Perugia — E. Aisa	»	493
Localizzazione anomala di <i>Ligula intestinalis</i> L. in <i>Scardinius erythrophthalmus</i> L. del lago Trasimeno — E. Aisa, P. Gattaponi e L. Rampichini	»	497
Principali endoparassiti dei leporidi selvatici (<i>Oryctolagus cuniculus</i> e <i>Lepus mediterraneus</i>) in Sardegna — A. Leoni, G. Garippa e E. Arru	»	501
Indagine coprologica in bovini allevati nella provincia di Roma — V. Cagnolati e A. Muroli	»	505
Impiego della chetotassi per l'identificazione delle cercarie di trematodi nelle infestazioni naturali dei molluschi gasteropodi d'acqua dolce — M.T. Manfredi, S. Ganduglia e C. Genchi	»	509
Fauna parassitaria gastro-intestinale del gatto nelle città di Bologna, Firenze e Milano — G. Poglayen, C. Traldi, G. Capelli e C. Genchi	»	513

Osservazioni sulla diffusione dei parassiti gastro-intestinali del suino in rapporto a diverse caratteristiche di allevamento — G. Poglayen e M. Martini	Pag.	517
Osservazioni sullo sviluppo biologico di larve al III stadio di <i>Gasterophilus</i> spp. in condizioni di laboratorio — M. Principato, D. Piergili Fioretti, A. Moretti e G.A. Polidori	»	521
Osservazioni sul galleggiamento di uova di elminti parassiti in soluzioni a diverso peso specifico — M.P. Tampieri e R. Restani	»	525
Indagine sulla fauna protozoaria intestinale in agnelli delle provincie di Bologna e Ferrara — S. Visconti e G. Canestri-Trotti	»	529
Le strongilosi broncopolmonari degli equini in Sardegna — S. Tarantini e G. Garippa	»	533
Le parassitosi dei bovini nelle aree appenniniche: indagini nell'entroterra pesarese — M. Ambrosi, D. Notari, G. Sartini e P. Coli	»	535
Indagine sulla presenza di anticorpi per <i>Toxoplasma gondii</i> in sieri bovini, ovini e caprini somali — M.N. Dragica, C. Gallo e G. Vesco	»	539

Introduzione

Il 13° Congresso della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) è stato organizzato dal Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in occasione delle celebrazioni per il 50° anniversario della fondazione dell'ISS e nella ricorrenza del 25° anniversario della fondazione della SOIPA.

Il Prof. F. Pocchiari, Direttore dell'ISS, nel fare una breve sintesi storica delle tappe più significative che l'Istituto ha percorso, ha ricordato fra l'altro come l'Istituto stesso è sorto soprattutto in funzione della lotta antimalarica ed ha successivamente sviluppato tradizioni e competenze nel campo della parassitologia che sono altamente apprezzate in tutto il mondo. Ha poi sottolineato il ruolo che i diversi ricercatori dell'Istituto (ha menzionato a nome di tutti, il Prof. A. Carradetti) hanno avuto nella fondazione e nello sviluppo stesso della SOIPA. Si è infine congratulato per la qualità e quantità dei lavori presentati al Congresso e per l'ampia partecipazione allo stesso.

Il Prof. A. Mantovani, Direttore del Laboratorio di Parassitologia e Presidente del Congresso, ha riassunto brevemente lo stato attuale delle attività nel campo della parassitologia all'interno dell'ISS ed ha sottolineato i principali obiettivi di tale attività quali:

- (a) costituire un punto di riferimento per il Servizio Sanitario Nazionale;
- (b) continuare a svolgere attività di ricerca su temi di rilevanza nazionale e internazionale;
- (c) avere una più stretta collaborazione con l'Organizzazione Mondiale della Sanità;
- (d) costituire un valido punto di appoggio per le attività che l'Italia svolge in campo sanitario a favore dei paesi in via di sviluppo.

Tali attività non sono limitate al solo Laboratorio di Parassitologia (con i reparti di Biologia dei vettori e metodi di lotta, di Elmintologia, di Malattie da protozoi e protozoologia e di Sistematica dei vettori) ma coinvolgono altri laboratori e servizi dell'ISS ed in particolare quelli di Batteriologia e Micologia Medica, di Biologia Cellulare, di Epidemiologia e Biostatistica, di Immunologia, di Medicina Veterinaria, e di Virologia, nonché la Segreteria per le Attività Culturali. Il Prof. Mantovani ha poi illustrato le varie linee di ricerca in campo parassitologico afferenti ai diversi sottoprogetti nei quali è organizzata l'attività dell'ISS.

Il Dr. D. Düwel, tesoriere della World Federation of Parasitologists (WFP), nel portare il saluto del Presidente della WFP, Prof. P. Morera, ha ricordato soprattutto come l'Italia è stata la sede dell'Assemblea costituente del WFP ed abbia ospitato poi il 1° Congresso Mondiale di Parassitologia nel 1964, sotto la presidenza del Prof. E. Biocca. Infine ha sottolineato che l'ISS è la sede della segreteria della WFP.

Il Prof. E. Biocca ha illustrato le attività della SOIPA dalla fondazione, ricordando fra l'altro l'attiva partecipazione della SOIPA all'organizzazione del già menzionato 1° Congresso Mondiale di Parassitologia ed ha poi ripercorso le varie fasi e sedi dei dodici congressi svolti in 25 anni di attività.

Gli interventi del Prof. Pocchiari, del Prof. Mantovani e del Prof. Biocca verranno pubblicati nella "Rassegna sull'attività dell'ISS nel campo della parassitologia dal 1934 al 1984", curata dal Prof. G. Saccà sui "Rapporti ISTISAN".

Gli *Atti del congresso* sono stampati in *offset* su matrici predisposte dagli stessi autori delle relazioni e comunicazioni; gli editori e la redazione degli *Annali* non possono quindi assumersi la responsabilità di eventuali inesattezze o errori che sono da attribuire ai soli autori.

TAVOLA ROTONDA

**CRITERI DI INNOCUITA' ED EFFICACIA DEGLI ANTIELMINTICI
ED ANTICOCCIDICI PER USO VETERINARIO**

ANTHELMINTICS AND ANTICOCCIDIALS: INTRODUCTION TO ROUND TABLE

R. Lorenzini

Laboratorio di Medicina Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Summary. - Some important aspects regarding anticoccidials and anthelmintics are emphasized. In particular toxicological and analytical problems are pointed out.

Riassunto. - Vengono focalizzati alcuni principali problemi inerenti agli anticoccidici e gli antielmintici. In particolare è posta attenzione sul problema tossicologico ed analitico.

On occasion of the Congress of the Italian Society of Parasitology we have organized this Round Table to focus the problems related to veterinary employment of anticoccidials and anthelmintics and to supply a revision which interests public and animal health as well as veterinary pharmacology.

There is evidence for drug control by governmental or other regulatory bodies since various times. These early controls were usually on quality and sometimes on the route of sale. The safety and efficacy of a drug are, in the main, modern concepts.

In fact, since relatively few years the risk is known that drugs or other compounds administered or ingested by livestock could be dangerous for human if present in food of animal origin.

Many examples and sometimes very different were the points of view of various countries regarding these problems.

I think is sufficient to remember antibiotics and estrogens.

Table 1 gives an indication of the subjects that are internationally accepted as key areas in the animal health fields. Because this pattern is true for the major European countries, as well as for the U.S.A., it is inevitable that the emphasis in veterinary pharmaceutical research should concentrate on these areas. This means that, in any major pharmaceutical company, the veterinary research and development program is geared to the investigations and development of products in the seven key areas listed in Table 1.

Here we want to approach and treat anticoccidials and anthelmintics in a joint way by the fact we consider the two problems are parallel and similar even if they have different temporal projections.

In relation to the fact that anticoccidials are employed since many years on a large scale, their pharmacological and toxic properties have been enough investigated and various are the resistance's problems observed.

On the contrary only in time relatively more recent, anthelmintics have been proposed on an international scale for their employment in mass therapy; their principal groups are not yet perfectly known in relation to toxicology and mechanism of resistance. It is obvious that remarkable biological differences exists within the employment of these two groups of drugs, but it is very evident how much the toxicological aspects have to be valued very

alertly in man and animals.

Table 1. - Major areas for animal health products.

	<u>World Market %</u>
1. Antibacterials	12
2. Feed additives	40
3. Antiparasitics	18
4. Biologicals	18
5. Hormones	2
6. Vitamins and minerals	8
7. Drugs developed initially for human use	2

Animals drugs may be divided into two major categories: a) those intended to have a pharmacological effect on the animal body such as hormones, anesthetics, tranquilizers, etc.; and b) those compounds used to kill or suppress growth of bacteria, protozoa, and internal or external parasites.

Toxicity in the first group is a function of their pharmacological (either primary or secondary) activity. It should be noted that what is an adverse response under one set of circumstances may under other conditions represent the desired pharmacological effect. Toxicity may result from an enhancement of effect caused by increased dosage (overdosage) or from increased sensitivity (hypersensitivity) to the action of the drug. The "toxic" effect may also be a manifestation of the pharmacological activity of the drug other than that for which the drug is being administered. Again, the adverse effect may result from enhancement of a side effect by overdosage, either actual (is an error of dosage) or relative (as a result of increased sensitivity to the side effects).

With respect to the second group, the therapeutic value of such drugs is based upon their selective toxicity for the pathogenic invader. As a result of the specificity of effect such drugs (antibiotics, for example) often enjoy a wide margin of safety. Those adverse reactions which occur following administration of these drugs have often been ascribed to allergic reactions or cytotoxic changes occurring as a result of repeated treatment. There is considerable evidence, however, to show, that under certain circumstances, such drugs can elicit acute pharmacological effects unrelated to immune phenomena or to cytotoxic lesions. There are drugs that fall within this second category that have received most of the attention in adverse drug reactions and interactions evolution. Since there is a paucity of information on the mechanism of and circumstances under which such adverse reactions occur, the programs to evaluate adverse drug reactions cannot be focused primarily on this latter group.

In recent years much of the attention of specialists in veterinary medicine and environmental protection as focused upon residues of drugs and feed additives in foodstuffs. In general, we can assume two basic reasons for pesticide occurrence in animal fat and food products of animal origin: a) use of pesticides for plant protection purposes and b) use of pesticides for sanitary purposes in order to prevent disease in man or animals, after either internal or external application to animals for prophylaxis or therapy. These two basic sources of pollution usually influence the formation of residue level of pesticides or their longer-lived metabolites, for there is a distinct interrelation between the average level of pesticide residue in the tissue of a given animal or human population and the amount of pesticides dispersed over a given area or at random. We should emphasize that all chemicals used in agriculture are more or less toxic. This refers in particular to those pesticides

which are most frequently used to control selectively living organisms - plants or animals - inconvenient to man.

Pesticide residue analysts are familiar with the tremendous developments which have occurred within the last 25 years in analytical chemistry and which are employed for detection and precise estimation of residual amounts of xenobiotics in food. Analysis of pesticide residues is not a simple matter. Many nonspecialists in this field do not realize that there are several hundred compounds of various chemical constitutions and properties to be considered.

The topics of our round table regarding anthelmintics and anticoccidials are:

- employment and administration criteria;
- analytical and toxicological problems;
- legislative aspects about registration and control of the products.

Other important actions have been already promoted, for example, by Food and Drug Administrations regarding international problems of veterinary drug registration and the institutions of an International Compendium of Veterinary Drugs. In fact, the ultimate goal of the various veterinary public services must be a united veterinary public health service dealing not only with meat inspection and hygiene but also with other meat products and the toxicological problems related to employment of veterinary drugs to the zoonoses.

We hope that this round table could be considered as a little contribute to international cooperation in the field of veterinary drug in which antiparasitics are considerably important.

REFERENCES

1. BRANDER, G.C. 1983. Problems concerned with the development of new drugs for the livestock industry. Vet. Res. Commun. 7: 391-397.
2. JUSZKIEWCZ, T. 1983. The veterinary problems of pesticide monitoring and analysis. Vet. Res. Commun. 7: 113-118.
3. PENN, R.G. 1983. Veterinary drugs: the beginnings of legislative control in the U.K. Vet. Res. Commun. 7: 377-381.
4. TESKE, R.H. 1983. Monitoring of adverse reactions and interreactions veterinary drugs in the U.S.A. Vet. Res. Commun. 7: 215-220.

HOST-PARASITE RELATIONSHIP AND INTERACTION WITH PHARMACOLOGICAL TREATMENT

C. Genchi

Istituto di Patologia Generale veterinaria, Cattedra di Parassitologia, Università degli Studi di Milano

Riassunto. - Vengono brevemente considerate le alterazioni indotte dal parassita al metabolismo dell'ospite e le interazioni con il trattamento farmacologico

The successfull of parasitic infection is due to effectiveness of the mechanisms wich permit a parasite to maintain itself in the host. The pathophysiological changes occuring in the host during the parasite invasion are consequent to interference on host metabolic events induced by parasite to create a favorable endogenous habitat (1).

A further feature of the survival of parasite in the host is the reduced parasite reactivity when entering the host: early larval stages of Ascaris suum may reduce immunoglobulins binding, complement activation and attachment of phagocytic cells: this mechanism can advantage (at last temporary) the parasite in the process of invasion (4). The host immune response can contribute to evasion of ricognition of parasite: the adaptation of Nippostrongylus brasiliensis in immune rats is associated with a changed acetylcholinesterase isoenzyme pattern, seemingly induced by antibodies to this enzyme present in the host (7).

Environmental conditions can influence likewise the survival of the parasite in the host; i.e. seasonal arrest or "hypobiosis" of gastrointestinal helminths of ruminants. It has also been shown that the presence of adult worms may be responsible for the inhibition of the development of larval population ingested later.

The parasite exert their effects on the host in many ways: sucking blood, destroying tissues during larval migration or feeding, causing machanical or chemical irritation of conctat surfaces. The liberation of metabolites acting on metabolic host activities must be regarded as very important. We have observed increase of hepatic levels of 5-HT and glycogen-phosphorilase activity chemicaly induced by Fasciola hepatica implanted in the peritoneal cavity of rats (2,8)

The anthelmintic drugs are necessary for the control of parasite diffusion and to reduce the economic losses caused by infection. Treatement interacts with two parasitic population types, both larvae and adult worms; it modify the host-parasite relations, and may induce a positive effects on host immunity (3). However on the basis of the previously reported observations, it seems important to emphasize that the pharmacological treatement of parasitic infections is carried out in a "pathological" subject.

We have demonstrated in the rat and in the cattle that the experimental and spontaneous liver infection by Fasciola hepatica causes a dramatic loss in the detoxifying properties of liver cell, in particular in the drug metabolizing activity of the hepatic microsomal monooxygenase cytochrome P-450 dependent and of the UDP-glucuronosyl transferase enzyme systems. As a consequence of this, a decrease of the in vitro metabolism of those flukicidal agents, substrates of these enzyme systems, Nitroxynil and Oxiclozanide is observed (5,6).

This metabolic impairment will result in vivo in a slower body elimination of these flukicidal agents, a fact which increases their persistence in the animal body and consequently the amount of flukicides residues in tissues and secretions and excreta.

REFERENCES

1. GENCHI, C. 1983. Alterazioni della risposta immunitaria nelle infestazioni da elminti. Atti della Giornata di Studio su Immunopatologia veterinaria. Brescia, 26 Giugno 1983; 147-160.
2. GENCHI, C.; AGNES, F.; SARTORELLI P.. 1980. Livelli epatici di serotonina in ratti con innesto intraperitoneale di F. hepatica. Arch. Vet. It. 31: 25-28.
3. Kerboeuf, D. & Jolivet, G. 1984. Heligiosomoides polygyrus: time of anthelmintic treatment and infection parameters in mice exposed to increasing doses of larvae. Exp. parasitol. 57: 307-315.
4. Leventhal, R. & Soulsby E.J.L 1976. Cuticular reactivity of the early larval stages of Ascaris suum: adhesion and degranulation of polymorphonuclear leukocytes on the surface of opsonized larvae of A. suum. Int. J. parasitol. 6: 279-283.
5. MAFFEI FACINO, R.; CARINI, M.; BERTULETTI, R.; GENCHI, C.; MALCHIODI, A. 1981. Decrease of the in vitro drug metabolizing activity of the hepatic mixed function oxidase system in rats infected experimentally with F. hepatica: pharmacological implications. Pharm. Res. Comm. 13: 731-236.
6. MAFFEI FACINO, R.; CARINI, M.; GENCHI, C. 1984. Impaired in vitro metabolism on the flukicidal agent Nitroxynil by hepatic microsomal cytochrome P-450 in bovine fascioliasis. Toxicological letters 20: 231-236.
7. OGILVIE, B.M. 1974. In Parasites in the immunized host. Mechanisms of survival (Eds Porter, R & K., J.). CIBA foundation Symposium 25: 81-90.
8. SIMONIC, T.; SARTORELLI, P.; GENCHI, C.; LOCATELLI, A. 1980. Liver glycogen-phosphorylase activity in rats after intraperitoneal implantation of F. hepatica. Ach. Vet. It. 31: 69-72.

IL TRATTAMENTO ANTIELMINTICO COME MISURA DI CONTROLLO NELLE ELMINTIASI

R. Restani

Istituto Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria, Università degli studi, Bologna

(Testo non pervenuto)

FARMACI ANTICOCIDICI E LORO USO

G. Pagnini

Cattedra di Farmacologia e Farmacodinamia Veterinaria (Facoltà di Medicina Veterinaria), Università di Napoli

Riassunto. - Il discorso sugli anticoccidici è molto lungo e complesso poiché complessa è la situazione biologica in cui tali farmaci devono intervenire.

In realtà essi agiscono sia sul parassita, sia sull'animale parassitato; d'altro canto il parassita agisce sull'ospite provocando delle lesioni, e reagisce al farmaco divenendo ad esso resistente. Oltre ciò l'animale reagisce al parassita instaurando delle immunità ed al farmaco allontanandolo più o meno rapidamente.

Per quanto riguarda gli anticoccidici, vengono indicati i principali gruppi di farmaci utilizzati nella pratica. Viene anche esaminato il problema dell'attività litica o statica degli anticoccidici.

Si discute, inoltre, della sensibilità dei differenti coccidi ai vari anticoccidici, concludendo che non risulta facile indicarla in maniera assoluta; in effetti, detti farmaci non agiscono su tutte le specie di *Eimeria* con la medesima intensità, ma, oltre ciò, anche nell'ambito della stessa specie, la sensibilità dipende dal ceppo in considerazione.

Un ulteriore problema considerato è quello della resistenza dei coccidi ai differenti farmaci. La comparsa di tali resistenze condiziona in maniera sostanziale l'utilizzazione dei vari anticoccidici.

Per ovviare in parte a tale inconveniente, vengono impiegati nella pratica corrente vari schemi posologici.

Nella comunicazione vengono brevemente discussi i principali schemi utilizzati.

Summary. - The talk on the anticoccidial drugs is very long and complex, since the biological situation in which such pharmaceuticals must be employed is complex.

In reality they act both on the parasite and on the animal parasitized; on the host provoking some lesions, and it reacts to the drug becoming to it resistant. Besides, the animal reacts to the parasite establishing some immunity and with regards to the drug making it lose, more or less rapidly, its effectiveness.

For how much it concerns the anticoccidials, they will come indicate the principal groups of drugs utilized in the field. It will also be examined the problem of litic or static activity of the anticoccidials.

It will be discussed, besides, the sensitivities of the different coccidia to the various anticoccidials, the final conclusion is that it isn't easy to indicate sensitivity in definitive manner; in effect, the said pharmaceuticals do not act on all the species of *Eimeria* with the same intensity, but however within the limits of the same species, the sensitivity depends from the strain in consideration.

A further problem considered is the resistance of the coccidia to the different drugs. The appearance of such resistences changes in a substantial way the utilization of the various anticoccidials.

To overcome such an inconvenience, it come used in the field various preventive schemes for the utilization of the drugs.

In the report, the principal schemes used will also come briefly discussed.

Farmaci anticoccidici

I farmaci attivi sui coccidi, oggi, sono numerosi.

Il primo che ha dato qualche risultato è stato la sulfanilamide nel 1939 (9). Facciamo notare che, parlando di parassiti, generalmente, si parla di parassitici e parassitostatici a seconda che il farmaco sia in grado di uccidere o semplicemente di bloccare lo sviluppo del parassita. Tale effetto, ovviamente, generalmente dipende anche dalla concentrazione del farmaco e dal numero dei parassiti, per cui, aumentando la dose, un farmaco parassitostatico può divenire parassitocida; viceversa un farmaco parassitocida, riducendo la dose, può diventare parassitostatico.

Ben difficilmente, però, tale situazione si verifica in vivo, dove necessariamente le concentrazioni tissutali che si possono raggiungere sono ben determinate. Infatti, aumentando la dose di farmaco aumenta parallelamente anche l'effetto anticoccidico (riduzione delle oocisti emesse); d'altra parte, oltre una certa dose, si rileva una variazione negativa del peso degli animali e dell'indice di conversione degli alimenti, indice questo di tossicità del farmaco verso l'animale (8, 11). Per cui, nella pratica terapeutica, la dose di farmaco somministrabile risulta univocamente determinabile.

Nel caso degli anticoccidici, è molto difficile poter dare indicazioni di attività coccidicida o coccidiostatica; in effetti non esiste alcun farmaco capace di impedire la coccidiosi, anche se artificialmente provocata, mediante una sola somministrazione; è necessario, per tutti i farmaci, la somministrazione per più giorni consecutivi.

Così, ad esempio, è stato dimostrato (2, 14) che, se si attua un trattamento con robenidina e lo si sospende tra il 1° ed il 5° giorno dopo l'infezione sperimentale, 3-5 giorni dopo la sospensione del farmaco compare una coccidiosi latente, indice della sopravvivenza del parassita e quindi di un effetto coccidiostatico. Se, però, il trattamento viene proseguito fino al 7° giorno dopo l'infezione, la coccidiosi non si manifesta più, indice, questo, di un effetto coccidicida.

Situazione analoga si verifica per il metilclorpirindolo (10), per il quale è stato rilevato che i coccidi (*E. tenella*) sono sopravvissuti per un periodo di 60 giorni, ma sono scomparsi dopo 77 giorni.

Anche per lo zolene (4, 7) è stata messa in evidenza la comparsa di coccidiosi per sospensione del trattamento prima del 7° giorno dopo l'infezione.

Siccome l'anticoccidico agisce su una ben precisa fase riproduttiva, se detta fase è stata superata, ovviamente non avrà alcun effetto, per cui fuoriusciranno dall'animale alcune oocisti.

Tali concetti sono ancora più importanti in caso di infezione naturale, in cui i coccidi, che possono essere anche di più specie diversamente sensibili all'anticoccidico, si trovano in fase diversa di riproduzione e quindi di sensibilità.

E' da tener presente che, in ogni caso, l'effetto non risulta mai totale, nel

senso che una sia pur modesta parte delle Eimerie riesce sempre a completare il ciclo, per cui nelle feci degli animali si possono sempre riscontrare delle oocisti ed all'esame autoptico possono essere evidenziate anche lesioni intestinali, ma tali da non provocare danno o manifestazioni apparenti di coccidiosi.

I farmaci anticoccidici utilizzabili nell'allevamento avicolo sono numerosissimi; ricordiamo, peraltro, i seguenti: Sulfamidici (sulfachinossalina, sulfametazina, sulfadimetossina, sulfaclopirazina, sulfamonometossina), Nitrofuranici (nitrofurazone, furazolidone, niidrazone), Benzilpirimidinici (diaveridina, ormetoprim, trimethoprim), nicarbazina, Antagonisti della Tiamina (amprolium, dimetium, beclotiamina), etopabato, Chinolinici (buchinolato, metilbenzochinato, deochinato, amchinolato, ciprochinato), metilclorpidolo, Ionofori (monensin, narasin, lasalocid, salinomycin), robenidina, alofuginone, arprinocid.

Nella attuale strutturazione è impossibile effettuare allevamenti, soprattutto avicoli, senza l'impiego degli anticoccidici.

Resistenza agli anticoccidici

Un problema molto importante per il controllo delle coccidiosi è dato dalla sensibilità dei Coccidi ai farmaci. In effetti, detti farmaci non agiscono su tutte le specie di Eimeria con la medesima intensità; oltre ciò, anche nell'ambito della medesima specie, la sensibilità dell'anticoccidico può dipendere dal ceppo in considerazione. Non risulta facile, pertanto, indicare in maniera assoluta l'azione dei vari farmaci.

Ricordiamo che, mentre nei tempi passati veniva considerata importante la mortalità determinata dai coccidi, oggi si considera sempre più altrettanto importante anche la morbidità, che si manifesta in maniera più o meno evidente con una riduzione dell'accrescimento e dell'indice di conversione.

Tralasciamo, per brevità di parlare dei meccanismi con cui si instaura tale resistenza, facciamo presente, però, che più o meno rapidamente essa si instaura per tutti i farmaci anche se non nella medesima maniera per tutti i coccidi (1, 16).

E' da notare, in aggiunta, che per il Monensin, mentre non si riesce a dimostrare sperimentalmente la formazione di ceppi resistenti per i coccidi del pollo, è stata dimostrata la comparsa di resistenza alla 4^a generazione di selezione di ceppi di coccidi del tacchino (6).

Analogamente al Monensin, anche per Narasin e Lasalocid (5, 12, 15) dopo 15-20 passaggi sperimentali i coccidi, del pollo, risultano ancora sensibili.

Un problema di ordine diverso è quello delle resistenze crociate, cioè a dire del pericolo che un coccidio, resistente ad un farmaco, possa essere resistente anche ad altri farmaci o, se vogliamo, qual'è la possibilità di utilizzare altri farmaci a cui il coccidio sia sensibile. La risposta più immediata è di utilizzare farmaci che abbiano un meccanismo d'azione completamente differente dal precedente. In tal caso, le resistenze crociate sono molto difficili. E' evidente, però, che esistono resistenze multiple, per cui un ceppo di coccidio può risultare resistente a più anticoccidici contemporaneamente. Ma questo è un problema diverso.

Modalità di utilizzo degli anticoccidici

Il discorso sulla resistenza ci introduce direttamente alla modalità di utilizzo dei farmaci anticoccidici.

In effetti la somministrazione continua e protratta di un farmaco porta, come già detto, dopo tempi più o meno lunghi, alla comparsa di ceppi resistenti. Da ciò deriva, nell'allevamento dei broilers e delle pollastre allevate a terra che poi passeranno, durante la deposizione, in batteria, la necessità di sostituire, ad opportuni intervalli, l'anticoccidico (rotazione di 2 o più anticoccidici) utilizzando farmaci con differente meccanismo d'azione. E' comunque difficile stabilire il ritmo della rotazione, che può variare.

Tralasciamo, in questa sede, di considerare le associazioni di due o più farmaci, che riduce la possibilità di comparsa di ceppi resistenti, ma a lungo andare può dare ugualmente luogo a resistenze.

Un sistema diverso (shuttle program o rotazione rapida) consiste nel sostituire l'anticoccidico nella medesima partita di animali; ad es. farmaco A mescolato nel mangime del primo periodo e farmaco B in quello del secondo periodo. Tale sistema, però, non sappiamo quanto possa essere valido (13), se ricordiamo che le oocisti possono sopravvivere nel terreno per parecchi mesi (3).

Un ulteriore metodo (programma sandwich) consiste nel somministrare un secondo anticoccidico, solo per un breve periodo, in un momento particolare nel corso dell'allevamento.

Una variante di tale sistema consiste nel somministrare, per brevi periodi, ad opportuni ritmi, o nei momenti di necessità, un secondo anticoccidico contemporaneamente al primo (programma supplementare); ovviamente, si tratta di utilizzare farmaci ad attività maggiormente terapeutica e con meccanismo d'azione diverso. Risultano più utili, in questo caso, i farmaci solubili in acqua.

In ogni modo, poichè negli allevamenti, qualunque sia l'anticoccidico utilizzato, sono sempre presenti dei coccidi, esiste la possibilità di sviluppo della malattia anche per cause non correlate alla resistenza al farmaco, quali: riduzione della quantità di anticoccidico assunto (cause varie tra cui: errori di miscelazione, ridotto appetito, caldo, ecc.) o sua aumentata escrezione (ad es. diarrea, ecc.), aumentata sensibilità degli animali per stress vari (spostamenti, caldo, freddo, altre malattie), aumentata infestività dei coccidi (aumentata sporulazione, caldo-umido, lettieri non sostituite, ecc.), eccessiva densità degli animali presenti.

In casi di questo genere può essere opportuno l'ultimo schema, cioè l'aggiunta di un secondo farmaco, questa volta non miscelato al mangime, ma sciolto nell'acqua di bevanda. Pertanto, risulta chiaro che anche i cosiddetti "vecchi anticoccidici" possono trovare una loro utilizzazione.

Conclusioni

Oggi, negli allevamenti, non si attende più che le coccidiosi diano luogo ad una malattia conclamata, ma, poichè in termini economici è molto importante anche una semplice riduzione della produzione zootecnica, è necessario intervenire prima che si manifesti la malattia. Inoltre, la malattia non è più concepita a livello di animale singolo, ma di tutto l'allevamento.

Data la diffusione delle coccidiosi e la densità di popolazione degli alleva-

menti, oggi non esiste la possibilità di portare avanti un allevamento avicolo, soprattutto se in maniera redditizia, senza l'ausilio degli anticoccidici. Inoltre, poichè vi è anche per questa parassitosi la possibilità di chemioresistenza, tenuto anche conto che non è possibile aumentare le dosi utilizzabili, a causa della tossicità che si manifesterebbe, corre la necessità di avere sempre nuovi farmaci. Tale necessità si scontra con il costo della ricerca. Di qui la necessità di utilizzare programmi di trattamenti capaci di ridurre il rischio delle resistenze stesse e quindi di dare un maggiore periodo di vita agli anticoccidici.

Ricordiamo ancora che, siccome è importante la carica parassitaria, è necessario cercare di avere un livello parassitario quanto più possibilmente basso non trascurando i sistemi di profilassi igienica.

BIBLIOGRAFIA

1. ASDRUBALI G. & COLETTI M. 1981. Chemioprofilassi delle coccidiosi aviarie. Obiettivi e Documenti Veterinari. 2, (2-3): 11.
2. BADIOLA C., BADIOLA I. & CARRASCO F. 1970. Robenzidene in the Feed of Broilers. Determination on the effect of the withdrawal of Robenzidene for periods of up to 48 hours, on the course of experimental coccidial infection. XIV Congr. Mundial de Avicultura, Madrid. Sect. III: 186.
3. EDGAR S.A. 1958. Problems in the control of coccidiosis. Proc. Semiannual meeting Amer. Feed Manufacturers, Chicago: 19.
4. HYMAS T.A. & STEVENSON G.T. 1960. A study of the action of Zoalene on *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix* when administered in the diet or in the drinking water. Poultry Sci. 39: 1261.
5. Jeffers T.K., CHALLEY J.R. & DESPAIN W.J. 1971. Collateral sensitivity to 4-Hydroxyquinolines in *Eimeria acervulina* strains resistant to Metilclorpidol. Poultry Sci. 50: 1588.
6. JEFFERS T.R. & BENTLEY E.J. 1980. Experimental development of Monensin resistance in *Eimeria meleagris*. Poultry Sci. 59: 1731.
7. JOYNER L.P. 1960. The relationship between toxicity and coccidiostatic efficacy of Pyrimethamine and Sulphonamides and their relative reversal by folic acid. Res. Vet. Sci. 1: 2.
8. KESHAWARZ K. & McDOUGALD L.R. 1982. Anticoccidial drugs: Growth and performance depressing effects in young chickens. Poultry Sci.
9. LEVINE P.P. 1939. The effect of sulfanilamide on the course of experimental avian coccidiosis. Cornell Vet. 29: 309.
10. LONG P.L. & MILLARD B.J. 1967. The effect of Metilclorpidol on *Eimeria* infections of the fowl. Vet. Rec. 81: 11.
11. MEINGASSNER J.C., HILDEBRANDT J., LESKOVA R. & MIETH H. 1977. Laboratory studies on the anticoccidial activity of Septamycin. Poultry Sci. 56: 1281.
12. MITZOVIC M. & SCHILDKNECHT E.G. 1973. Anticoccidial activity of antibiotic X-537A in chicks. Poultry Sci. 52: 2065.
13. REID W.M. 1972. Anticoccidials used in the poultry industry; time of action against the coccidial life cycle. Folia Vet. Lat. 2: 641.
14. RYLEY J.F. & WILSON R.G. 1971. Studies on the mode of action of coccidiostat Robenidene. Z. Parasitenk. 37: 85.
15. WEPPELMANN R.M., OLSON G., SMITH D.A., TAMAS T. & VAN IDERSTINE A. 1977. Comparison of anticoccidial efficacy, resistance and tolerance of Narasin, Monen

sin and Lasalocid in chicken battery trials. Poultry Sci. 56: 1550.

16. YVORE' P. & TAROZZI F. 1979. Le coccidiosi ed i metodi di prevenzione Rivista di avicoltura. 2: 33.

UN METODO RAPIDO, SPECIFICO E SENSIBILE DI IDENTIFICAZIONE DEI RESIDUI DI FARMACI ANTIELMINTICI NEL LATTE E CARNE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA MS/MS

R.Maffei Facino & M.Carini

Istituto Chimica Farmaceutica Tossicologica (Facoltà di Farmacia), Università di Milano, Milano

Riassunto - Viene descritto un metodo rapido, specifico e sensibile per l'identificazione di farmaci antielmintici presenti in tracce nel latte e carne.

La tecnica utilizzata è costituita da un metodo di spettrometria di massa MS/MS: CAD MIKES (collisionally activated decomposition mass analyzed ion kinetic energy spectrometry). L'applicazione di tale tecnica consente l'identificazione di sei antielmintici a struttura chimica diversa simultaneamente presenti nella matrice biologica.

Summary - A rapid and sensitive method for the selective detection of anthelmintic residues at ppb level in crude extracts of milk and meat is described.

The technique employed is an MS/MS method: CAD MIKES (collisionally activated decomposition mass analyzed ion kinetic energy spectrometry) (1).

Detection involves the injection of the crude ethanol extracts and selection/collision of molecular ions of each targeted compound. Confirmation is acquired by matching the complete CAD spectra with those of the pure compounds.

The method has been successfully employed for the simultaneous identification of six anthelmintics in milk and meat.

Introduzione

I metodi finora utilizzati per l'identificazione dei residui di farmaci antielmintici presenti in latte e carne mancano sia di specificità e/o sensibilità (colorimetrici, fluorimetrici, radioimmunologici) e rapidità (HPLC, GLC).

Inoltre non offrono alcuna conferma strutturale della molecola antielmintica.

Alla luce degli incoraggianti risultati recentemente acquisiti nel settore del controllo dei contaminanti alimentari (antibiotici, anabolizzanti) (2,3) mediante la tecnica di spettrometria di massa CAD MIKES, ci siamo proposti in questo studio di applicare questa metodologia per l'analisi dei residui di farmaci antielmintici nel latte e nel tessuto muscolare di bovino.

I farmaci antielmintici presi in considerazione appartengono a diverse classi chimiche: nitrofenoli, salicilanilidi e benzimidazoli.

Materiali e metodi

Le indagini in spettrometria di massa sono state condotte utilizzando le tecniche EI (impatto elettronico, condizioni DEI) e CAD MIKE (dissociazione per collisione) nelle seguenti condizioni: strumento: VG ZAB 2F operante a 70 eV (200 μ A); temperatura sorgente 200°C; energia degli ioni collidenti con aria: 8 KeV.

I sei farmaci antelmintici considerati (Nitroxynil, Rafoxanide, Ossiclozanide, Closantel, Mebendazolo e Febantel) venivano disciolti in metanolo e aggiunti separatamente o simultaneamente a campioni di latte (1 ml) e di tessuto muscolare (1 g. omogeneizzato in tampone fosfato pH 7.4) in concentrazione 0.5-5.0 ppb. I campioni venivano successivamente trattati, in parallelo a dei bianchi, con 10 vol. di etanolo assoluto e centrifugati per 5 min. a 10.000 RPM. I precipitati venivano risospesi in 4 vol. di etanolo e ricentrifugati. Gli estratti etanolici venivano riuniti e concentrati a secchezza sotto vuoto ed i residui ripresi con 1 ml di etanolo: aliquote di 10 μ l di questo estratto venivano iniettate direttamente nello spettrometro di massa.

Risultati

La tecnica di spettrometria di massa MS/MS, in particolare la tecnica CAD MIKE prevede la ionizzazione del campione per urto elettronico, la successiva selezione di uno ione di interesse mediante il settore magnetico dello strumento, la decomposizione della specie ionica selezionata per collisione con molecole neutre di gas e la registrazione di tutti gli ioni che derivano dalla decomposizione dello ione selezionato. Si ottiene in tal modo un secondo spettro di massa (spettro CAD MIKE) che raccoglie solo ed esclusivamente gli ioni prodotti da un preselezionato precursore, spettro che deve essere considerato come una vera e propria impronta digitalica della specie ionica selezionata e quindi come indice di identificazione inequivocabile della molecola a cui appartiene lo ione selezionato.

Prima dell'analisi CAD MIKE, si è studiato il comportamento dei singoli antelmintici puri in impatto elettronico (EI) al fine di selezionare, per ciascuno di questi, la specie ionica più abbondante da sottoporre a collisione.

In Fig.1 (a) è riportato lo spettro EI del Nitroxynil: per l'identificazione di questo composto nel latte e nel tessuto muscolare si è selezionato lo ione molecolare a m/z 290 che, sottoposto a decomposizione, dà origine allo spettro CAD MIKE (Fig.1-C) in cui sono evidenziabili gli ioni frammento diagnostici della molecola (m/z 273, 260, 215, 117 e 88). Come risulta evidente (Fig.1-b), la matrice biologica non trattata sottoposta a collisione a m/z 290, non produce ioni frammento che interferiscono con l'identificazione del Nitroxynil.

In Fig.2-a è riportato lo spettro EI della Rafoxanide, con ione molecolare a m/z 625 e un pattern di frammentazione governato dalla rottura del legame amidico, da cui si originano gli ioni più abbondanti a m/z 373 e 253.

Questi stessi ioni, che si ottengono selezionando e collidendo lo ione a m/z 625 sono ben evidenziabili nello spettro CAD MIKE (Fig.2-c) effettuato sul latte addizionato di Rafoxanide.

In Fig.3-a è riportato lo spettro EI dell'Ossiclozanide, il cui ione molecolare a m/z 399 è stato selezionato per l'identificazione del composto nelle due matri

oi biologiche. Gli intensi ioni a m/z 223 e 177 presenti nello spettro CAD MIKE (Fig.3-c) consentono l'identificazione inequivocabile di tale composto nel latte. L'ultimo composto considerato della serie delle salicilanilidi è rappresentato dal Closantel. Tale molecola, sottoposta a impatto elettronico (Fig.4-a) evidenzia uno ione molecolare a m/z 662 di debole intensità: per questo motivo l'analisi CAD MIKE di questa molecola è stata effettuata sullo ione più abbondante a m/z 290, ione strettamente correlato alla struttura base del composto. Gli ioni frammento ottenuti in seguito a collisione (Fig.4-c) sono diagnostici per l'accertamento della presenza dell'antelmintico nel latte.

Occorre sottolineare che nel caso del Closantel si è selezionata una specie ionica a m/z 290, con valore di massa coincidente con quella della specie ionica selezionata per il Nitroxynil. Ciononostante gli spettri CAD MIKE ottenuti, in quanto presentano frammenti riconducibili a due strutture chimiche diverse, sono totalmente differenti (Fig.5) e quindi diagnostici per ciascuna molecola. Questo rende possibile l'identificazione di entrambi gli antelmintici anche se questi siano contemporaneamente presenti nel latte.

Le altre molecole ad attività antelmintica considerate appartengono alla classe chimica dei benzimidazoli: Mebendazolo e Febantel.

In Fig.6-a lo spettro EI del Mebendazolo evidenzia uno ione molecolare abbondante a m/z 295 e ioni frammento caratteristici a m/z 263, 218, 186 e 158.

Questi stessi ioni sono ben evidenziabili nello spettro CAD MIKE (Fig.6-c) ottenuto iniettando l'estratto etanolic grezzo di latte contenente il farmaco.

Anche in questo caso la matrice biologica non trattata (Fig.6-b) non fornisce, dopo collisione a m/z 295, alcun ione frammento interferente.

L'analisi EI del Febantel (Fig.7-a) evidenzia uno ione molecolare di debole intensità a m/z 446. Per l'analisi CAD MIKE di questo composto nel latte e nel tessuto muscolare si è quindi selezionata e sottoposta a collisione la specie ionica più abbondante a m/z 339 (Fig.7-c), da cui si origina una serie di frammenti a m/z 323, 311, 280, 267, 241 che identificano inequivocabilmente la struttura in esame.

Come precedentemente osservato per il latte, anche il tessuto muscolare di bovino non fornisce interferenza nell'analisi diagnostica-identificativa dei sei antelmintici. Infatti, sottoponendo a collisione gli estratti etanolic grezzi di tessuto muscolare non trattato rispettivamente a m/z 290, 625, 399, 295 e 339, non si osservano ioni frammento interferenti che possono mascherare l'impronta digitalica di ciascun antelmintico.

Questo rende possibile l'identificazione di tutti gli antelmintici considerati anche in questa matrice biologica.

Da prove effettuate iniettando direttamente soluzioni etanoliche dei sei composti puri a concentrazioni decrescenti e integrando le aree dei picchi SIM (single ion monitoring) della specie CAD più abbondante per ciascuna molecola, si è potuto stabilire un limite di rilevamento per le molecole in esame dell'ordine di 0.5-1.0 ppb. Tale limite non aumenta apprezzabilmente quando la sperimentazione viene effettuata in presenza della matrice biologica.

Il tempo complessivo d'analisi che intercorre dall'allestimento del campione alla risposta strumentale è di circa 20 minuti.

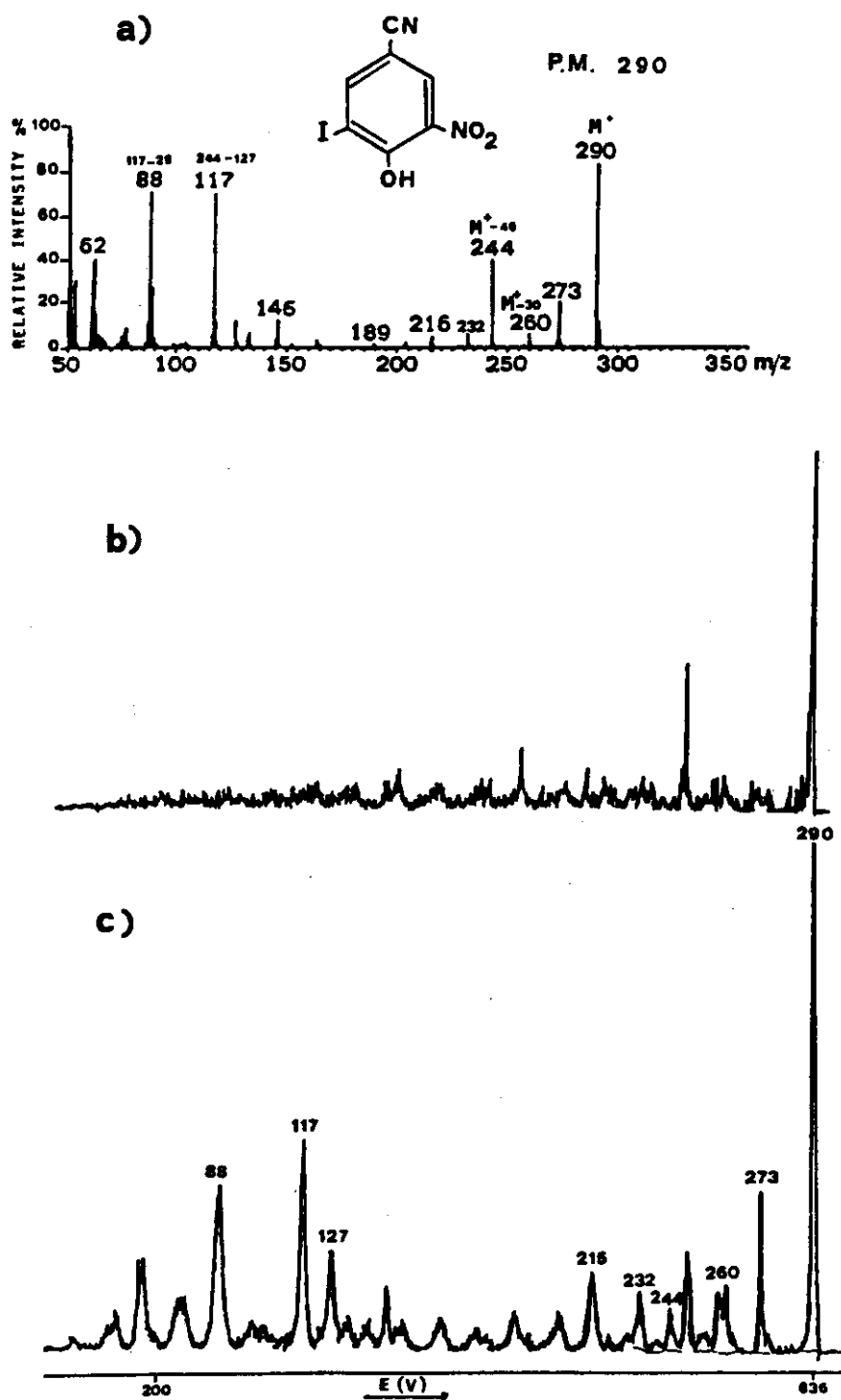


Fig. 1 - Spettri EI-CAD MIKE Nitroxylin

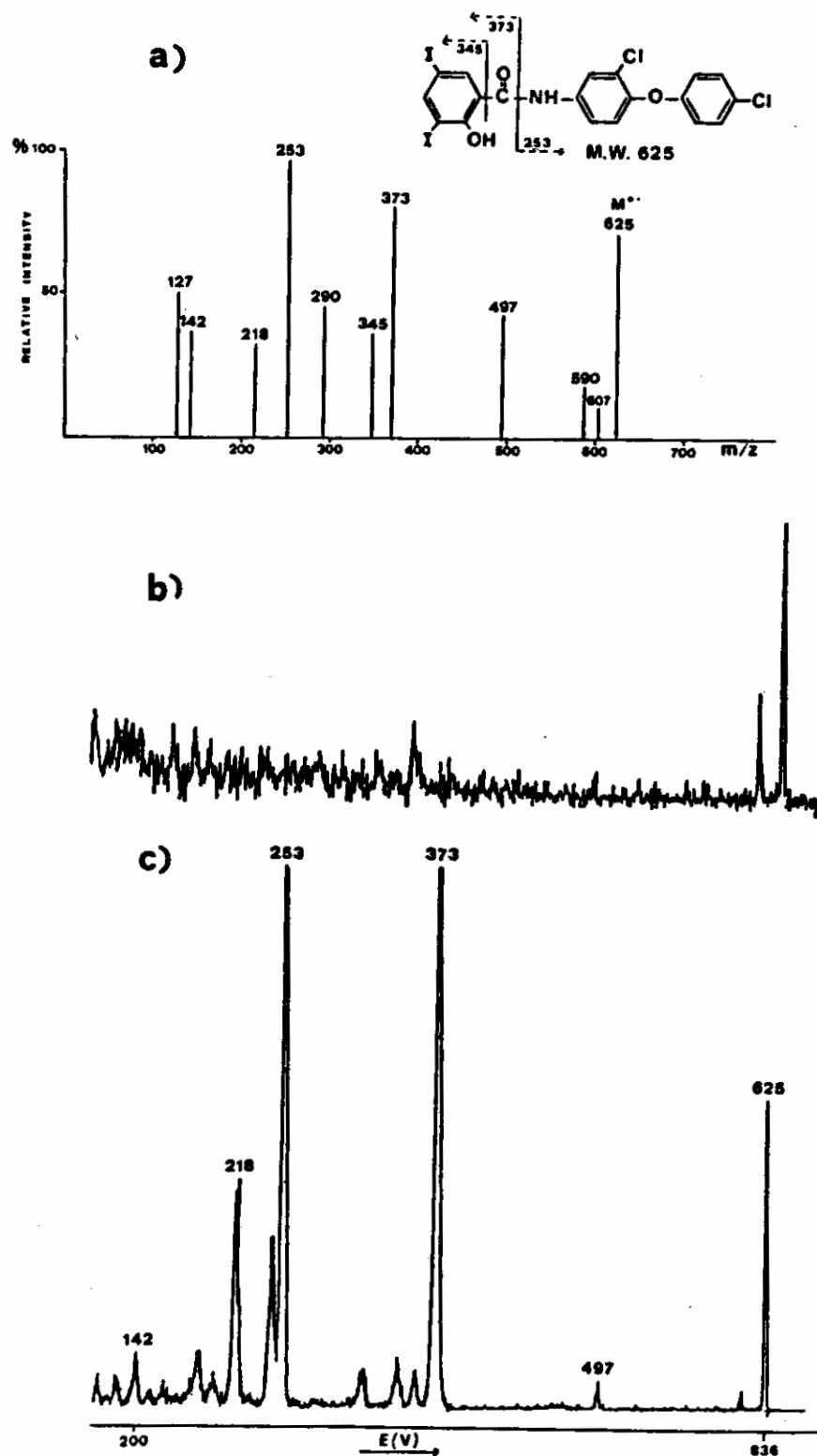


Fig. 2 - Spettri EI-CAD MIKE Rafoxanide

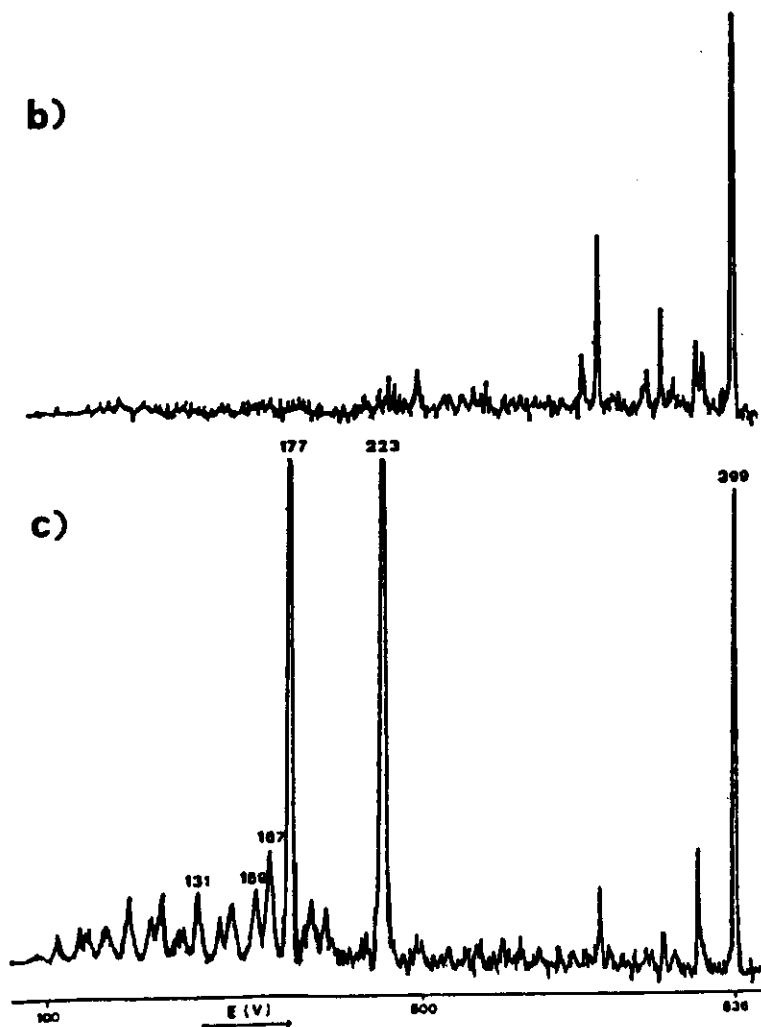
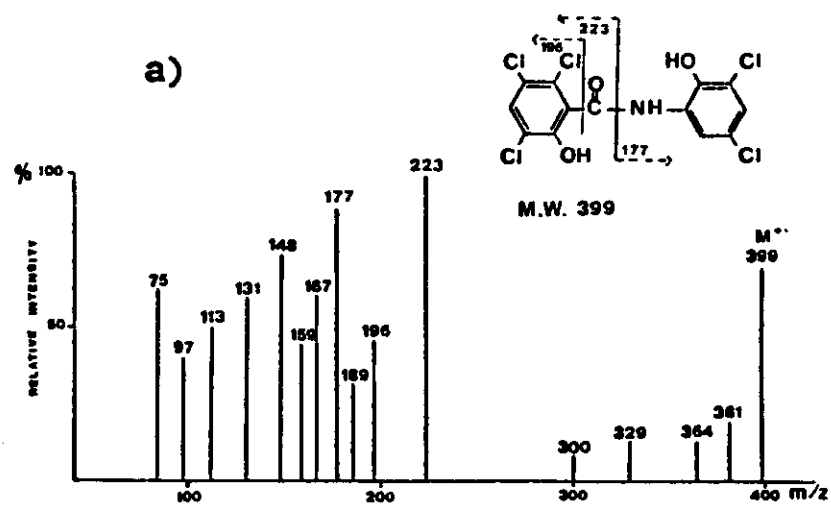


Fig. 3 - Spettri EI-CAD MIKE Ossiclozanide

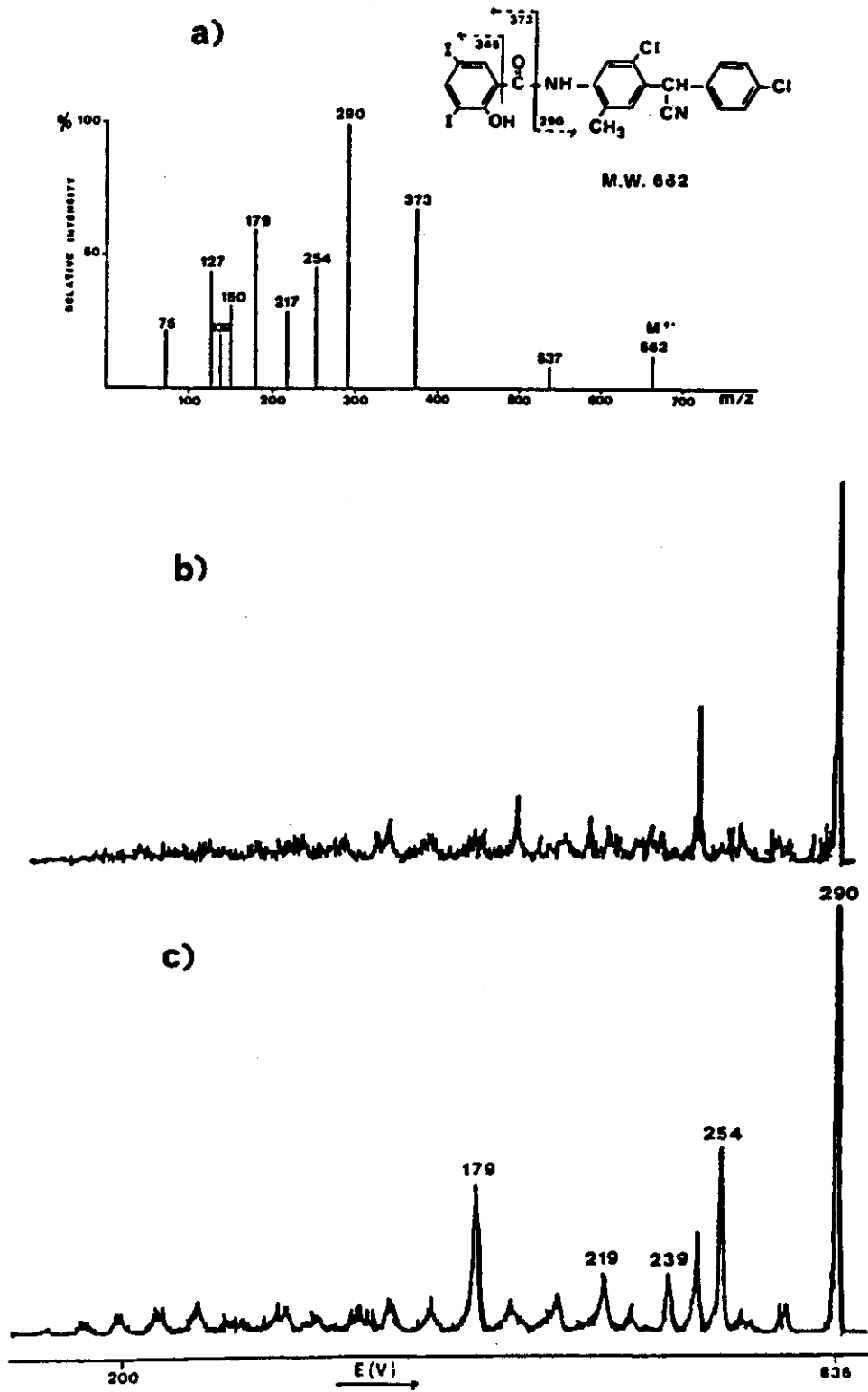


Fig. 4 - Spettri EI-CAD MIKE Closantel

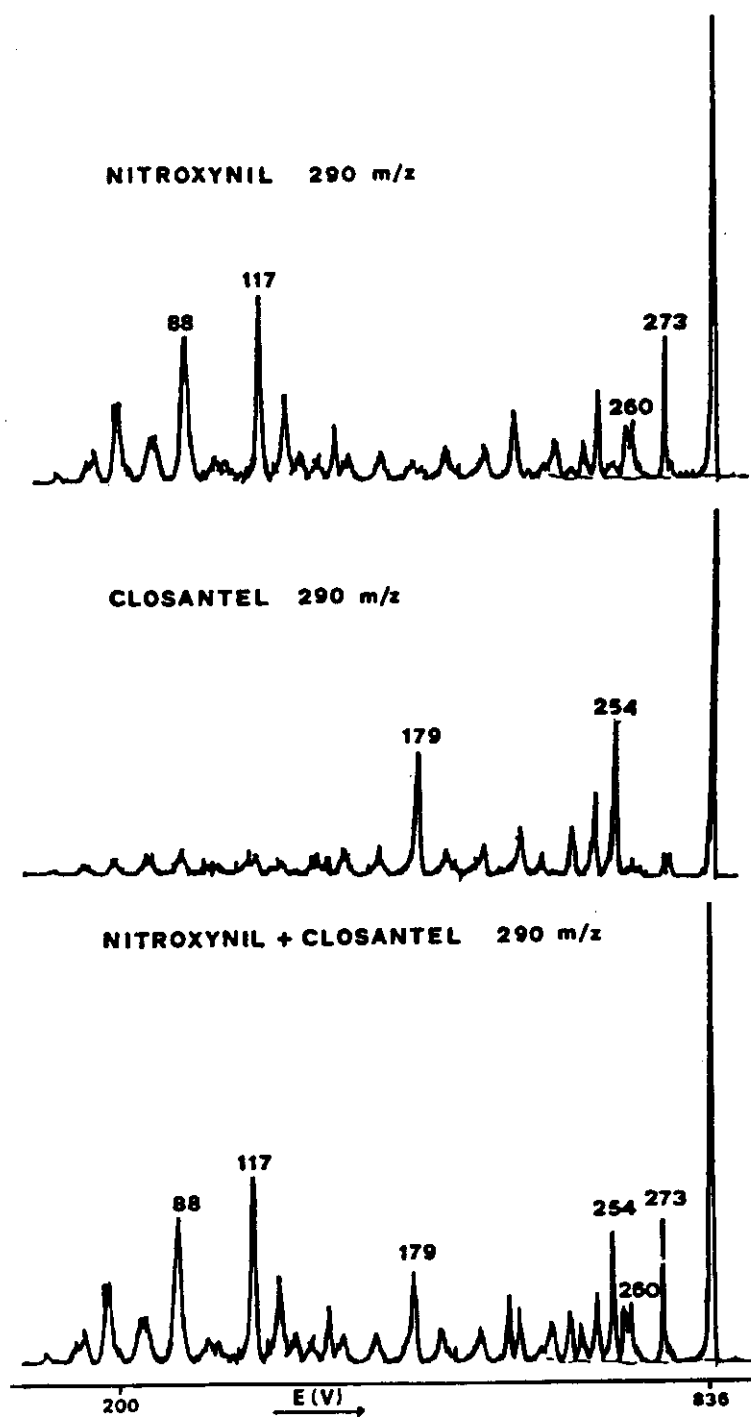


Fig. 5 - Spettri CAD MIKE di NitroxyNIL, Closantel e NitroxyNIL + Closantel

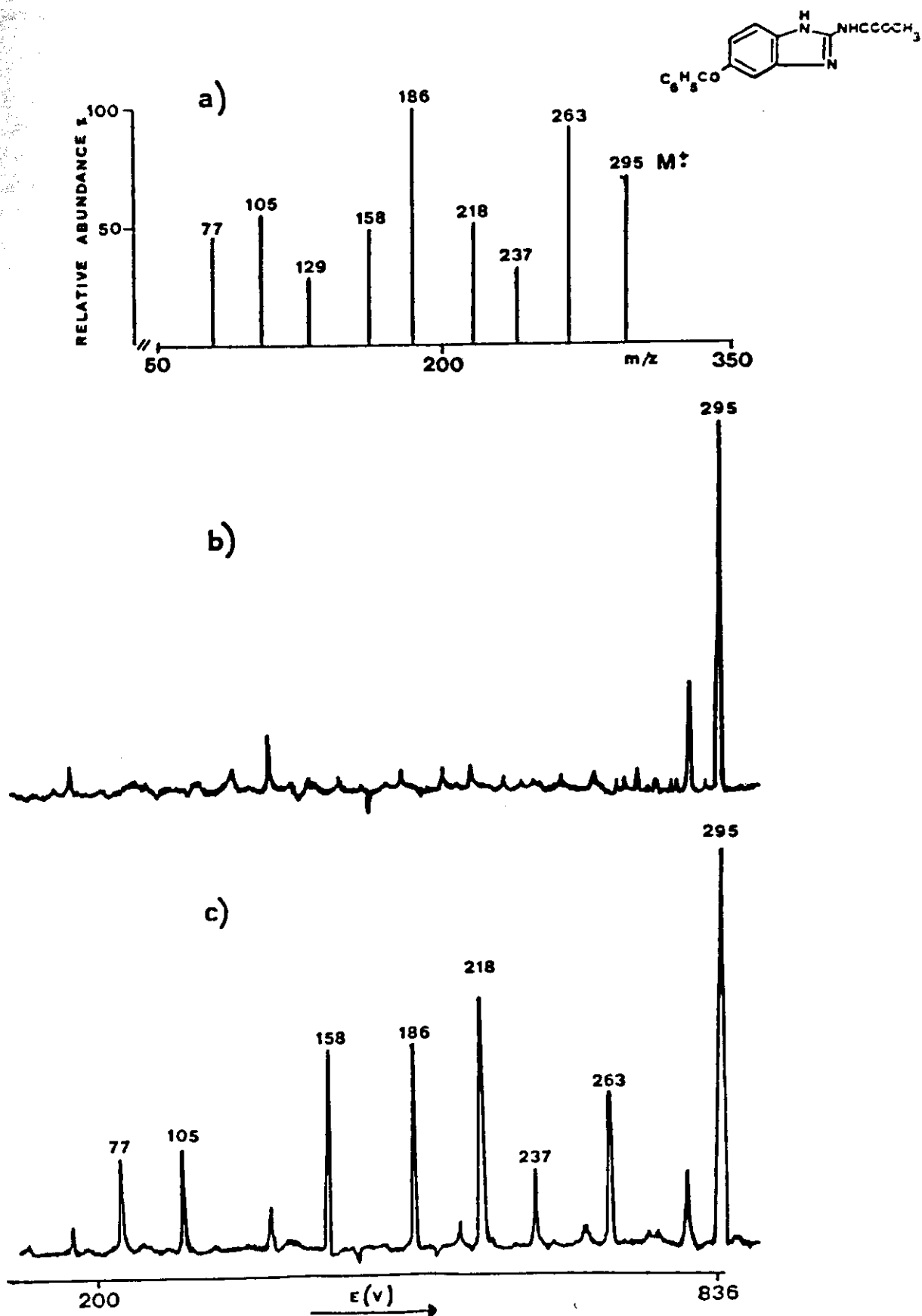


Fig. 6 - Spettri EI-CAD MIKE Mebendazolo

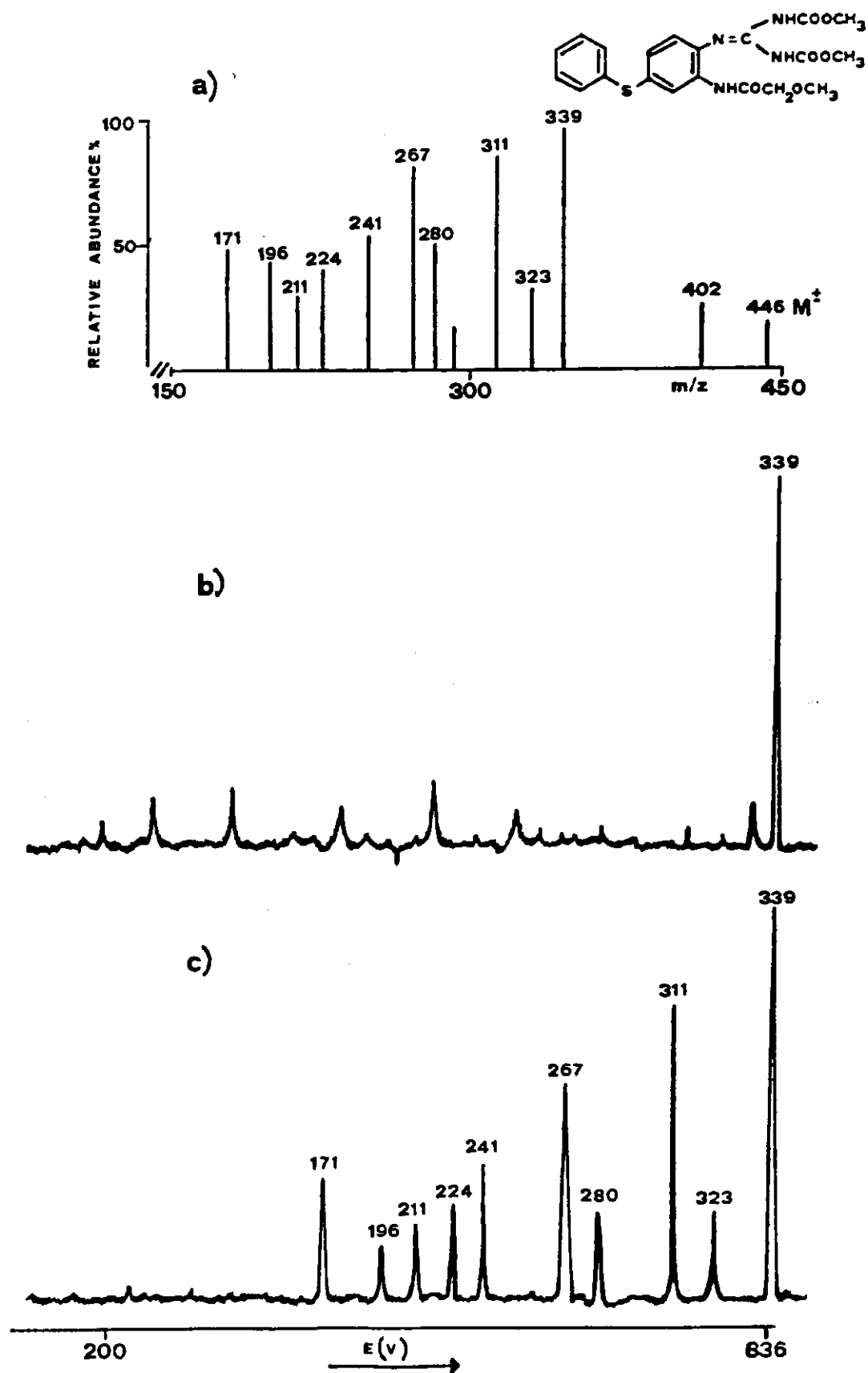


Fig. 7 - Spettri EI-CAD MIKE Febantel

Discussione

La tecnica MS/MS descritta consente l'identificazione inequivocabile dei singoli antelmintici considerati direttamente nella matrice biologica, con minimo pretrattamento purificativo della stessa. In questo modo è possibile ovviare ai lunghi e laboriosi procedimenti cromatografici di purificazione del campione e inoltre, data l'elevata sensibilità del metodo, è possibile effettuare l'identificazione utilizzando minime quantità di materiale biologico. Inoltre tale tecnica consente l'evidenziazione degli antelmintici considerati anche quando questi siano contemporaneamente presenti nel latte o nella carne. Infatti mediante una singola iniezione di estratto biologico è possibile selezionare di volta in volta lo ione scelto per la caratterizzazione di ogni singola molecola, sottoporlo a collisione e ottenere i relativi spettri CAD MIKE diagnostici.

La possibilità di identificazione simultanea di 6 antelmintici a struttura chimica diversa dimostra l'ampia versatilità di tale approccio metodologico: questo significa che l'analista, che non conosce se e quale antelmintico è presente nella matrice biologica può, focalizzando lo strumento sugli ioni opportuni, stabilire inequivocabilmente, in un unico passaggio, la presenza di uno o più antelmintici senza essere costretto alla messa a punto di metodiche specifiche per ogni singola molecola.

BIBLIOGRAFIA

1. KRUGER T.L., LITTON J.F., KONDRAT R.W. & COOKS R.G. 1976. Mixture analysis by mass-analyzed ion kinetic energy spectrometry. Anal.Chem. 48: 2113-2119.
2. TRALDI P., DAOLIO S., PELLI B., MAFFEI FACINO R. & CARINI M. 1985. Rapid, sensitive and specific determination of Oxytetracycline residues in bovine milk and meat by CAD MIKES analysis at the 1 ppb level. Biomed.Mass.Spectrom. 12 (In press).
3. MAFFEI FACINO R., CARINI M., DA FORNO A., TRALDI P. & POMPA G. 1985. A rapid method for the simultaneous detection by CAD MIKE spectrometry of parts per trillion (ppt) of diethylstilbestrol, zeranol and trenbolone in plasma and edible tissues of cattle. Biomed.Mass Spectrom. 12 (In press).

CRITERI PER LA VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA DI ANTICOCCIDICI ED ANTIPARASSITARI NELLE PRODUZIONI ZOOTECHNICHE

A. Macrì e C. Ricciardi

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore
di Sanità, Roma

Riassunto. - Vengono riportate le caratteristiche dei protocolli e dei criteri seguiti per la valutazione tossicologica delle sostanze impiegate nelle produzioni zootecniche, nella prevenzione, nella terapia e nella profilassi delle parassitosi. In particolare vengono considerati i protocolli sperimentali previsti per gli additivi dei mangimi, per i mangimi medicati e per i presidi medico-chirurgici previsti sia in Italia che nella Comunità Economica Europea. Di ogni singolo protocollo vengono discussi i criteri fondamentali da seguire per gli studi tossicologici.

Summary. - The paper deals with the procedures and the criteria required for toxicological evaluation of compounds used for prevention and treatment of parasitic infections in farm animals. In particular, attention is focused on toxicological protocols required for feed additives and therapeutical agents, either in Italy and in E.E.C.. The basic criteria of every kind of protocol are discussed.

Introduzione

Per la terapia e la profilassi delle parassitosi degli animali domestici sono disponibili numerosi farmaci che risultano efficaci nelle diverse specie.

Le modalità di distribuzione dei farmaci sono dipendenti dalle condizioni di allevamento degli animali, dalla loro taglia e dal tipo di parassitosi da cui vengono colpiti.

In genere negli allevamenti intensivi per la profilassi e la terapia delle endoparassitosi si ricorre alla somministrazione di massa mediante la distribuzione dei farmaci nei mangimi o nella acqua di bevanda. Nelle ectoparassitosi degli animali di grossa taglia si ricorre invece a trattamenti individuali per via cutanea (mediante aspersione o immersione in soluzioni contenenti i farmaci) o per altra via parenterale.

Le diverse modalità di somministrazione comportano diversi problemi pratici ed i farmaci sono stati regolamentati nelle categorie degli additivi dei mangimi, dei farmaci per la terapia di massa mediante alimentazione, tra le specialità medicinali e tra i presidi medico-chirurgici.

Alla categoria degli additivi dei mangimi appartengono essenzialmente i coccidiostatici che hanno scopo prevalentemente profilattico, vengono somministrati per tutta la carriera produttiva degli animali ed il loro impiego avviene senza prescrizione medico-veterinaria.

Nella terapia di massa si ricorre alla somministrazione dei farmaci antiparassitari mediante l'alimentazione anche se la distribuzione dei mangimi "medicati" agli allevatori è possibile solo con una preventiva prescrizione medico-veterinaria.

La ricetta veterinaria è anche richiesta per le specialità medicinali che di norma trovano impiego come terapia mirata in soggetti generalmente di grossa taglia.

Esiste infine la categoria dei presidi medico-chirurgici a cui appartengono quei prodotti per uso topico contro gli ectoparassiti che pur essendo utilizzati con precise finalità terapeutiche non richiedono una prescrizione veterinaria.

Per tutte le categorie degli antiparassitari descritti esiste l'obbligo dei "tempi di sospensione", cioè le derrate di origine animale prodotte possono essere utilizzate soltanto dopo congruo periodo di sospensione del trattamento in modo da evitare la presenza di residui al momento della utilizzazione delle derrate alimentari stesse. Le indicazioni dei tempi di sospensione da rispettare sono indicate nei cartellini apposti sui sacchi dei mangimi o nelle etichette delle confezioni delle specialità medicinali o dei presidi medico-chirurgici. Per tutte le differenti classi di sostanze chimiche sono stati stabiliti dei criteri di valutazione tossicologica (1) e questo è avvenuto anche per gli antiparassitari.

Criteri per la valutazione degli additivi

Nella categoria degli additivi, come è già stato accennato, sono stati inclusi gli anticoccidici che sono rappresentati essenzialmente dagli antibiotici ionofori e da alcuni chemioterapici.

La legislazione che regola la commercializzazione degli additivi viene fatta dalla CEE attraverso l'emissione di direttive che vengono recepite dai diversi stati della Comunità. I criteri di valutazione sono pertanto comunitari e sono stati predisposti dal Comitato Scientifico per l'alimentazione animale. Nella Tabella 1 vengono riportate le informazioni richieste dal protocollo sperimentale per gli additivi.

Tabella 1. - Studi * richiesti dalle linee direttrici per la valutazione degli additivi destinati all'alimentazione animale (2).

- Identità della sostanza
- Caratteristiche chimico-fisiche
- Condizioni di impiego e metodi di analisi nel mangime
- Efficacia zootecnica
- Tollerabilità nelle specie bersaglio
- Metabolismo e residui nelle specie bersaglio
- Tossicità acuta
- Mutagenesi
- Tossicità subcronica
- Tossicità cronica
- Tossicità di relais
- Tossicità della riproduzione compresa la Teratogenesi
- Altri studi appropriati (in particolare tests di irritazione o sensibilizzazione a seguito di esposizione cutanea o oculare).
- Ecotossicologia

* - Tutti gli studi debbono essere presentati in un dossier dove vengono descritte nei dettagli le condizioni sperimentali in cui si è operato.

Il protocollo ha un carattere indicativo e nel caso che i dati richiesti non siano disponibili debbono essere presentati documenti che ne giustifichino l'assenza.

Nell'esame della documentazione presentata viene posta particolare attenzione agli studi sul metabolismo nella specie bersaglio che dovrebbero essere fatti somministrando agli animali la sostanza in esame marcata in modo da poter seguire l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione e poter quindi definire i tempi necessari affinché la sostanza venga completamente escreta dall'organismo animale dopo la sua ultima somministrazione.

Criteri per la valutazione di principi attivi per specialità medicinali

Un protocollo sperimentale "ad hoc" è stato emanato dalla CEE con la specifica direttiva e le informazioni richieste per poter valutare le specialità medicinali sono schematizzate nella Tabella 2.

Dalla tabella si può evidenziare che tra gli studi richiesti viene data grande importanza alla conoscenza delle caratteristiche tossicologiche di residui. In effetti tale impostazione è molto importante soprattutto perché i dosaggi che vengono impiegati sono piuttosto elevati ed i pericoli di persistenza dei residui sono accentuati. Anche in questo caso il protocollo sperimentale ha un carattere indicativo, in quanto suggerisce le prove più importanti da effettuare ed in realtà non indica precisi tests. Inoltre c'è da rilevare che non vengono richiesti studi di mutagenesi che invece attualmente sono ritenuti di larga validità predittiva.

Tabella 2. - Prove tossicologiche da effettuare su medicinali veterinari (3).

-
- TOSSICOLOGIA PER GLI ANIMALI
 - a) Tossicità acuta
 - b) Tossicità per somministrazioni ripetute
 - c) Tollerabilità nelle specie bersaglio
 - d) Tossicità fetale
 - e) Tossicità della riproduzione
 - FARMACOLOGIA
 - a) Farmacodinamica
 - b) Farmacocinetica
 - STUDIO SUL RESIDUI*
 - a) Determinazione (Metodi di analisi)
 - b) Effetti tossici di residui: si raccomanda la tossicità di relais nel caso non sia possibile isolare il residuo. Su residui isolati studi di tossicità subcronica.
 - c) Altri effetti dei residui. Si intendono studi di cancerogenesi e teratogenesi. Questi studi sono richiesti solo per molecole di cui è accertato o supposto un potere teratogeno o cancerogeno.
- * - I vari studi sui residui non sono richiesti qualora ci siano sufficienti evidenze di rapida eliminazione dei residui stessi.
-

Criteri per la valutazione dei presidi medico-chirurgici

Per questa categoria di antiparassitari non esistono specifiche linee guida di valutazione, ma i gruppi di esperti che procedono all'esame delle documentazioni scientifiche sia al Ministero della Sanità, Direzione Generale

Servizio Farmaceutico, che al Consiglio Superiore di Sanità, seguono criteri di carattere generale che sono in armonia con quanto già stabilito dalle linee guida per gli additivi, per i farmaci di uso veterinario ed anche per i pesticidi. In pratica, almeno in Italia, vengono richieste le informazioni riportate in Tabella 3.

Tabella 3. - Informazioni richieste in Italia per la valutazione dei presidi medico-chirurgici

-
- Studi di Farmacocinetica
 - Studi completi di Tossicologia in vivo a breve, medio e lungo termine
 - Tossicità della riproduzione
 - Mutagenesi (cinque tests)
 - Ecotossicologia
-

Conclusioni

Come per tutti i farmaci i prodotti impiegati in terapia animale debbono essere dotati di una buona efficacia. Un antiparassitario ideale dovrebbe però anche possedere altri requisiti che sono una buona tollerabilità e quindi una bassa tossicità per gli animali destinatari del prodotto, come pure brevi tempi di persistenza del farmaco nei tessuti degli animali trattati.

Una buona tollerabilità è necessaria soprattutto nel caso di interventi di massa, come avviene quando i principi attivi vengono mescolati ai mangimi oppure disciolti in acqua, in cui è possibile che gli animali assumano maggiori quantità di alimenti o bevanda e di conseguenza maggiori quantità di farmaci.

Lo studio della tollerabilità viene richiesto dai protocolli CEE sugli additivi e sui farmaci veterinari (Tabella 1 e 2) e proprio l'effettuazione di questi studi ha permesso di osservare che alcuni antibiotici ionofori nei pulcini hanno un intervallo terapeutico piuttosto limitato ed inoltre sono tossici per alcune specie animali di interesse zootecnico (equini e faraone). In questo ultimo caso gli allevatori vengono avvertiti della pericolosità della sostanza con delle indicazioni apposte sui cartellini dei mangimi o sulle etichette delle specialità medicinali.

Il secondo aspetto di grande importanza sanitaria è quello che riguarda le conoscenze delle caratteristiche metaboliche e tossicologiche dei residui.

Le differenti linee guida richiedono informazioni dettagliate sulla farmacocinetica delle sostanze e una volta che i dati sono disponibili vengono imposti tempi di sospensione dei trattamenti tali da impedire la presenza di residui nelle derrate di origine animale. Infatti attualmente, almeno in Italia, non sono accettati livelli di tolleranza di residui e tale impostazione è giustificata dal fatto che raramente si conoscono le caratteristiche di biodisponibilità e tossicologiche dei residui e di conseguenza è quasi del tutto impossibile stabilire dei limiti di sicurezza per l'uomo. Occorre infatti considerare che le derrate di origine animale sono consumate dall'intera popolazione comprendente bambini, vecchi, malati, donne incinte, ecc., per cui esiste la possibilità dell'insorgenza di patologie la cui frequenza e gravità è del tutto imprevedibile.

Il protocollo sperimentale che riguarda i farmaci per uso veterinario in effetti prevede che vengano studiate le caratteristiche tossicologiche dei residui, ma occorre considerare che le metodiche suggerite non sempre sono attuabili e di sufficiente affidabilità. In considerazione di quanto premesso si ritiene che i criteri attualmente indicati per la valutazione tossicologica dei farmaci antiparassitari siano sufficienti per indicare un corretto impiego dei farmaci stessi sia per quanto riguarda i dosaggi agli animali, che per la

determinazione dei tempi di sospensione dei trattamenti.

Per garantire comunque la salubrità delle derrate di origine animale sarebbe necessario conoscere meglio le caratteristiche tossicologiche dei residui ed in tal senso dovrebbero essere effettuate delle ricerche per individuare metodologie di indagine tossicologica affidabili.

BIBLIOGRAFIA

1. MACRI', A., SILANO, V. 1982. Toxicological and Ecotoxicological Premarketing Testings of Chemicals Intended for Different Uses. Animals in Toxicological Research, Raven Press, New York.
2. Reports of Scientific Committee for feed, EUR 6918, 1980.
3. Direttiva CEE Farmaco Veterinaria G.U. CEE L 317, 1981.

COCCIDIOSTATICI: PROBLEMI ANALITICI APERTI

G. Settimj

Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'uso preventivo e di massa di molti dei coccidiostatici attualmente impiegati (Tabella 1) sia per combattere le coccidiosi di animali da allevamento che quali fattori di crescita, pone il problema sanitario della definizione caso per caso dei tempi di attesa. A tale definizione è quindi legata la risoluzione del problema chimico-analitico della determinazione in carni, uova e latte dei residui degli stessi coccidiostatici, dei prodotti del loro metabolismo negli animali trattati e dei composti derivanti dalla loro degradazione nel corso della preparazione degli alimenti medicati e nel periodo di stoccaggio.

Tuttavia, malgrado l'uso assai esteso di questi farmaci, alcuni dei quali ammessi nella CEE come fattori di crescita (carbadox, nitrovina, olaquinox), di pochi di essi sono state studiate tecniche analitiche atte alla loro deter-

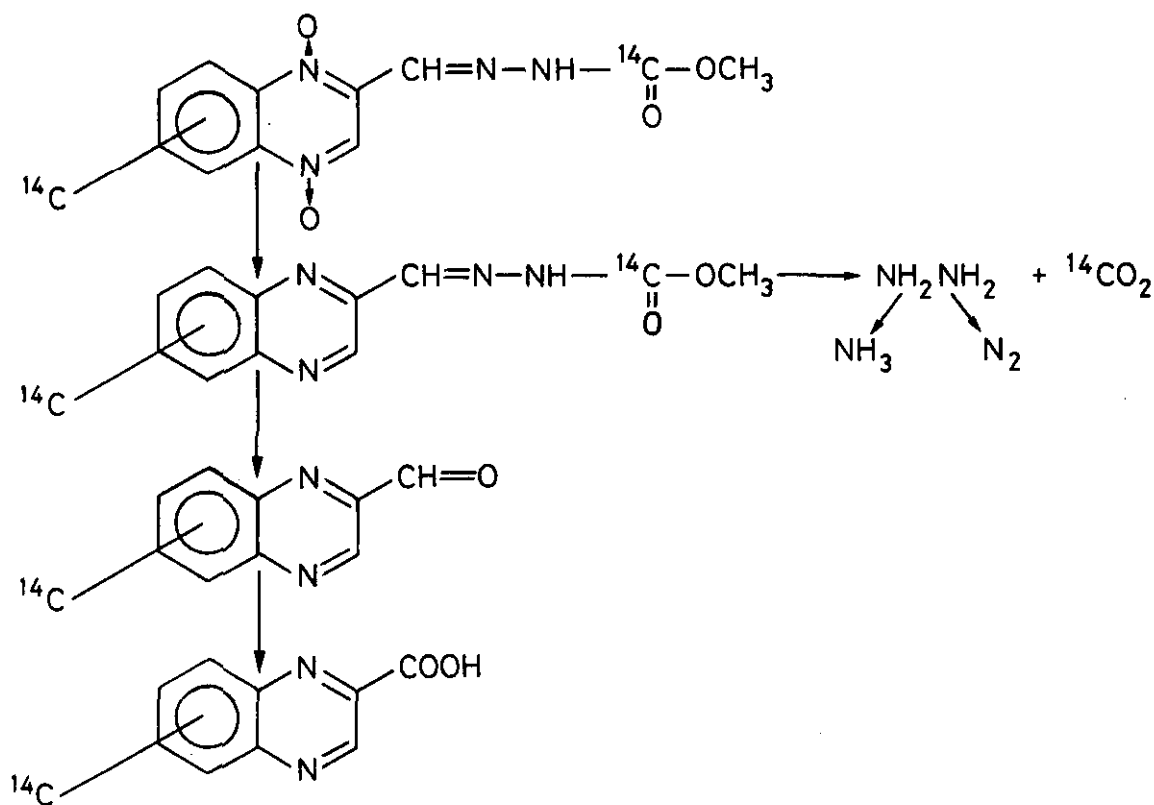


Fig. 1. - Metabolismo del Carbadox nei suini.

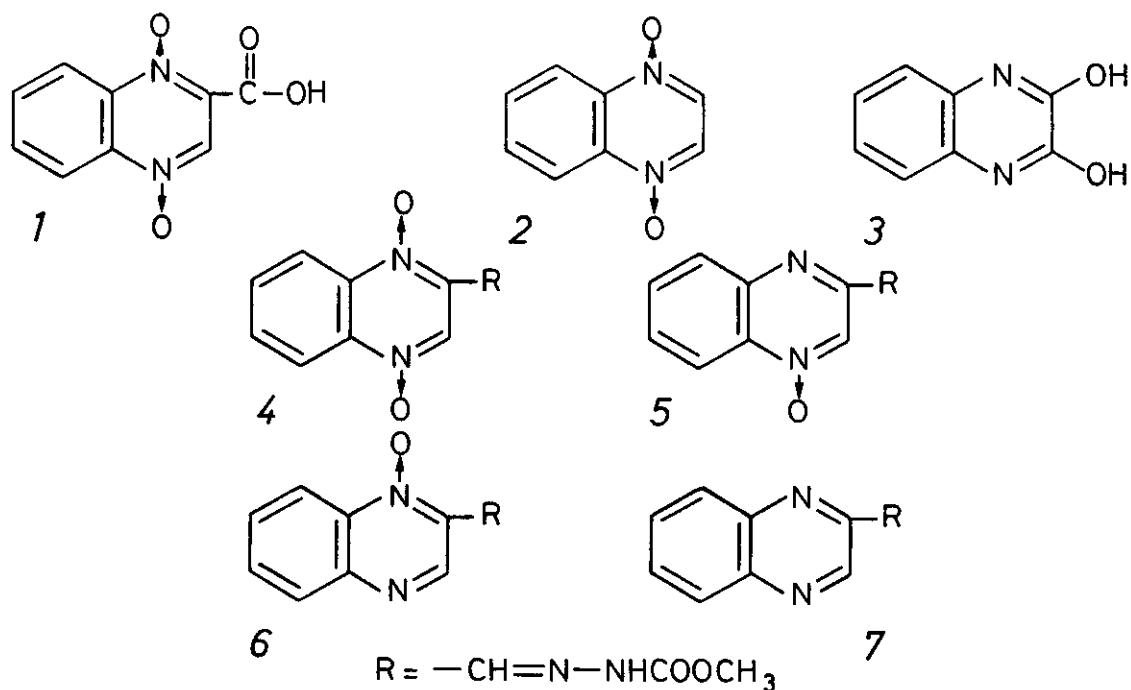


Fig. 2. - Struttura del carbadox e dei suoi potenziali prodotti di degradazione: 1. Ac. 2-chinossalincarbossilico-N,N'-diossido; 2. Chinossalin-N,N'-diossido; 3. 2,3-diidrossichinossalina; 4. Carbadox; 5. Metil-3-(2-chinossalinil-metilene)-carbazato-N-ossido; 6. Metil-3-(2-chinossalinil-metilene)-carbazato-N-ossido; 7. Metil-3-(2-chinossalinil-metilene)-carbazato.

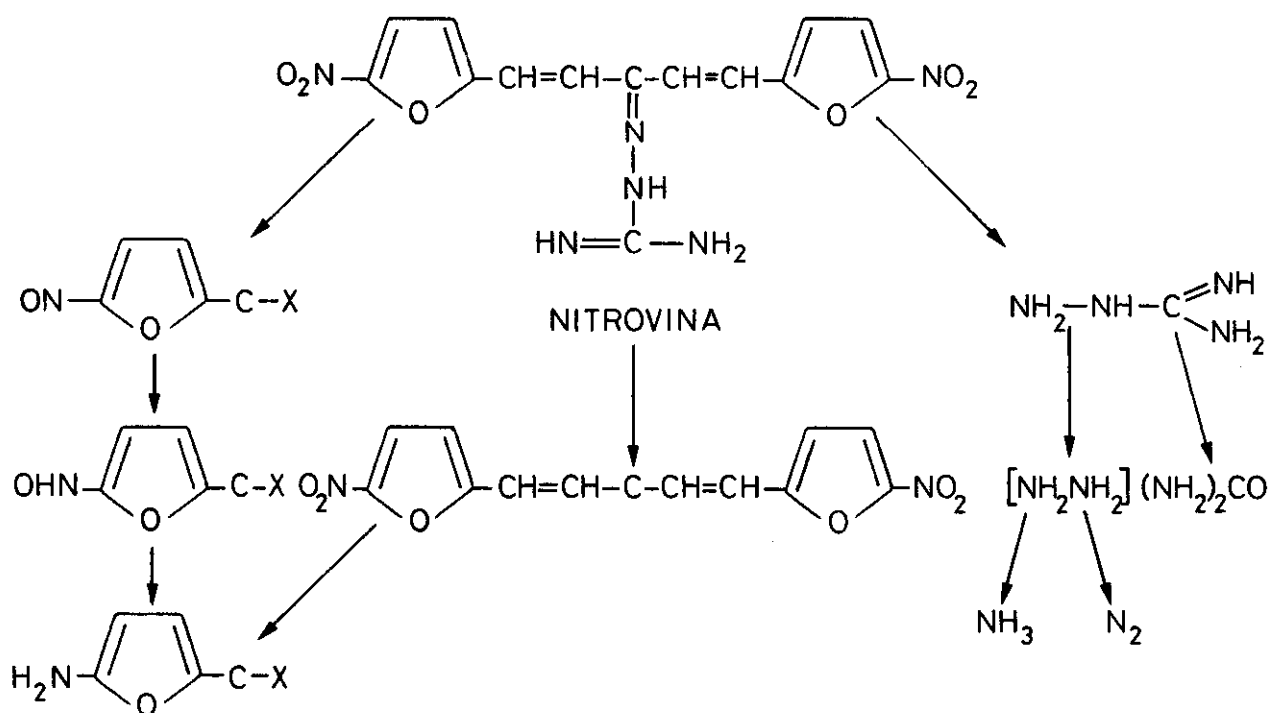


Fig. 3. - Possibili vie metaboliche di degradazione della Nitrovina.

minazione come residui. Apparentemente il solo Carbadox è stato oggetto di uno studio completo riguardante metodologie analitiche: a) per la sua quantizzazione come residuo (1); b) per la determinazione dei residui dei suoi metaboliti (2) (Fig. 1); c) per l'analisi dei suoi possibili prodotti di degradazione ad opera della luce e di agenti alcalini in alimenti finiti (3) (Fig. 2). Della Nitrovina è noto un metodo per la sua determinazione come residuo e dei residui dei suoi metaboliti nel pollame (2) (Fig. 3); infine, dell'Amprolium (4), del Decoquinato (5), della Sulfachinossalina (6), della Sulfachinossalina con Diaveridina (7) e del Lasalocide (8) sono stati pubblicati metodi di quantizzazione dei loro residui.

Le sensibilità riportate per queste metodiche oscillano fra 10 ppb e 1 ppm.

Un'altra incognita per una corretta stima dei tempi di attesa è costituita dalle perdite in titolo di principio attivo osservate da molti autori nel processo di pellettatura di alimenti medicati: sebbene tali perdite siano sensibili (5-20%), non risulta siano stati effettuati studi per l'identificazione degli eventuali prodotti di degradazione e, quindi, non esisterebbero metodologie analitiche per la determinazione di tali prodotti.

In considerazione delle informazioni tuttora limitate circa la degradabilità ed il destino metabolico di molti coccidiostatici, e il fatto che, per animali a brevissima carriera produttiva come polli e tacchini, è necessario che essi non si ammalinino mai e che pertanto dalla nascita alla macellazione vengono loro somministrati alimenti medicati, diviene estremamente importante - a tutela del consumatore - disporre di metodiche analitiche specifiche, sensibili e dotate di buona riproducibilità: ciò al fine di individuare criteri di ammissibilità di tolleranze analitiche o di margini degli errori analitici accettabili in funzione della dispersione dei risultati osservati in studi collegiali e dei tenori minimo e massimo di ciascuno degli additivi fissati nella Direttiva 70/524/CEE.

In proposito, nel mentre in Francia sono stati effettuati studi statistici sulla rispondenza quali-quantitativa al dichiarato del contenuto di vari additivi negli alimenti per animali e tenendo conto della metodica analitica impiegata, in Germania sono stati definiti i margini di errore consentiti nelle determinazioni analitiche di vari additivi (Tab. 2).

Tabella 1. - Coccidiostatici ed altre sostanze medicamentose. Dicembre 1978.
Direttiva del Consiglio 70/524/CEE

Allegato I.		min. (ppm) max. Metodo di analisi CEE		
No	E750	<u>Amprolium</u>		
		pollame	62,5	125 si
No	E751	<u>Etopabato</u> (miscela con Amprolium)		
		pollame	4,0	8,0 si
No	E752	<u>D O T</u>		
		pollame	62,5	125 si
No	E754	<u>Dimetridazolo</u>		
		tacchini	100	200 versione finale in
		cavie	125	150 preparazione
No	E755	<u>Meticlorpindolo</u>		
		polli, cavie, conigli	125	200 in preparazione

Tabella 1. - Coccidiostatici ed altre sostanze medicamentose. Dicembre 1978.
Direttiva del Consiglio 70/524/CEE. (CONTINUA)

<u>Allegato I.</u>		min. (ppm)	max.	Metodo di analisi	CEE
No E756	<u>Decoquinato</u>				
	polli	20	40	no	
No E757	<u>Monensin-sodio</u>				
	polli	100	125	approntato *	
No E758	<u>Robenidina</u>				
	polli, tacchini	30	36	no	
No E759	<u>Ronidazolo</u>				
	tacchini	60	90	in preparazione	
No E760	<u>Ipronidazolo</u>				
	tacchini	50	85	in preparazione	
<u>Allegato II.</u>		* Metodo microbiologico.			
No 2	<u>Dimetridazolo</u>				
	suini	100	200	versione finale in preparazione	
No 6	<u>Nicarbazina</u>				
	pollame	100	125	si	
No 12	<u>Ronidazolo</u>				
	suini	60	60	in preparazione	
No 16	<u>Meticlorpindolo+Metilbenzoquato</u>				
	polli	--	110	**	
No 19	<u>Nifursolo</u>				
	tacchini	--	75	no	
No 20	<u>Amprolium+</u>	--	100	si	
	<u>Sulfachinossalina+</u>	--	50	si	
	<u>Etopabato</u>	--	5	si	
	polli, tacchini				
No 21	<u>Miscela No 20 e pirimetamina</u>				
	polli	--	5	in preparazione	
No 24	<u>Sodio lasalocide</u>				
	polli	75	125	in preparazione	
** Max: 100 ppm per il meticlorpindolo + 10 ppm per il metilbenzoquato.					
<u>Fattori di accrescimento.</u>					
<u>Allegato I.</u>					
No E800	<u>Nitrovina</u>				
	pollame	10	15	versione finale	
	suini	5	30	in preparazione	
	vitelli	20	40		
<u>Allegato II.</u>					
No 2	<u>Carbadox</u>				
	suini	--	50	versione finale in preparazione	
No 3	<u>Olaquinox</u>				
	suini	15	50	no	
		50 *	100 *		
* Sostitutivo del latte.					

Tabella 2.- Tolleranze proposte da inserire nella normativa concernente gli additivi in alimenti per animali.

Additivi		Tenori, ppm		Tolleranze
		minimi	massimi	
E750	Amprolium	62,5	-	+ 10 mg/Kg
		-	125	+ 10%
E751	b) Etopabato	4	8,5	?
E20-B21	c)			
E752	D O T	62,5	-	+ 10 mg/Kg
		-	125	+ 10%
E754	Dimetridazolo	100-125	150-200	+ 10%
E755	Meticlorpindolo	125	125-200	+ 15%
E756	Decoquinato	20	40	+ 25%
E757	Monensin-sodio	100	120-125	+ 20 mg/Kg
E714	" "	10	-	+ 40%
E758	Robenidina	30	36	+ 5 mg/Kg
		50	66	+ 10%
E759	Ronidazolo	60	90	+ 10%
E760	Ipronidazolo	50	85	+ 10%
E761	b) Metilbenzoquato	-	8,35	+ 50%
E762	Arprinocide	60	60	?
E763	Sodio-lasalocide	75	-	+ 20%
		-	125	+ 20 mg/Kg
E850	Nitrovina	5	-	+ 2 mg/Kg
		10-20-40	15-25-30-40	+ 20%
		-	80	+ 10%
B6	Nicarbazina	100	125	?
B19	Nifursolo	50	75	?
B20	b) Sulfachinossalina	-	50-60	?
B21	b)			
B21	Pirimetamina	-	5	+ 40%
B22	Alofuginone	2	3	+ 25%
B26	Narasin	60	80	+ 20%
B27	Salinomicina-sodio	50	70	+ 20%
F2	Carbadox	20	-	+ 6 mg/Kg
		-	50	+ 15%
F3	Olaquindox	15	-	+ 30%
		50	50-100	+ 15%
E700	Zinco-bacitracina	5-15	20	+ 40%
		-	50-80-100	+ 20%
E710	Spiramicina	5	20	+ 40%
		-	80	+ 20%
E711	Virginiamicina	5-10	20	+ 40%
		-	50-80	+ 20%
E712	Flavofosfolipol	1-2-5-6-	4-5-10-16-	
		8-10	20-25	+ 40%
E713	Tilosina	5-10	20	+ 40%
		-	40	+ 10 mg/Kg

Tabella 2.- Tolleranze proposte da inserire nella normativa concernente gli additivi in alimenti per animali. (CONTINUA)

	Additivi	Tenori, ppm		Tolleranze
		minimi	massimi	
E715	Avoparcina	5-7,5-10- 15-20	15-20 -	<u>± 40%</u>
A22		-	40-45	<u>± 10 mg/Kg</u>
A25	Nosieptide	1-2	10-20	<u>± 40%</u>

BIBLIOGRAFIA

1. LYNCH, M.J. & BARTOLUCCI S.R. Confirmatory identification of Carbadox-related residues in swine liver by gas-liquid chromatography/mass spectrometry with selected ion monitoring. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 65: 66-70.
2. SKARKA, P. & SESTAKOVA, I. A new procedure for estimation of nitrovin and carbadox residues and their metabolites in food of animal origin. Arch. Toxicol., Suppl. 1; 1978: 207-210.
3. LUCHTEFELD, G.R. Detection of low level carbadox residues in animal feeds by high pressure liquid chromatography. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 60: 279-283.
- 4.a) COHEN, I.C.; CRISP, S & NORCUP, J. Residues of prophylactics in animal products. Part. II. The determination of Amprolium added to eggs and poultry meat. Analyst 97: 254-257.
b) PETZ, M.; THIER H-P. & VOGT, H. Rückstände des Coccidiostatikums Amprolium in Fleisch und Eiern. Z.Lebensm.Unters.Forsch. 170: 329-333.
5. FERRANDO, R.; LAURENT, M.R.; TERLAIN, B.L. & CAUDE, M.C. Decoquinate: estimation of residues in chicken tissues before and after cooking. J.Agr.Food Chem. 19: 52.
6. CRISP, S. Residues of prophylactics in animal products. Part I. The determination of sulphaquinoxaline in eggs and poultry by gas-liquid chromatography. Analyst 96: 671-674.
7. GENNARO-SOFFIETTI, M. & TAPPERO, P. Prove di tossicità e determinazione dei residui nei polli di un coccidiostatico costituito da sulfachinossalina e diaveridina. Ann.Fac.Medic.Vet.Torino. 25: 230-235.
8. MC DONALD, A. Method for antibiotic determination in animal tissues, as applied to lasalocid. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 61: 1214.

INVESTIGATIONS ON SAFETY PROBLEMS FOR MAN AND ANIMALS WITH VETERINARY ANTHELMINTICS

D. Düwel

Hoechst AG, Helminthology, P.O.Box 800320, D-6230 Frankfurt/Main 80

Summary: In the context of the subject there are three import topics: protection of animals, protection of human being, protection of the environment. The following investigations will be discussed in detail: toxicity studies, pharmacodynamic investigations, and residual studies.

In western industrial countries, trade with pharmaceutical products is controlled by laws and various state and non-state regulations. These laws and regulations prescribe which pharmaceutical preparations the companies may develop for sale under what conditions and the nature of the product information for the consumer.

The laws and regulations controlling production are determined by three basic motives:

To protect the animal to be treated

To protect human beings consuming the flesh or organs of treated animals

To protect the environment

a) during the production of pharmaceutical products

b) in the event of such products being excreted by animals after treatment.

Protection of the live animal must be taken into consideration. However, in the case of veterinary preparations (in the Federal Republic of Germany), it is accepted that a certain toxicity and a certain risk to the animal are admissible in as far as this toxicity does not affect man and when treatment of the animal is justified by a therapeutic and/or economic result.

The protection of human beings is controlled by drug regulations. The objective of these regulations is, in the interest of proper provision of pharmaceutical products for man and animal, to ensure safety in the consumption of food containing pharmaceutical preparations and, in particular, to ensure the quality, efficacy and absolute safety of drugs as directed by the respective regulations.

The protection of the environment is by far more widely extended on account of the multifariousness of biological and ecological processes. The intermediate or waste products resulting in the production of pharmaceutical preparations have to be harmlessly got rid of in such a way that they have no

detrimental effect on the environment and do not interfere with biotopic and ecological connections.

While the intermediate or waste products arising in the manufacture of medicinal preparations can be got rid of, the medicinal preparations and their metabolites themselves have to be non-detrimental to the environment. This means that, in the event of the drugs and their metabolites being excreted with feces and/or urine, for instance, they must not alter the environment nor lead to accumulation in, for example, plants or microorganisms. This not only applies to excretions expected after therapeutic dosage levels, but also to a multiple of these.

In discussing the studies necessary in the case of veterinary anthelmintics and the consequences arising from them, I will only mention those studies which are relevant to food-producing animals.

New veterinary preparations, whether they be growth promoters or drugs for specific diseases, are required for the most diverse indications in food-producing animals. All pharmaceutical preparations evolve from two fundamental ideas:

- To avert, or at least diminish, impairment;
- To increase performance.

The present-day challenge to produce more protein for the starving nations of the world is also involved to some extent in this.

Anthelmintics are of particular importance here, since parasitoses are responsible for about 30 % of all losses in domestic animals. The percentage of losses is probably even higher, since latent parasitoses are difficult to detect, as recent studies on the economic aspects of parasitoses demonstrated.

Anthelmintic medications can be given in several ways:
 as single-dose oral or parenteral treatment by applicator (drenching gun, dosing gun, injection, etc.);
 as short-term repeated-dose treatment, mostly administered orally by applicator or with medicated feed;
 as long-term treatment by means of special depot, i.e. slow-release systems, or also with medicated feed.

In accordance with these treatment schemes, toxicity studies are requisite. The US Food and Drug Administration has not only influenced the registration regulations of the individual countries throughout the world, but has also carried out pilot studies to a considerable extent which nowadays are the basis and recognized standard for the registration of drugs.

Even though anthelmintics are the primary consideration of this report, they are subject to the same degree to statutory regulations.

For studies of a toxicological and pharmacological nature, the European Community Council has issued the following guidelines, which I will outline in brief and comment on in part.

TOXICITY STUDIES

Single-dose toxicity:

The toxicity is to be tested at various dosage level in at least two species of mammals, whereby the dosage form administered is to be identical or similar to that planned for the target animal. Table 1 demonstrates the data of fenbendazole.

The study is also be performed in an equal number of male and female

animals.

The recovery period must last for at least one week after administration.

If drug combinations are tested, it must be proven that no indications of potentiation and no new toxic effects occur.

I should like to add that, in the case of compounds which are extremely well tolerated, it is obviously senseless to keep testing higher and higher dosage levels in order to provoke a "toxic effect". According to our experience, in the case of extremely high dosages, only a certain amount is absorbed since the passage through the intestines is too rapid and, consequently, a certain percentage - possibly a relatively high percentage - is excreted undigested.

An LD₅₀ is very often required. I consider such studies to be unjustified, for the following reasons:

If a statistical significance is to be calculable, the animals have to be used in numbers which are not justifiable from the animal protection point of view (I will revert to this later). Without statistical significance, however, LD₅₀ studies are of no value.

The significance of the information is rather limited since an LD₅₀ study is performed in model animals. It is generally known that models are only models and results in the target species cannot simply be extrapolated from the study results. To add to this, what relevancy has the LD₅₀ value? If a single treatment under field conditions were to result in less than 1 % deaths, this would already be too many deaths for us!

The single-dose toxicity has also to be tested in the target animal, namely, in all animal species for which the drug is intended. In this case, the general tolerance is to be ascertained and a multiple of the planned therapeutic dose (mostly two, three or four times - but not many times - the planned dose) is administered, above all, under field conditions.

Repeated-dose toxicity:

The objective of studies of this nature is generally, by repeated administration of the drug, to provoke undesirable or adverse effects in the study animal in order to obtain information on the main organs which are particularly to be examined following incidents in field practice.

The procedure with regard to dosage levels, animal species and sex, pharmaceutical dosage forms and also combination preparations corresponds with the requirements specified for testing the toxicity after single-dose administration.

In this context, particular attention is to be given to toxicity in the target animal, since, precisely in the case of relatively long-term treatment, e.g. via medicated feed in group feeding, repeated overdosing cannot be ruled out. The test dosage levels must take into account such overdosing possible under field conditions (see Table 2, data of fenbendazole).

While, for single-dose administration, a 30-day toxicity study satisfies animal protection requirements, more extensive studies are necessary to safeguard human beings. Repeated-dose studies over 90 days are performed and their results enter into safety calculations of the acceptable daily intake (A.D.I.). The formula for these is:

$$\text{ADI} = \frac{\text{No effect level}^*}{100} \times 70 \text{ kg body weight}$$

*) Determined in relatively long-term toxicity studies in laboratory animals

The summation of the residues found in the tissues of the animal may not exceed the ADI value. This sum is made up arithmetically from the average food consumption habits of the population which, in the Federal Republic of Germany, for example, are per adult per day:
300 g meat / 50 g fat / 100 g liver / 50 g kidney / 1 l milk.

The composition of animal foodstuffs consumed daily may differ from country to country depending on the different eating habits, but the basic formula satisfies the requirements. According to specific chemical structures which can possibly constitute a particular hazard for man, the risk factor can also be increased (for instance, the risk factor in the case of benzimidazoles is 1000).

To save on expenditure and animals, it is nowadays normal practice in the pharmaceutical industry not to carry out the 30-day studies at all, but to demonstrate safety for the target animals on the basis of the results of the 90-day study.

Fetal toxicity (Embryotoxicity and teratogenicity studies):

These studies examine whether or not the medicaments have an abortive (e.g. embryo-lethal) or toxic (e.g. teratogenic) effect on the embryos of the dams. In principle, the studies are performed in laboratory animals. If, in these experimental studies, specific indications of drug residues in the fetuses or specific effects on the fetuses are observed, further studies in the target animal may be necessary (see table 3, data of fenbendazole).

Fertility studies:

Should the results of the other studies reveal suspicious factors indicating a change in the male or female fertility or fatal consequences for the offspring, sufficient fertility studies must be carried out.

PHARMACOLOGICAL STUDIES

Pharmacodynamics:

Under "pharmacodynamics" is meant the changes induced by the drug in the normal or experimentally altered functions of the organism.

The studies to be carried out in this respect should adequately show the effects - over and above the desired anthelmintic effect - which may occur after administration of the drug. The effects in question are not essentially toxic effects, but rather effects affecting organ functions or the organism in general.

The effects to be investigated and described under this heading could also be referred to in general as the pharmacological effects of the compound.

While the studies so far were predominantly and obviously geared to the protection of animals, the studies I shall now mention are more geared towards the safeguard of man - even though the target animal usually benefits from the information.

Pharmacokinetics:

Under "pharmacokinetics" is meant the behaviour of the drug in the organism, namely, the absorption, distribution, biochemical conversion (metabolism) and excretion of the drug.

These different phases can be studied by physical, chemical or biological

methods.

Information on distribution and excretion of the drug are necessary in order to gain knowledge on residues in food-stuffs.

In drug combinations, pharmacokinetics studies of the individual components, compared with the data of the combinations, have a key function in getting information on a possible potentiating effect of the combination partners.

Determination of residues:

The investigation of residues serves the purpose of discovering whether or not, under what conditions and in what amounts residues remain in foodstuffs manufactured from treated animals, and what waiting periods should be observed in order to avoid a health hazard in man or unwholesomeness in the industrial processing of foodstuffs.

In order to be able to assess the possible risk of residues being present, it is necessary, after therapeutic treatment, to determine existent residues.

Under "residues" is meant:

all compounds present in edible tissues of the target animal that result from the use of the drug, including the drug itself, its metabolites, and any other substances formed in or on food as a result of the drug's use.

The FDA recommends the following six-step study plan:

1. A metabolic study in the target animal to characterize/identify residues of the drug in edible tissues and to establish their depletion profiles.
2. Comparative metabolism studies in laboratory animals (species/strains) to aid in evaluating/selecting test animals used for toxicity bioassays.
3. Toxicity/carcinogenicity testing to determine a safe level for residues of the sponsored drug.
4. A metabolic study in the target animal to identify a "marker residue" and "target tissue" which can be used to monitor total residues in the food supply.
5. Development of a regulatory assay to determine the "marker residue" in the "target tissue" at the required level of measurement.
6. Establishment of a premarket withdrawal period for the safe use of the drug.

The time and place do not permit me to go into further necessary studies and detailed study designs. However, the following must be mentioned, if only in a subordinate clause:

e.g.

Mutagenicity studies

My question: Is the Ames test really relevant ?

Lifetime toxicity/carcinogenicity study

Two-year carcinogenicity study

Toxicity studies under field conditions with different climatic and feeding conditions

Compatibility studies

(with vaccines, growth implants and other substances)

Safety to handlers

Safety to the environment

I must also mention the following:

Precise protocolling with, for instance,

details on the animals (earnumber, sex, weight and conditions)

details on the preparation (dose/kg, volume/animal, type of dosage form)

details on the environment (feed, time of day, climate, hygienic conditions)

details of recovery period - time to be fixed ! (clinical condition, feed intake, weight reaction).

The final point I would prefer not to deal with in a subordinate clause.

Aspects of animal protection:

This topic is being debated emotionally throughout the world, though doubtlessly with varying intensity, by the most diverse circles - by individuals who, more often than not, have no insight into the necessity of studies in animals or who deliberately close their eyes to this insight.

It is certain that, throughout the world, animal studies are being performed, the necessity and significance of which could be discussed - i.e. need not be discussed.

The pharmaceutical industry is undoubtedly not interested in increasing the scale of studies and, hence, the animal numbers, which would result in considerable expense.

If, in the report on the topic "Investigations on Safety Problems for Man and Animals with Veterinary Anthelmintics", I should mention animal protection, I do so alone for the reason that, in animal studies, we primarily see the greatest range of protection for man.

Under "animal protection", we would also understand "reducing the number of animals necessary to a minimum". The minimum number of animals in studies is largely controlled by statutory regulations. In our field, approximately 60 % of the animals are required on account of government regulations.

For the studies required (and, in most cases, essential) world-wide by the registration authorities (on behalf of our society) on account of the safety of the individual, animals are a matter of necessity.

If there were agreement between the registration authorities world-wide, if we had standard methods recognized world-wide and if the results of studies produced in one country were recognized by another country, the state would also make its contribution to the topic "animal protection".

Endeavours to set up international guidelines were already started years ago. Not only guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics were established - in this case under the direction of the WAAVP -, but also analogues are to be found in the sphere of toxicity studies (European Chemical Industry: Ecology & Toxicology Centre).

Let me conclude with a suggestion, with a request, yes, with an appeal to the representatives in the registration authorities that they decide on norms, which are internationally valid and recognized within the different countries, for the registration of drugs with respect to efficacy and safety. This will not only reduce the costs of a drug and be for the benefit of the consumer, but will also constitute a contribution to animal protection.

DEVELOPMENT OF ANTIPARASITIC AGENTS FOR LIVESTOCK: EFFICACY DATA REQUIREMENTS FOR THE TARGET ANIMAL. INTERNATIONAL ASPECTS

R.A. Roncalli

Merck Sharp and Dhome, USA

Parasiticism in domestic animals is one of the main causes of losses to the livestock industry, world-wide. For centuries, man has searched for products that would satisfactorily control both endo- and ectoparasites of domestic animals. It was only in the early 40's that phenothiazine, the first broad-spectrum agent to control nematodes, was developed. That discovery was followed by the development of other broad-spectrum anthelmintics such as thiabendazole and other benzimidazoles (including cambendazole, mebendazole, fenbendazole, oxbendazole and albendazole), tetramisole, levamisole, pyrantel and morantel as well as other anthelmintics having a selective activity against trematodes (oxylzanide, rafoxanide, nitroxylin and closantel) and cestodes (niclosamide and praziquantel). Also at that time (1942), D.D.T., the first of the chlorinated hydrocarbons was introduced in the USA as an insecticide. Its development led to several other chlorinated hydrocarbons, to organophosphates, to carbamates and, most recently, to the pyrethroids. After 40 years of continuous and intense work in this area, ivermectin, a new product having both endo- and ectoparasitic activity was developed.

With the advent of phenothiazine and D.D.T., veterinary antiparasitic therapy came into its own. The development of these and other products established the concept of team work between the chemist, the parasitologist and the clinician. This concept has been quite successful, as judged by the number of effective antiparasitic drugs that have been developed, registered, and marketed, world-wide, during the span, of 40 years.

In the process of developing new anthelmintics and ectoparasitocides, it is necessary to consider the more common helminths and ectoparasites that affect the health and the welfare of domestic animals (sheep, goats, cattle, swine, horses, dogs, and cats). In addition, for each of these parasites, it is necessary to determine its pathogenicity, geographic occurrence, and epidemiology as well as its economic importance to the target animal industry in a given country or region.

The search for new drugs with anthelmintic or ectoparasitic activity is conducted by several pharmaceutical companies in primary screening using experimental infections in laboratory animals as well as *in vitro* tests. The next step in the development of an anthelmintic or an ectoparasiticide is the testing or compound(s) shown in the preliminary screening to have antiparasitic activity in

target animals. Today, the controlled test, which was first described by Moskey and Harwood in 1941 and later reviewed by Gibson (1965) is the most universally accepted test for the evaluation of new, promising anthelmintics in target animals.

A battery of efficacy tests including dose-range-finding trials, tritration trials, dose-confirmation trials, clinical field trials, productivity/epidemiology trials, persistence of activity and trials for efficacy against resistant parasites are conducted to develop an antiparasitic agent.

During the past five years, five sets of guidelines (4 in the USA for cattle, swine, horses, have been issued. The USA guidelines provide an indication of how to develop data to support claims of effectiveness and "they are adaptable to different circumstances" as indicated. Companies sponsoring new anthelmintics confer with appropriate personnel of the Centre of Veterinary Medicine of the Food and Drug Administration prior to undertaking their studies.

The international guidelines were published in 1982 under the aegis of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Their goal was "to develop uniform standards and registration requirements to expedite the testing and approval of effective products with a minimum of labor, money and experimental animal without sacrificing scientific validity. Achievement of such a goal would mean that data from investigators in one country could be used in registering drugs in another country".

Currently, the registration authorities of many countries demand that a series of efficacy trials with new anthelmintics be conducted locally before registration of a product may be granted. Conducting all those trials is an onerous task for the sponsoring company; in many instances it is merely a duplication of similar trials already conducted in other countries. Unfortunately, the guidelines for efficacy evaluation of anthelmintics issued by the WAAVP have not yet been adopted by the registration authorities of any country.

To date, no international guidelines have been issued for the efficacy evaluation of ectoparasiticides for livestock.

It is hoped in the not too distant future the registration authorities of different countries will agree upon a set of regulations to govern the efficacy evaluation of new antiparasitic agents for livestock. This accord would be of benefit not only to the sponsoring companies but, in the long run, to the livestock producers since there would be more opportunities and more incentives to continue and to accelerate the research for new, effective and safe antiparasitic agents for livestock.

GUIDELINES FOR EVALUATING THE EFFICACY OF ANTHELMINTICS IN ANIMALS

L.M. Crawford

U.S. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, Washington, D.C.

The World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) has developed guidelines for the evaluation of the efficacy of ruminant anthelmintics. These were finalized in 1981 and are, by now, in general distribution. The purpose of developing these guidelines was to achieve international consensus and thereby develop uniform testing standards and registration requirements. World harmony in this area will facilitate multinational registration and, ultimately result in an expanded and improved armamentarius of anthelmintics. The Center for Veterinary Medicine, U.S. Food and Drug Administration, ascribes to these guidelines and encourages adoption by other nations.

We also congratulates WAAVP on the foresight and diligence required to complete this remarkable achievement. Today, there are many organizations all too eager to offer criticism of regulatory requirements and few indeed that offer solutions. The solution of WAAVP is refreshing; your pursuing the conclusion to an obvious end-point is commendable. The crafting of the ruminant guidelines by so eminent and international committee of parasitologists has, to a certain degree, enhanced veterinary medicine in general and helminthology in particular.

We must all of us now strive adoption of these guidelines by the national drug registration authorities of the world community. Adoption by the US FDA has been an important first step. Adoption by similar bodies in the remainder of the world may be slow without advocacy by WAAVP and by your individual members in their own countries. I hope you will allow me to encourage that activity in the strongest terms. Adoption by the World Veterinary Congress in 1983 has advanced this course greatly.

Let me take this opportunity to challenge you further. It is my hope that will undertake to establish guidelines for the other species of domestic animals. I must mention the horse, the pig, the dog, the cat, and fowl.

With each set of guidelines bearing the imprimatur of WAAVP, I pledge my personal support in seeking U.S. approval and, having achieved that, my personal advocacy in the securing of worldwide endorsement. Your worldwide professional expertise is required in order to accomplish this difficult task. It cannot be done without you and it seems to me you can afford to do no less.

The guidelines, as these become adopted by the various nations, will greatly facilitate the multi-national approval of anthelmintics not only making the marketing of these products more profitable, but, more importantly, making them more immediately available to a larger proportion of the world community with the end results being a slightly more prosperous economy, a world slightly less hungry, and a marketing more healthy animal population.

In thanking you in advance for your advocacy of the ruminant guidelines, and for the development of guidelines for other species, I take no small note that this is the 50th Anniversary of the Istituto Superiore di Sanità and the 25th Anniversary of the Società Italiana di Parassitologia. Congratulazioni.

RELAZIONE CONCLUSIVA

L. Bellani

Direzione Generale dei Servizi Veterinari, Ministero della Sanità

A conclusione della Tavola Rotonda, ove la trattazione del tema generale è stata affrontata dai diversi relatori negli aspetti più particolari, relativamente all'impiego dei farmaci, efficacia, sperimentazione farmacodinamica e farmacocinetica, tossicità diretta ed indiretta, è necessario chiedersi quali ripercussioni si hanno nell'animale e nell'uomo.

Come è ben noto, le parassitosi, raramente e solo in caso di infestazioni massive, si manifestano con una sintomatologia clinica conclamata, ma più spesso come epifenomeno di minor produttività in relazione all'ambiente, all'alimentazione, ed al corredo genetico, cioè come espressione di alterato stato di "salute".

Numerosi sono gli studi sull'incidenza delle parassitosi nelle diverse specie animali e dei danni economici da esse prodotte, specialmente negli allevamenti intensivi, tanto da poter fare una esatta valutazione delle perdite in assenza di un programma di intervento specifico e valutare i relativi indici di costo/beneficio.

Si conosce tutto o quasi tutto sul meccanismo d'azione della Fasciola epatica, la sua azione traumatica, spoliatrice tossica a livello intestinale, dell'organo bersaglio, i cui effetti si ripercuotono sull'intero organismo, nonché delle perdite provocate, dovute a:

- ridotta produzione latte, che può essere del 20-40% in meno a seconda del grado d'infestazione;
- sequestro e distruzione degli organi parassitari e meno frequentemente delle carcasse idroemiche o cachettiche;
- indice di conversione diminuito;
- non idoneità dei prodotti di origine animale per le alterazioni indotte dai parassiti o per la presenza dei residui di sostanze medicamentose;
- malattie dovute a patogeni d'irruzione secondaria e/o carenziali senza tener conto del costo degli interventi veterinari (farmaci, maggior richiesta di ore lavorative).

Se da un lato i pascoli intensivi favoriscono le parassitosi il cui controllo non è sempre di facile esecuzione, negli allevamenti ad elevata densità, specialmente per il pollame, le coccidiosi sono un'evenienza tutt'altro che remota tanto da far accettare un concetto che "un pollo industriale è un pollo con coccidi", nonostante l'impiego di numerosi presidi profilattici e terapeutici disponibili sul mercato.

Ma per combattere queste malattie è irrazionale ricorrere solamente a trattamenti farmacologici, come troppo spesso gli allevatori hanno fin'ora fatto, quando errori di conduzione e cattiva igiene ambientale non vengono sanati.

E' pur vero che, oggi, è inconcepibile allevare intensivamente broilers senza una valida protezione farmacologica, mediante somministrazione continuata con gli alimenti di coccidiostatico, il risvolto della medaglia è rappresentato

dall'obbligo del rispetto di canoni di sicurezza a tutela della zoosalute e della sanità pubblica, per cui l'anticoccidico ideale dovrebbe rispondere ai seguenti requisiti:

- a) vasto spettro d'azione;
- b) innocuità per le specie destinatarie o comunque ampio margine di sicurezza nel caso di errori di miscelazione;
- c) rapida metabolizzazione che non dia residui nei prodotti di origine animale.

Ma l'efficacia contro più specie coccidiche spesso contrasta con gli altri requisiti, abbassando notevolmente l'indice terapeutico e/o allungando l'attività del farmaco e la sua eliminazione.

Ma nonostante il rispetto delle misure igieniche e la somministrazione continuata dei coccidiostatici, insuccessi della chemioprevenzione non mancano e sono riconducibili, di regola, alla comparsa di stipiti resistenti evibile anche sotto consumo di alimento medicato con conseguente introito ridotto del farmaco.

Infatti, i primi coccidiostatici impiegati nel trattamento della malattia sono stati i sulfamidici, in seguito abbandonati e sostituiti, in un continuo crescendo con nuove molecole per far fronte alla progressiva formazione di popolazioni coccidi-farmaco-resistenti. Resistenza che poteva essere assoluta, per cui l'efficacia era nulla o relativa con necessario aumento dei dosaggi di impiego per ottenere l'effetto voluto.

Il problema della resistenza è senz'altro di indubbia attualità e le soluzioni proposte di "programmi a rotazione o a staffetta" che possono essere soddisfacenti dal punto di vista pratico non risolvono gli inconvenienti legati ad un loro irrazionale impiego, da parte di allevatori, che non correttamente informati sulle caratteristiche farmacologiche dei coccidiostatici, favoriti da una normativa comunitaria, che li ha inclusi nella Direttiva delle sostanze auxiniche piuttosto che medicamentosi, trasgrediscono all'obbligo del rispetto dei dosaggi, tempi di sospensione, ecc.

Si è parlato di controllo non farmacologiche delle parassitosi, questi meritano senz'altro un approfondimento ma è necessario tener conto delle realtà in cui devono essere applicati.

Le tecniche della prevenzione delle infestazioni nei pascoli degli animali recettivi, consistono nell'impedire una massiva contaminazione ambientale, ricorrendo ad una alternanza delle specie o categorie animali allevati o con la messa a riposo dei pascoli suddetti per una durata di tempo non inferiore a quella necessaria per ottenere una completa devitalizzazione delle uova e larve.

Ma la rotazione dei pascoli, nella pratica, è spesso inattuabile a causa della limitatezza delle aree destinate agli allevamenti estensivi, ed alla carenza foraggera, accompagnata da una elevata resistenza delle uova e delle larve (tipici esempi sono rappresentati dalle uova di echinococco e del dicrocelium in grado di resistere da un anno all'altro).

Il ricorso a farmaci antiparassitari ed antiprotozoari, altro non fa che alimentare il rischio, connesso all'impiego di dette sostanze per il consumatore, e tanto più elevato è il rischio maggiore controlli devono essere attuati ed il costo di questi è direttamente proporzionale al numero delle sostanze impiegate ed al numero degli animali potenzialmente trattati per cui in teoria sarebbe auspicabile l'impiego di sostanze efficaci e nel contempo innocue, così il costo dei controlli verrebbe azzerato.

Considerato che il criterio ispiratore di tutta la legislazione nazionale e comunitarie è la tutela della sanità animale in funzione dell'ottenimento di produzione zootecniche ottimali dal punto di vista qualitativo ed esenti da residui di sostanze ad effetto medicamentoso o addittivante pericolosi per i consumatori si impone la predisposizione di idonei sistemi organizzativi di controllo sia degli alimenti per gli animali che dei prodotti da essi provenienti.

E' necessario quindi la sicurezza dell'impiego dei coccidiostatici, antelmintici, ecc. sia finalizzata al raggiungimento dell'obiettivo di un

residuo "zero", inteso come entità/concetto analitico, nei tessuti edibili (carne, uova, latte) ovvero residui "tollerati" o "tollerabili".

Ma l'accertamento del rispetto delle condizioni di sicurezza si posa sulla verifica del conseguimento dello "zero" analitico, o delle "residuo tollerato o tollerabile" mediante la messa in atto di metodologie analitiche che devono avere come requisito fondamentale, oltre l'elevata sensibilità, la facile applicabilità, la rapidità di esecuzione ed il basso costo condizioni che permetterebbero di avere un metro di valutazione comune per i laboratori preposti al controllo dei mangimi e dei prodotti di origine animale.

Rispetto ai metodi di analisi utilizzati per gli antibiotici, basati sulla capacità inibente nei confronti di organismi sensibili, i metodi di analisi dei coccidiostatici e degli antiparassitari, in genere, sono più specifici in quanto il loro riconoscimento e dosaggio viene fatto chimicamente.

Ma il problema dell'ufficializzazione dei metodi di analisi, quegli stessi che vengono presentati dalle industrie farmaceutiche al momento della richiesta di inclusione nelle liste "positive" delle sostanze ammesse per essere addittivate nei mangimi per fini auxinici o terapeutici è di pressante attualità in quanto si tratta di molecole di largo impiego e con caratteristiche tossicologiche particolari.

Infatti, tanto per citare un esempio, su 19 principi attivi inclusi negli allegati della direttiva 70/524 CEE -parte coccidiostatici ed altre sostanze medicamentose, solamente per cinque di esse esiste un metodo ufficiale di analisi (DOT, Amprolium, etopabato, nicarbazina e monensin). Quindi è necessario a livello nazionale colmare questa lacuna come primo atto per un intervento in campo comunitario, tenuto conto che il nostro Paese può considerarsi all'avanguardia, tra i Paesi CEE nell'attività normativa del settore specifico, a tutela della salute pubblica e degli animali stessi.

La disciplina giuridica nazionale della produzione e del commercio dei medicinali veterinari, contemplata nel T.U. delle leggi sanitarie (R.D. 27/7/1934 n. 1265) nonché in normative di applicazioni già esistenti (R.D. 3/3/1927 n. 478) con cui è stato approvato il Regolamento per la produzione e commercio di specialità medicinali valido anche per il settore veterinario; la legge 15/2/1963 n. 281, modificata dalla legge 8/3/68 n. 399 sulla disciplina e commercio di mangimi e relativi decreti ministeriali di applicazione; la legge 30/4/1962 n. 283 sulla disciplina igienica della produzione e vendita delle sostanze alimentari e bevande, sono indicative dell'importanza attribuite alla tutela della sanità pubblica.

Normative nazionale che ha avuto riscontro anche nelle direttive CEE, nelle quali sono stati accettati i principi ispiratori sanciti dal legislatore italiano.

In ambito comunitario la prima direttiva che ha inteso armonizzare le varie legislazioni degli Stati membri, al fine di favorire il libero scambio di animali e prodotti è quella relativa all'impiego degli additivi in alimentazione animale è del 1970 (Direttiva 70/524 CEE) a cui ha fatto seguito nel 1981 la Direttiva 81/851 CEE applicabile ai medicinali veterinari, specialità medicinali e premiscele per alimenti medicamentosi nonché la Direttiva 81/852 che codifica norme e protocolli analitici, tossico, farmacologici e clinici per la richiesta di autorizzazione all'immissione in commercio dei medicinali veterinari, si rifanno a quanto già sancito con la legge 281/63.

I criteri che sono stati presi in considerazione nella predisposizione della lista positiva in campo nazionali e proposti alla CEE per la scelta dei principi attivi destinati alla chemiopprofilassi o terapia di alcune malattie di animali da reddito possono essere così schematizzati:

- 1) efficacia;
- 2) innocuità;
- 3) determinabilità dei residui;
- 4) rischio assente o bassissimo per l'uomo;
- 5) scarsa assorbibilità;
- 6) rapido metabolismo;

7) mancanza di alternative terapeutiche o di prevenzione.

Per quanto riguarda l'efficacia delle molecole impiegate è implicito il concetto che devono offrire garanzie di utilità per gli scopi per i quali si preconizza l'uso ma ad esso, ed in maniera indissolubile, deve considerarsi il fattore innocuità nei confronti dell'animale stesso, di diretto riscontro, sia breve, medio o lungo termine nonchè per l'ambiente e per l'uomo.

Per cui, ogni prodotto farmacologico deve manifestare la propria utile efficacia senza dare alcun effetto negativo sull'animale, caratteristica che è tanto valida quanto più ampio è il rapporto dose efficace/dose tossica per garantire il pratico impiego dei prodotti nelle condizioni di uso in campo, che sono ben lungi da quelle sperimentate in laboratorio.

Nell'iter autorizzativo sia per i coccidiostatici sia per tutte le altre sostanze ad effetto medicamentoso, compresi gli antiparassitari, devono essere presi in considerazione oltre le prove effettuate nell'ambito della tossicologia acuta, subacuta e cronica, anche i tests di mutagenesi, cancerogenesi e cocancerogenesi, nonchè prove di embrio e fetotossicità.

Quindi, il problema dell'efficacia e della sicurezza deve essere ben chiaro nelle autorizzazioni dei farmaci, la teoria del loro impiego non è assoluta, e quando è possibile ottenendo gli stessi risultati, è necessario ricorrere ad altre pratiche.

Ciascuno è chiamato ad assumersi le proprie responsabilità; la soluzione del problema ha degli aspetti morali. Nel senso che l'interesse sanitario della comunità sta al di sopra degli interessi economici.

TAVOLA ROTONDA

**RECENTI STUDI SULLA BIOLOGIA DEI FLEBOTOMI E LORO RUOLO VETTORE
NELLA TRASMISSIONE DI AGENTI PATOGENI**

I POZZI COME POSSIBILI FOCOLAI LARVALI DI FLEBOTOMI NELL'ISOLA DI ZANTE (GRECIA)

E. Biocca & R. Costantini

Istituto di Parassitologia (Fac. Med. e Chir.), Università "La Sapienza", Roma

Summary (The wells as possible sandflies breeding places in the island of Zante-Greece). - In June 1983 sandflies were collected in 16 different places in the island of Zante. The 1.467 specimens were identified as follow: Phlebotomus tobbi 640 ♂♂, Phlebotomus perfiliewi 614 ♂♂, Phlebotomus major 25 ♂♂, Phlebotomus sergenti 6 ♂♂, Sergentomyia sp. 182 ♂♂. The presence of sandflies was observed inside many wells whose internal surfaces were lined piled up stones. In one of the wells in Mousaki, where a case of canine leishmaniosis had previously been reported, sandflies were collected in four consecutive days. Three species of genus Phlebotomus were identified as follows: Phlebotomus tobbi, Phlebotomus perfiliewi, Phlebotomus major. The number of sandflies was particularly high, P. Major was the only species showing few specimens. Prevalence of P. tobbi over P. perfiliewi was observed on the first day, while on the following days the situation changed; beside, males appeared more numerous than females. In October 1984 sandflies were collected inside the same well in three successive days; it could be noted, as above, the prevalence of males over females and a scanty presence of P. major; the specimens of P. tobbi were more consistent in number than P. perfiliewi.

Durante una spedizione compiuta nell'isola di Zante nel giugno 1983 da E. Biocca, R. Costantini, M. Bagalino, M. Ortis con la collaborazione di A. Garifallou per studiare la distribuzione delle specie di flebotomi, sono state effettuate catture in sedici località. Sono stati identificati 1.467 maschi riferibili alle seguenti specie: Phlebotomus tobbi 640 ♂♂, Phlebotomus perfiliewi 614 ♂♂, Phlebotomus major 25 ♂♂, Phlebotomus sergenti 6 ♂♂, Sergentomyia sp. 182 ♂♂. Durante la settimana di permanenza a Zante, è stato possibile fare alcune osservazioni sugli habitat di tali insetti. E' stata infatti notata la presenza di flebotomi in numerosi pozzi dalle pareti di pietre sovrapposte. In particolare, uno di tali pozzi situato in località Mousaki, dove era stato segnalato un caso di leishmaniasi canina, sono state fatte catture ripetute in quattro giorni successivi; le specie rinvenute e identificate sulla base dei maschi, tralasciando quelle appartenenti al genere Sergentomyia, sono state tre e precisamente: Phlebotomus tobbi, Phlebotomus perfiliewi, Phlebotomus major.

Tabella 1. - Flebotomi catturati in località Mousaki (pozzo n. 1). Giugno 1983.

Data	<u>P. tobbi</u>	<u>P. perfiliewi</u>	<u>P. major</u>	Totale
10-06-83	142	70	1	213
12-06-83	83	124	1	208
13-06-83	76	91	1	168
14-06-83		17		17
Totale	301	302	3	606

Come si può notare dalla tabella, il numero dei flebotomi è stato in genere particolarmente elevato, la sola specie presente con pochi esemplari è stata P. major. Per quanto riguarda le altre due specie, il primo giorno è stata osservata una netta prevalenza di P. tobbi su P. perfiliewi, mentre la situazione si è capovolta nei giorni successivi; inoltre è stata sempre osservata una prevalenza di maschi sulle femmine.

Tabella 2. - Flebotomi catturati in località Mousaki (pozzo n. 1) Ottobre 1984.

Data	<u>P. tobbi</u>	<u>P. perfiliewi</u>	<u>P. major</u>	Totale
5-10-84	94	36	3	133
6-10-84	48	18	4	70
7-10-84	7	2		9
Totale	149	56	7	212

Catture effettuate nello stesso pozzo in tre giorni successivi nell'ottobre 1984 (Tab. 2) hanno confermato il maggior numero dei maschi rispetto alle femmine e la scarsa presenza di P. major; P. tobbi è risultato sempre preponderante su P. perfiliewi. Va infine notata la presenza dei flebotomi, in numero significativo anche se minore rispetto a giugno, in tale habitat nel mese di ottobre.

PHLEBOTOMUS ARIASI TONNOIR, 1921: INTÉRÊT ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES APPROACHES
ÉCOPHYSIOLOGIQUE, ÉTHOLOGIQUE ET CHOROLOGIQUE

J.A. Rioux

Laboratoire d'Écologie médicale et Pathologie parasitaire, Faculté de Médecine,
Montpellier, France

(Testo non pervenuto)

OSSERVAZIONI SULLA BIOLOGIA DI UNA COLONIA DI PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS (DIPTERA, PSYCHODIDAE)

M. Maroli

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Una colonia di Phlebotomus perniciosus (Diptera, Psychodidae) è stata allestita nel 1981 per poter disporre in laboratorio di femmine della specie da utilizzare in studi di trasmissione sperimentale di Leishmania sp. e di infezione con Phlebovirus. Nella presente relazione sono riportate alcune osservazioni preliminari riguardanti la durata del ciclo di sviluppo e la produttività delle colonie durante le prime 12 generazioni. Vengono presi in considerazione anche il secondo pasto di sangue in condizioni di laboratorio ed il comportamento delle femmine della specie nell'assunzione del pasto di sangue.

Summary. - A closed laboratory colony of the sand fly Phlebotomus perniciosus from central Italy was established in the Parasitology Department of the Istituto Superiore di Sanità, Rome, where 28 consecutive generations have been obtained. In the present paper results on the development times of the species in laboratory conditions are reported. Preliminary observations on the productivity of the first 12 generations, on multiple feeding, on oviposition survival, and on feeding behaviour of larvae and adults are also described.

Introduzione

Phlebotomus perniciosus (Diptera, Psychodidae) ha una larga diffusione in Italia (1,2,3) ed in alcune regioni raggiunge alte densità. La femmina di questa specie si nutre su diversi vertebrati a sangue caldo ivi incluso l'uomo (4,5). La specie è vettore di leishmaniosi umana e canina e può avere lo stesso ruolo nella trasmissione della malattia in un probabile reservoir selvatico come Rattus rattus (6). Inoltre da P. perniciosus sono stati isolati tre ceppi dello stesso virus (ISS Phl 3) il cui prototipo è stato dimostrato appartenere allo stesso serogruppo che provoca la febbre da pappataci.

Una colonia di P. perniciosus è stata da noi allestita nel 1981 con femmine raccolte in una zona del centro Italia con lo scopo di poter disporre di femmine adulte per esperimenti di trasmissione con Leishmania sp. e Phlebovirus. Nella presente relazione vengono riportati i risultati preliminari relativi alle prime 12 generazioni riguardanti la durata del ciclo di sviluppo e la produttività della colonia.

I dati definitivi verranno discussi in un lavoro più esteso in via di stesura.

Materiali e Metodi

La colonia di P. perniciosus è stata iniziata con femmine ingorgate raccolte in una stalla di Porto Ercole, durante il mese di luglio 1981. Delle 90 femmine gravide, 59 (65%) hanno deposto un totale di 2.030 uova. I metodi per

l'allevamento e il mantenimento della colonia di flebotomi sono stati precedentemente descritti (7). I dati raccolti durante le prime 12 generazioni sono stati ottenuti mantenendo la colonia in ovodeposizione singola. Dalla 13a fino a quella attuale (28a generazione), la colonia è stata mantenuta in allevamento di massa.

CONSIDERAZIONI SULLA PRODUZIONE DELLA COLONIA.

Un totale di 1.772 femmine, durante le prime 12 generazioni ha deposto 83.410 uova. La percentuale di femmine gravide che ha ovodeposto era compresa fra una minima del 30%, riscontrata nella 3a generazione, ed una massima del 79%, ottenuta nella generazione undicesima. Il numero medio di uova deposte per femmina è stato compreso tra un minimo di 34 uova nelle femmine raccolte in natura ed un massimo di 56, ottenuto nella quinta generazione. Comunque, il massimo numero di uova deposto da una femmina è stato 85; per quanto riguarda il numero minimo di uova che una femmina di P. perniciosus ha deposto non si può fare nessuna considerazione in quanto, in condizioni di laboratorio, una buona percentuale di femmine muore senza aver finito di deporre le uova maturate.

La percentuale di adulti ottenuta dalle uova raccolte è variato tra il 10% ed il 47% durante le 12 generazioni. Molti fattori possono aver influito sulla bassa resa delle uova osservata in alcune generazioni: per primo l'inquinamento dei vasi di allevamento da parte di muffe che se non tossiche per le larve, sono di impedimento per la mobilità delle larve che restano imprigionate nelle ife dei funghi. In secondo luogo, la mortalità larvale, soprattutto nei primi stadi, che si verifica spesso senza nessuna causa apparente. Il primo stadio larvale è particolarmente delicato; difatti, teme l'essiccamento e le forti umidità possono provocare condensa di piccole gocce d'acqua dove le larve rimangono imprigionate. In terzo luogo, una certa percentuale di uova non è schiusa in quanto, o potrebbe non essere stata fecondata o essersi essiccata per scarsa umidità dei vasi di allevamento. Va comunque sottolineato che il numero di adulti prodotto (rapporto sesso 1:1) è stato sempre elevato rispetto a quello necessario per il mantenimento della colonia ed è stato quindi possibile condurre con gli adulti della specie numerose prove sperimentali con il parassita Leishmania e con alcuni Phlebovirus.

DURATA DEL CICLO DI SVILUPPO OSSERVATA DURANTE LE GENERAZIONI DI LABORATORIO DI P. PERNICIOSUS.

Il tempo medio del ciclo di sviluppo, calcolato dalla data del pasto di sangue a quella dello sfarfallamento degli adulti della successiva generazione è stato di 42 giorni, con un minimo di 39 ed un massimo di 45 giorni. La fase che può influire maggiormente la durata del ciclo di sviluppo è quella della preovodeposizione. Infatti si sono avute femmine che hanno deposto dopo appena 4 giorni dal pasto di sangue ed in casi estremi dopo 15 giorni, in media comunque hanno deposto dopo una settimana. Il periodo più lungo riscontrato nell'ovodeposizione potrebbe essere attribuito alla non maturazione degli organi riproduttori allorquando è avvenuto il pasto di sangue; oppure si può pensare che solo dopo tale periodo la femmina ha trovato le condizioni favorevoli per l'ovodeposizione, in particolare il grado di umidità del substrato dove deporre. La durata dello sviluppo larvale (18-22 gg.), e della pupa (7-10 gg.) è stata piuttosto costante durante le 12 generazioni.

Considerando il numero di giorni necessari per un intero ciclo di sviluppo di P. perniciosus da noi osservato, si deduce che si possono avere almeno 8 generazioni all'anno. Ready e Groset (8), allevando un ceppo della stessa specie del Sud della Francia, hanno ottenuto invece 3 generazioni all'anno. Questo differente comportamento in condizioni di laboratorio trova riscontro anche in natura in quanto in Francia risulta che P. perniciosus ha un andamento

monofasico (una generazione all'anno) mentre in Italia sono state descritte almeno due generazioni all'anno.

OSSERVAZIONI PRELIMINARI SUL SECONDO PASTO DI SANGUE DI P. PERNICIOSUS E SUL COMPORTAMENTO DELLE LARVE.

Nella tabella sono riportati i risultati relativi a tre gruppi di esperimenti; in totale hanno effettuato il primo pasto di sangue 421 femmine; di queste il 70,7% ha ovodeposto ed il 34,8% è sopravvissuto all'ovodeposizione. In seguito l'11,5% ha effettuato il secondo pasto di sangue. Purtroppo, è stato necessario dissezionare queste ultime femmine che avevano fatto il secondo pasto di sangue, in quanto gli esperimenti erano relativi alla trasmissione sperimentale di Leishmania sp. e non è quindi possibile sapere se avrebbero effettuato una seconda ovodeposizione. Buescher et al. (9) hanno riportato per Lutzomyia longipalpis, specie del Sud America, percentuali leggermente superiori: l'88,5% ovodepone; il 46,9% sopravvive ed il 3,9% fa una seconda ovodeposizione.

Tabella 1: Sopravvivenza all'ovodeposizione e 2° pasto di sangue in laboratorio di P. perniciosus.

N° femmine	Gruppi			Totale (%)
	1	2	3	
1° pasto di sangue	109	69	243	421 (100%)
Ovodeposizione	93	58	147	298 (70,7%)
Sopravvivenza	27	24	53	104 (34,8%)
2° pasto di sangue	2	2	8	12 (11,5%)

Le larve di P. perniciosus si muovono lentamente sulla superficie del materiale organico usato come cibo e raramente si possono osservare al di sotto di esso. Ciò farebbe pensare che in natura i focolai larvali della specie potrebbero trovarsi sulla superficie di materiale organico. D'altra parte molte larve prima di pupare si spostano alla periferia della massa di cibo, sulle pareti dei vasi di allevamento. Le larve sono voracissime, esse passano il tempo a mangiare. La muta è preceduta quasi sempre dall'evacuazione dei materiali dell'intestino; infatti è possibile riconoscere una larva che si appresta alla muta perchè risulta completamente trasparente, mentre normalmente si può osservare tutto il materiale contenuto nell'intestino.

OSSERVAZIONI SUL COMPORTAMENTO DI P. PERNICIOSUS NELL'ASSUNZIONE DEL PASTO DI SANGUE.

I dati sono relativi al comportamento degli adulti nell'assunzione del sangue sull'hamster, sull'uomo e su un apparato artificiale per nutrire i flebotomi; quest'ultimo descritto da Maroli (10).

L'hamster prima di essere introdotto nella gabbia contenente i flebotomi veniva anestetizzato e rasato sull'addome, in modo da essere facilmente raggiungibile dalla proboscide dei flebotomi. L'introduzione dell'hamster nella gabbia provocava una immediata attività delle femmine; il tempo necessario per completare il pasto di sangue è relativamente breve, 3-5 minuti, ma si sono osservate femmine che hanno impiegato più di 10 minuti. La quantità di sangue ingerita è compresa tra 0,25 e 0,30 mg, che sono pari al peso medio di una femmina adulta. Il peso del sangue ingerito le appesantisce nel volo per cui

esse restano ferme sulle pareti della gabbia. Questo comportamento facilita l'accoppiamento.

Per quanto riguarda le punture sull'uomo con relativo pasto di sangue, le osservazioni sono relative a 21 volontari impiegati nella valutazione dell'efficacia di repellenti chimici contro la specie (11).

Nelle prove condotte, un totale di 1.012 femmine su 1.800 testate si sono nutrite su uomo. La percentuale di femmine che si è nutrita in ogni prova può essere messa in relazione con la classe d'età dei flebotomi; di fatti è stata del 45,2% nella classe 2-4 giorni ed è arrivata a quasi il 70% nella classe maggiore di 10 giorni. Un'altra osservazione che è stata possibile condurre è che il "pre-biting period", cioè il periodo necessario perchè una femmina di P. perniciosus risponda agli stimoli forniti dall'ospite uomo, dipende anche dall'età dei flebotomi. E' stato osservato infatti che entro i primi 10 minuti si nutriva il 58,8% delle femmine di 2-4 giorni, mentre la percentuale arriva all'88,3% quando i flebotomi avevano più di 10 giorni.

Da queste osservazioni si deduce che la "biting pressure" di P. perniciosus aumenta con l'età e che, dopo una settimana circa dallo sfarfallamento, più della metà delle femmine si nutre entro i dieci minuti da quando è in presenza dell'ospite. Inoltre si potrebbe pensare che entro la prima settimana dallo sfarfallamento avviene la maturazione degli organi sensoriali preposti alla ricerca ed alla effettuazione del pasto di sangue.

P. perniciosus si nutre facilmente su membrana artificiale e con tale tecnica è stato possibile nutrire 2.600 femmine in diversi esperimenti condotti in prove di trasmissione sperimentali di Laishmania sp. (12) e di Phlebovirus (13).

BIBLIOGRAFIA

1. CORRADETTI, A. 1962. Phlebotomus and leishmaniasis in North-central Italy (Appennine Region). Sci. Repts. Ist. Sup. Sanità, 2: 103-109.
2. BIOCICA, E., COLUZZI, A. & COSTANTINI, R. (1977). Osservazioni sulla attuale distribuzione dei flebotomi italiani e su alcuni caratteri differenziali tra le specie del sottogenere Phlebotomus (Larrousius). Parassitologia, 19: 19-31.
3. MAROLI, M. & BETTINI, S. (1977). Leishmaniasis in Tuscany (Italy) I. An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto province. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 71: 315-321.
4. ADLER, S. "THEODOR, O. (1935). Investigations on Mediterranean Kala Azar. VII. Further observations on mediterranean sandflies. Proc. Roy. Soc. London (B), 116: 505-515.
5. MAROLI, M., GRADONI, L., GRAMICCIA, M. & POZIO, E. (1984). Man-bait catch of Phlebotomus perniciosus (Diptera: Psychodidae) in a human and canine leishmaniasis focus in central Italy. Parassitologia, 26 (in corso di stampa).
6. GRADONI, L., POZIO, E., GRAMICCIA, M., MAROLI, M. & BETTINI, S. 1983. Leishmaniasis in Tuscany (Italy) VII: Studies on the role of the black rat (Rattus rattus), in the epidemiology of visceral leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 77: 427-431.
7. 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).
8. READY, P.D. & CROSET, H. 1980. Diapause and laboratory breeding of Phlebotomus perniciosus Newstead and Phlebotomus ariasi Tonnoir (Diptera; Psychodidae) from Southern France. Bull. Ent. Res., 70: 511-523.
9. BRUSCHER, M.D., RUTLEDGE, L.C., ROBERTS, J. and NELSON, J.H. 1984. Observation on multiple feeding by Lutzomyia longipalpis in the laboratory (Diptera: Psychodidae). Mosquito News, 44: 76-77.
10. MAROLI, M. 1985. The artificial feeding of laboratory reared palearctic

sandflies (Diptera: Psychodidae) for studies on the transmission of diseases agents. Am. Parasitol. Hum. et Comp. (in corso di stampa).

11. FOSSATI, F.P. & MAROLI, M. 1985. Dati preliminari sull'efficacia di repellenti chimici contro Phlebotomus perniciosus (Diptera; Psychodidae). Atti XIII° Congresso Società Italiana di Parassitologia, Roma 3-5 dicembre 1984.
12. POZIO, E., MAROLI, M., GRADONI, L., GRAMICCIA, M. 1985. Laboratory transmission of Leishmania infantum to Rattus rattus by the bite of experimentally infected Phlebotomus perniciosus. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 79 (in corso di stampa).
13. GIUFOLINI, 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. (in corso di stampa).

GENETIC ISOLATING MECHANISMS BETWEEN DIFFERENT FORMS OF THE SANDFLY LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

R. Ward (a), A. Phillips (b) and B. Burnet (c)

- (a) Department of Medical Entomology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, U.K.
(b) Department of Biology, Salford University, Salford, U.K.
(c) Department of Genetics, Sheffield University, Sheffield, U.K.

Summary

The geographical distribution of Lutzomyia longipalpis and its role as a vector of visceral leishmaniasis in South America are discussed. Morphological variation in the pale spotting of male abdominal tergites is described and linked to reproductive isolation between one and two-spot forms of the fly. Also, differences between the two forms in cuticular papules on the spots are reported and progress in identifying two putative pheromones from the underlying tissue are summarized. Preliminary studies are described which identify characteristic sounds made by the two forms of Lu. longipalpis and which may be linked to assortative mating. Finally, the distributions of the two forms of Lu. longipalpis are compared and it is suggested that the more anthropophilic nature of the two-spot form may be linked to the pattern of kála-azar transmission seen in South America.

Introduction

The sandfly Lutzomyia longipalpis occurs in the Americas from Southern Mexico, 20°N to northern Argentina, 28°S in a discontinuous, patchy distribution (1). Professor G. Gastro (in 2) was of the opinion that it is a species which in the past occupied a wider geographical range and that climatic change reduced its distribution. During the Pleistocene period, the South American climate was drier than at present and Lu. longipalpis may have extended its range at this time leaving isolated populations on the subsequent return of humid conditions. These climatic changes are believed to have influenced the distribution and speciation of other animal groups (3).

Outbreaks of visceral leishmaniasis in the Americas are always found to be associated with the occurrence of Lu. longipalpis, though the distribution of human cases on the American continent is uneven. Over 97% of all recorded cases have occurred in Brazil and of these, 79% are concentrated in the north-eastern and eastern states. Suspicion that

Lu. longipalpis might in fact be 2 species first arose in 1969, when Mangabeira (4) noted that males captured in Pará state north Brazil were morphologically different from those collected in Ceará north east Brazil. Those from Pará were described as bearing a single pair of pale spots on tergal segment 4, whilst those from Ceará had an additional pair on segment 3.

Crossing experiments

Over 10 years after Mangabeira's observations we carried out a series of crossing experiments between colonies of the one and two spot forms of the fly (5). It was found that there was almost complete insemination failure between sympatric populations of the two forms of Lu. longipalpis from Sobral in the north east of Brazil. There was also partial isolation between two allopatric colonies of flies with one pair of pale spots which originated from Marajo island, Pará state and Lapinha cave, Minas Gerais in the south. Following this publication (5), further crosses were carried out using one and two spot forms of Lu. longipalpis from other locations in Brazil. These crosses established that the two spot form is conspecific over at least a range of 700 kms and confirmed that partial reproductive isolation exists between one spot populations separated by over 1000 kms (6).

Micromorphology and Pheromones.

These findings stimulated further interest in the structure of the pale tergal spots on Lu. longipalpis and led to a scanning electron microscope examination of the cuticle (7). The pale spots bear apparently secretory papules but their prominence and number differ in the two forms of the fly. The appearance of the papules and the wing fluttering behaviour of courting male flies, also led us to suspect that we had found a site of pheromone production. This hypothesis was then tested by extracting chemicals from the tissue beneath the spots with hexane and subjecting the extracts to gas chromatography and mass spectroscopy. The Lapinha cave one-spot fly extract was found to have a molecular structure of $C_{16}H_{24}$ resembling Farnasene and Homofarnasene which act as trail pheromones in some ants. In contrast the Morada Nova population, a two-spot fly from the North East of Brazil, produces a Diterpenoid-like chemical with the structure $C_{20}H_{32}$ (8).

Courtship songs and assortative mating

The frequent wing fluttering observed in courting and fighting males of Lu. longipalpis suggested that sound production was acting as a means of communication and reproductive isolation, as occurs in many Drosophila species (9). Pairs of flies of the same sex were recorded in an anechoic chamber and it was found that males and females produce sounds by wing vibration which are recognizable as distinct polycyclic pulse songs. The two sympatric populations from Sobral have been examined to date and these appear to have songs which are different for the two forms.

The insemination failure between the two forms acts as a reproductive barrier and in addition the song and pheromone characteristics possibly contribute to assortative mating behaviour. This behaviour has also been studied between the sympatric Sobral flies. In experiments where male two spot flies were given a choice between one and two-spot females, they

made the correct choice on 99% of occasions (n=46). In contrast, the one-spot males do not appear capable of discrimination (n=47).

Geographic distribution

Finally, the distribution of the two forms has been shown to differ. Captured specimens along with those supplied by colleagues and reference collections in museums were examined. From this work it is apparent that the one-spot form of fly extends from Mexico, through Costa Rica, Venezuela, Colombia, Brazil and Bolivia. In contrast the two-spot form, to the best of our knowledge, is restricted to the north east and east of Brazil (10). During field studies with Dr. A. Morales in Colombia, where the one-spot form is abundant, we noted that during nocturnal studies it was rare to be bitten by Lu. longipalpis. During similar studies in Ceará, however, where the two are sympatric it was common to be bitten by Lu. longipalpis, even inside houses. It is possible therefore, that the abundance of kala-azar cases seen in the north-east of Brazil may be linked to different blood feeding habits of the two forms of Lu. longipalpis.

Further crossing experiments, pheromone and song studies will be required, however, before we understand the full relevance of the observations made so far.

BIBLIOGRAPHY

1. VIANNA MARTINS, A., WILLIAMS, P. & FALCÃO, A.L. 1978. American Sandflies (Diptera:Psychodidae, Phlebotominae), 195 pp Acadêmica Brasileira de Ciências.
2. ADLER, S. 1964. Leishmania. In "Advances in Parasitology" Edit. B. Dawes, 35-96.
3. HAFFER, J. 1969. Speciation in Amazonian birds. Science 165: 13-137.
4. MANGABEIRA, O. 1969. Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. Rev. Bras. Malar. Doenq. trop. 21: 3-26.
5. WARD, R.D., RIBEIRO, A.L., READY, P. & MURTAGH, A. 1983. Reproductive isolation between different forms of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) (Diptera:Psychodidae), the vector of Leishmania donovani chagasi Cunha & Chagas and its significance to kala azar distribution in South America. Mems. Inst. Oswaldo Cruz 78: 269-280.
6. WARD, R.D. 1985. Genetic diversity in Phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae) - A review. Ann. Parasit. Hum. Comp. (in Press).
7. LANE, R.P. & WARD, R.D. 1985. The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector Lutzomyia longipalpis (Diptera:Phlebotominae). Cah. ORSTOM. Ser. Med. Ent. 22: 245-249.
8. LANE, R., PHILLIPS, A., MOLYNEUX, D.H., PROCTER, G. & WARD, R.D. 1985. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of Lutzomyia longipalpis : site of a possible sex pheromone. Ann. Trop. Med. Parasit. 79: 225-229.

9. EWING, A.W. 1977. Communications in Diptera. In "How animals communicate" Edit T.A. Sebeok, Indiana University Press, Bloomington & London.
10. WARD, R.D., RIBEIRO, A.L., RYAN, L., FALÇÃO, A.L. & RANGEL, E.F. 1985. The distribution of two morphological forms of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) (Diptera : Psychodidae). Mems. Inst. Oswaldo Cruz. 80: (in Press).

BIOLOGÍA DE LOS FLEBOTOMOS IBÉRICOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) EN CONDICIONES NATURALES

R. Martínez-Ortega

Departamento de Zoología. Facultad de Biología. Murcia (España-Spain)

Resumen. - Las prospecciones efectuadas en el sureste español han permitido capturar 8 especies de flebotomos, de los que se ha podido conocer su fenología y distribución. Se realiza una síntesis sinecológica y se discuten las implicaciones epidemiológicas de las especies sospechosas de la transmisión de la leishmaniasis.

Summary (Biology of the iberian sandflies (Diptera, Psychodidae) in natural conditions). - Eight species of sandflies have been collected in southeastern Spain, their phenology and distribution are given. A sinecological synthesis is made and the epidemiological role of the leishmaniasis presumptive transmitter species are discussed.

Introducción

La presencia de casos de leishmaniasis humana y canina en la zona sureste de la Península Ibérica justifica la realización de un estudio de los flebotomos de esta región, más exhaustivo que la simple distribución geográfica.

La zona muestreada engloba un buen número de diferentes regiones bioclimáticas que incluyen desde zonas montañosas, relativamente húmedas, hasta otras muy áridas, casi desérticas, de modo que se encuentran representados todos los tipos bioclimáticos del Mediterráneo occidental situados al norte del Sahara. Esta diversidad climática ofrece un gran riqueza de biotopos que implica la posibilidad de encontrar una mayor variedad de especies con una biología particular de estas zonas.

Metodología

Para el estudio de la fauna de flebotomos del sureste español se ha utilizado principalmente, el método de las trampas adhesivas a base de aceite de ricino, que eran renovadas periódicamente. En algunas localidades se ha utilizado, además, la trampa de luz CDC, la captura manual con aspirador de boca y el "cebo humano".

Se han obtenido capturas en 66 localidades repartidas por toda la región muestreada, y los biotopos más habituales han sido fisuras calcáreas, pequeñas cuevas, casas en ruínas...

Según la clasificación bioclimática de Allue Andrade (1), las localidades se distribuyen en tres tipos preferenciales (Fig.1): árido, tórrido siempre seco, desiertos calientes (III); semiarido, cálido con humedad no estival, bosques esclerófilos (IV) y clima de montaña con altitud superior a 1.000 m.,

más frío y húmedo que las regiones bioclimáticas circundantes (X). Aparte existen los tipos de gradación intermedia: III (IV), IV (III) ..., en los que el clima principal se presenta con una influencia de otros tipos bioclimáticos.

Resultados y Discusión

Los muestreos efectuados han permitido capturar 4.217 ejemplares que pertenecen a 8 especies entre las 9 conocidas, actualmente, en la Península Ibérica: Phlebotomus perniciosus (45.37%), P. sergenti (9.30%), P. papatasi (6.02%), P. ariasi (3.27%), P. longicuspis (1.49%), P. chabaudi (0.31%), P. alexandri (0.12%), Sergentomyia minuta (34.12%).

Estos flebotomos han sido capturados en las diferentes localidades de la zona de estudio con una distribución más o menos uniforme, encontrándose especies ampliamente distribuidas (P. perniciosus, S. minuta, P. papatasi, ...) y otras de distribución más restringida (P. chabaudi, P. alexandri, P. longicuspis), la distribución exacta, de cada especie, por localidades se recoge en dos artículos precedentes (2,3).

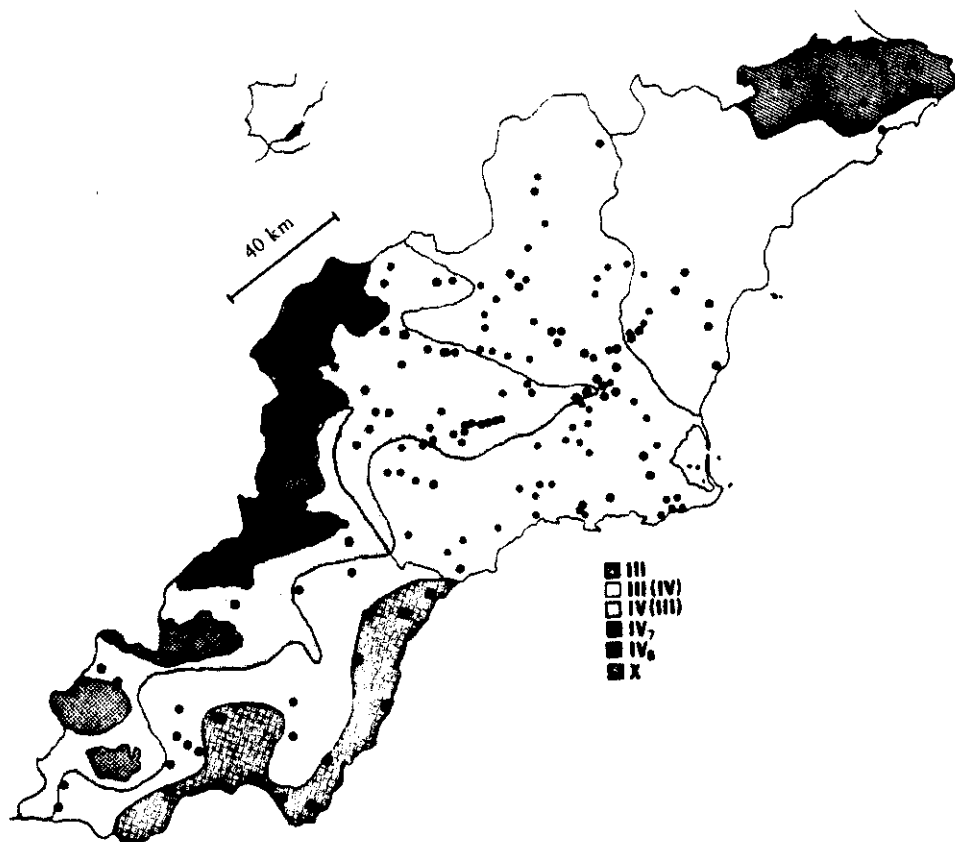


Fig.1. - Localización de los puntos de muestreo y delimitación de las regiones bioclimáticas.

Las capturas periódicas en diferentes puntos de muestreo permiten obtener los datos necesarios para efectuar el seguimiento de la evolución fenológica de algunas de las especies encontradas, así como la fluctuación en el porcentaje de machos, que es un buen indicador de la sucesión de generaciones, ya que en los flebotomos, los machos emergen antes que las hembras y mueren también antes

que ellas (4).

Sergentomyia minuta presenta una fenología de tipo difásico con dos generaciones con un aumento en el porcentaje de machos, esta parece ser la fenología habitual de esta especie al sur de su área de distribución (5).

Los adultos de Phlebotomus papatasi comienzan a mostrar actividad sobre el mes de mayo (Fig.2) manteniéndose en niveles bajos de población hasta el mes de julio, esta época coincide con una disminución progresiva del porcentaje de machos, lo cual indica que la primera generación va envejeciendo, esta generación no se corresponde con un elevado número de individuos en un periodo corto de tiempo, sino que la emergencia imaginal se realiza de un modo progresivo durante tres meses. Posteriormente hay una segunda generación con un máximo importante en el mes de agosto coincidente con un aumento en el porcentaje de machos capturados.

P. sergenti presenta una fenología de tipo difásico (Fig.3) con dos generaciones casi continuas separadas por una ligera disminución de la población en el mes de julio que coincide con una disminución del porcentaje de machos.

P. ariasi mantiene la actividad imaginal durante todo el año y presenta dos máximos (Fig.4) separados por un largo periodo. Los aumentos de población coinciden con un aumento del porcentaje de machos, lo cual indica la existencia real de dos generaciones. El desplazamiento de los máximos generacionales hacia las épocas de primavera y otoño se debe a que los óptimos de P. ariasi se encuentran en zona húmedas y subhúmedas, por lo que en zonas más cálidas se ve desplazado a las épocas más frías y frescas que le son más propicias.

P. longicuspis presenta una fenología de tipo difásico (Fig.4) y su actividad se centra en la época estival.

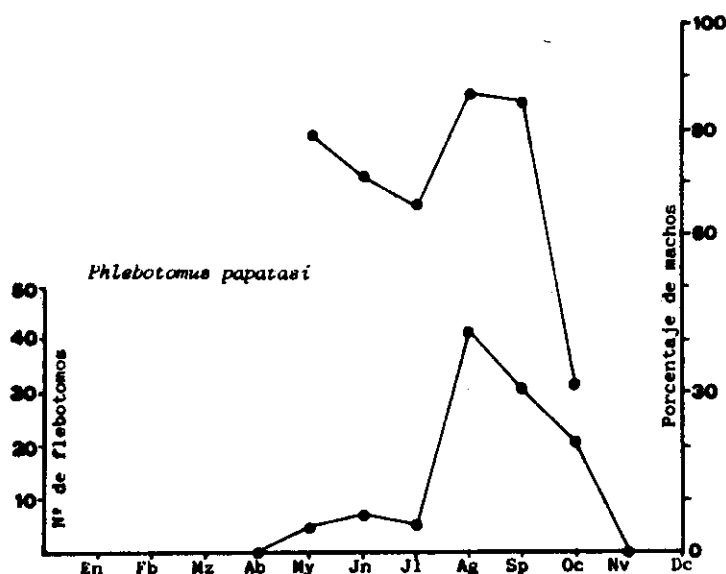


Fig.2. - Fenología de Phlebotomus papatasi (Scopoli, 1786).

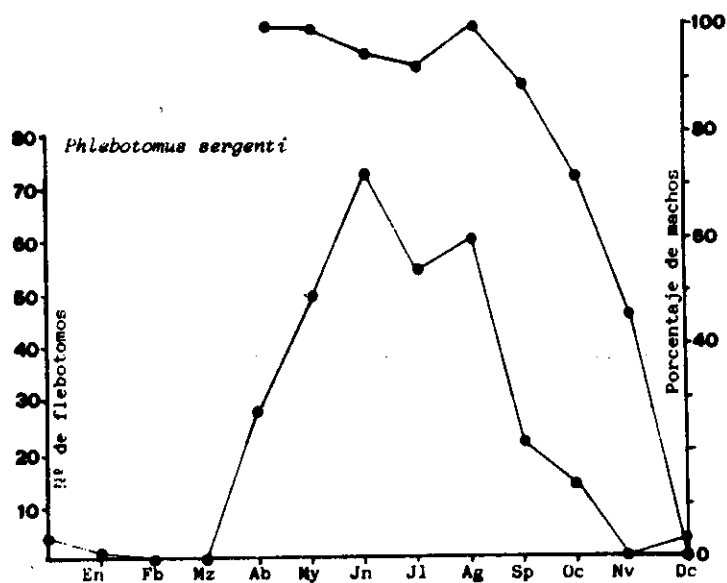


Fig.3. - Fenología de P. sergenti Parrot, 1917.

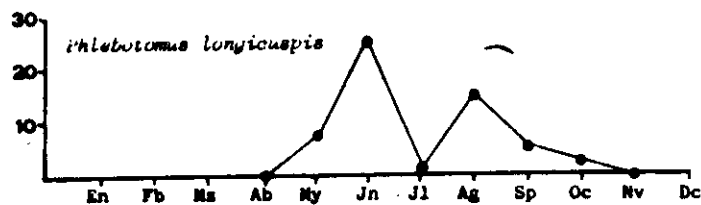
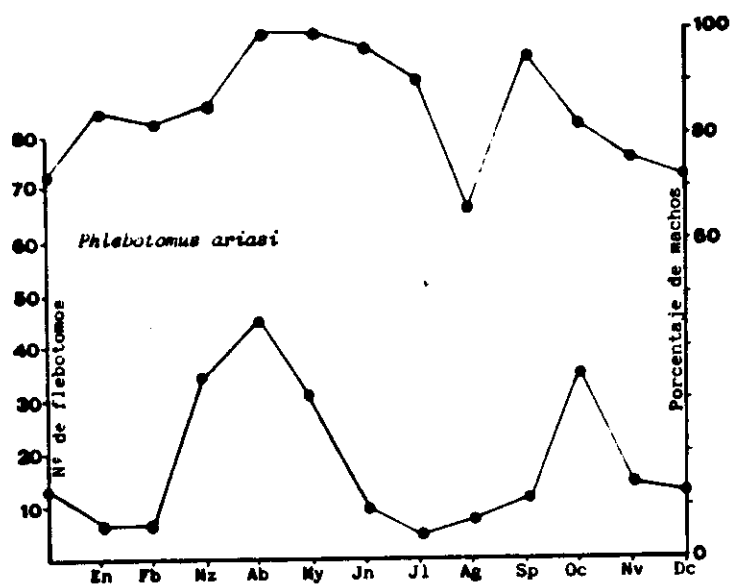


Fig.4. - Fenología de P. ariasi Tonnoir, 1921 y P. longicuspis Nitzulescu, 1930.

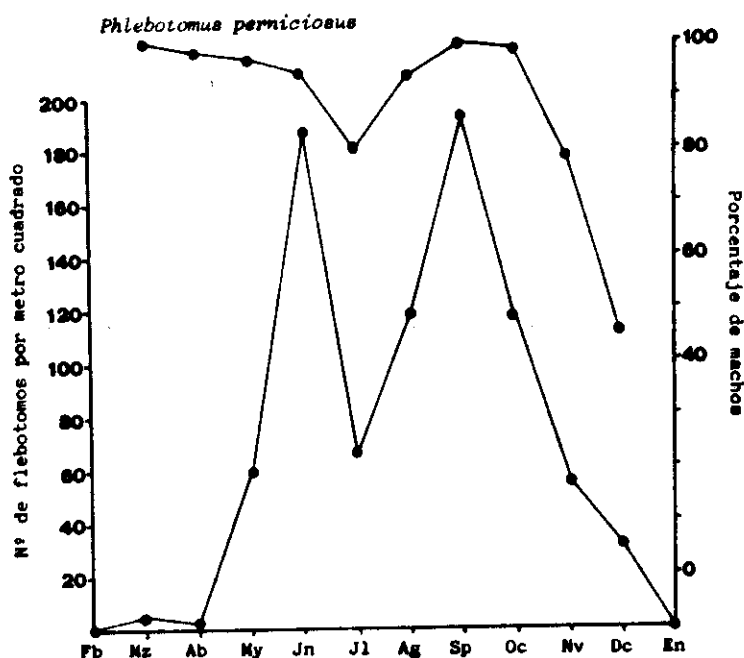


Fig.5. - Fenología de P. perniciosus Newstead, 1911.

La fenología de P. perniciosus, en la zona prospectada, es claramente de tipo difásico (Fig.5) con dos máximos en junio y septiembre, separados por un periodo que coincide con una disminución en el porcentaje de machos, como consecuencia de un envejecimiento progresivo de la primera generación.

Síntesis Sinecológica

En el área estudiada se observa una mayor abundancia de P. perniciosus que es la especie preponderante. Esta especie alcanza sus óptimos de población en las zonas semiáridas donde se dan la mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea. Se encuentra preferentemente relacionada con P. ariasi y S. minuta formando el grupo EUROMEDITERRÁNEO que constituye el 81.76 % del total de los flebotomos capturados. P. ariasi se encuentra en las zonas más frescas y frías y alcanza las zonas de montaña, se ha capturado a 2150 m. de altitud, lo cual supone la cota más elevada de captura de flebotomos en la Península Ibérica.

El grupo MESÓGENO (P. sergenti, P. alexandri y P. papatasi) se encuentra preferentemente en zonas áridas y constituye el 15.54 % del total de las capturas. P. alexandri presenta sus óptimos de población en las zonas más áridas de la región (zona III), alcanzando los límites de la zona templada. El grupo EUMEDITERRÁNEO (P. longicuspis y P. chabaudi) representa el 1.80 % del total de las capturas y se encuentra preferentemente en las zonas semiáridas mediterráneas.

En los grupos Eumediterráneo y Euromediterráneo hay un descenso gradual de la proporción de individuos de las zonas menos áridas (Fig.1, zona IV) a las zonas más áridas (zona III). El grupo Mesógeno presenta más abundancia en las zonas más áridas y disminuye su proporción en las más húmedas.

Esto es debido a la existencia de zonas bioclimáticas preferenciales de cada grupo de especies, en las cuales se dan los óptimos de población, estas poblaciones van disminuyendo a medida que se alejan de sus zonas preferenciales.

Implicaciones Epidemiológicas

Analizando una zona de leishmaniasis cutánea endémica y a la vista de los resultados obtenidos en la captura de flebotomos, se ha podido observar que P. perniciosus es la especie más abundante y la de mayor, tendencia antropofílica (6). Este hecho unido a su distribución en las zonas endémicas de leishmaniasis cutánea parece relacionar a P. perniciosus con el mantenimiento y transmisión de la zoonosis.

Este análisis se ha realizado comparando la especie sospechosa de transmisión con otras especies que pudieran ser vectores: P. papatasi y P. sergenti, comprobándose una mayor abundancia de P. perniciosus en las capturas de "cebo humano" así como una coincidencia más exacta con las áreas de distribución de la leishmaniasis.

P. perniciosus cumple los tres primeros puntos de la gradación de Killick-Kendrick y Ward (7): Es la especie de tendencia antropofílica más acusada, su distribución coincide con la de la enfermedad y es la especie más abundante de todas las capturadas.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLUE-ANDRADE, J.L. 1966. Subregiones fitoclimáticas de España. Minist. Agricultura, Madrid.
2. MARTINEZ-ORTEGA, E. 1985. Los flebotomos ibéricos (Dipt., Psychod.) I. Almería. Anales de Biología 3 (Biol. Anim. 1).
3. MARTINEZ-ORTEGA, E. 1985. Los flebotomos ibéricos (Dipt., Psychod.) II. El sureste. Anales de Biología 3 (Biol. Anim. 1).
4. CROSET, H., RIOUX, J.A., JUMIER, B. & TOUR, S. 1970. Fluctuations annuelles des populations de Phlebotomus perniciosus Newstead, 1911, Phlebotomus perfiliewi Parrot, 1930 et Sergentomyia minuta parroti (Adler y Theodor, 1927) (Dipt., Psychod.) en Tunisie du Nord. Arch. Inst. Pasteur Tunis. 47: 43-56.
5. MARTINEZ-ORTEGA, E. 1984. Fenología de Sergentomyia minuta (Rondani, 1843) (Dipt., Psychodidae, Phlebotominae) en el sureste de la Península Ibérica. Boletín Asoc. esp. Ent. 8: 35-39.
6. MARTINEZ-ORTEGA, E. 1984. Phlebotomus perniciosus Newstead, 1911, posible vector de la leishmaniasis cutánea (Dipt., Psychod.). Rev. Iber. Parasitol. 44(1): 59-64.
7. KILLICK-KENDRICK, R. & WARD, R.D. 1981. Ecology of Leishmania. Parasitology 82: 143-152.

ECOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA DEI VIRUS TRASMESSI DA FLEBOTOMI IN ITALIA

P. Verani, S. Caciolli, A. Renzi, M.G. Ciufolini e L. Nicoletti

Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto - In Italia sono stati isolati 4 diversi virus trasmessi da flebotomi, tutti appartenenti al genere Phlebovirus della famiglia Bunyaviridae. Due di essi, i virus Sicilian e Naples della febbre da pappataci, sono causa della febbre da pappataci o dei tre giorni, molto diffusa nel bacino del Mediterraneo, nell'Asia Meridionale e in India. A seguito del trattamento antimalarico effettuato negli anni '50, l'infezione umana con questi due virus sembra essere stata eliminata in Italia. Successivamente sono stati isolati due nuovi Phlebovirus, denominati Toscana ed Arbia, da flebotomi della specie P. perniciosus e P. perfiliewi, raccolti in diverse zone della Toscana. Indagini sieroepidemiologiche hanno dimostrato la capacità del virus Toscana di causare infezioni nell'uomo. Esso inoltre è stato associato eziologicamente ad infezioni acute del SNC. Lo studio dei focolai naturali dei virus Toscana ed Arbia ha fatto ipotizzare la possibilità per questi Phlebovirus di un ciclo di mantenimento in natura per via transovarica nel vettore senza il passaggio in un ospite vertebrato. Una dimostrazione diretta di questo fenomeno si è avuta dopo infezione sperimentale di flebotomi allevati in laboratorio.

Summary - Four sandfly-transmitted viruses have been isolated in Italy. They are members of the genus Phlebovirus of the family Bunyaviridae. Two of them, Sicilian and Naples sandfly fever viruses, are known to be the cause of most clinically described cases of sandfly fever in the Mediterranean Basin, Southwest Asia and India. Malaria control performed during the years '50 in Italy seems to have virtually eliminated human infections with Naples and Sicilian viruses. More recently, two new Phleboviruses, named Toscana and Arbia, have been isolated from the sandflies Phlebotomus perniciosus and P. perfiliewi collected in different areas of Toscana region. Seroepidemiological data demonstrated the capacity of Toscana virus to infect man. Moreover, Toscana virus has been etiologically associated to CNS acute viral infections. From the study of the natural foci of Toscana and Arbia viruses it results that these Phleboviruses can be maintained in nature primarily through transovarial transmission in the vector in absence of a vertebrate host. A direct demonstration of this phenomenon has been obtained following experimental infection of laboratory reared sandflies.

Il ruolo dei flebotomi come vettori di virus è stato ben documentato dapprima nel bacino del Mediterraneo dove è noto un loro ruolo nel trasmettere la febbre da pappataci e in studi più recenti in varie altre parti del vecchio e del nuovo Mondo, dove è stata dimostrata una loro associazione con molti diversi virus (1). Tutti i virus isolati da flebotomi nel nuovo Mondo provengono da differenti specie del genere Lutzomya, mentre quelli ritrovati nel vecchio Mondo da specie del genere Phlebotomus.

I virus trasmessi da flebotomi appartengono a due distinte famiglie: Rhabdoviridae e Bunyaviridae. Nel genere Vesiculovirus della famiglia Rhabdoviridae sono inclusi a tutt'oggi 13 diversi virus, che sono stati isolati da una varietà di artropodi e mammiferi in Asia, Africa, Europa e in America (2). Morfologicamente questi virus presentano la tipica forma a proiettile, caratteristica dei virus di questa famiglia. Molti, ma non tutti, di questi virus sono arbovirus, nel significato ecologico del termine che presuppone un ciclo in natura fra un artropode vettore e un ospite vertebrato. Il solo virus di questo gruppo presente in Europa, il virus Yug Bogdanovac, è stato isolato in Jugoslavia da Phlebotomus perfiliewi (3).

La maggior parte dei virus trasmessi da flebotomi appartiene invece alla famiglia Bunyaviridae, genere Phlebovirus. Si conoscono oggi 36 diversi virus, ma probabilmente molti altri sono circolanti in natura (4). Essi esistono in differenti situazioni ecologiche e sono particolarmente abbondanti nelle foreste tropicali. Essi sono stati ritrovati sia nel vecchio che nel nuovo Mondo ed ogni virus sembra avere una propria distribuzione geografica. La maggior parte dei Phlebovirus è strettamente associata ai flebotomi e tale rapporto con il vettore è documentato dal fatto che di solito questi virus non si replicano nelle zanzare dopo inoculazione sperimentale. Alcuni Phlebovirus sono però trasmessi da zanzare (ad esempio il virus della "Rift Valley Fever"), mentre per altri, isolati solo da vertebrati, non si conosce l'artropode vettore.

Virus isolati in Italia

In Italia sono stati isolati 4 diversi Phlebovirus (Tab. 1). I virus Sicilian e Naples della febbre da pappataci sono i Phlebovirus più studiati e dei quali si conosce una ampia distribuzione geografica. Essi sono riconosciuti essere la causa della febbre da pappataci o dei tre giorni, molto diffusa nel bacino del Mediterraneo, nell'Asia Meridionale e in India (5). L'ampia diffusione geografica di questi due virus e alcune similarità della loro epidemiologia con quella della leishmaniosi sono la conseguenza dell'ampia distribuzione e del particolare comportamento del loro vettore, il Phlebotomus papatasi. I due virus furono dapprima isolati da Sabin durante la II Guerra Mondiale dal sangue di militari ammalati e denominati Sicilian e Naples dalle località di provenienza. Successivamente furono isolati dal vettore in altre zone del bacino del Mediterraneo (6) ma non in Italia.

Successivamente, durante studi per la ricerca di focolai di arbovirus in diverse regioni italiane, sono stati isolati due nuovi Phlebovirus, denominati Toscana e Arbia, da flebotomi delle specie P. perniciosus e P. perfiliewi raccolti in diverse zone della Toscana. Questi due virus, pur presentando caratteristiche antigeniche e morfologiche simili a quelle di altri Phlebovirus, sono risultati essere due virus diversi e come tali inclusi nel 1980 e nel 1984 nel Catalogo Internazionale degli Arbovirus (7, 8).

Epidemiologia dei Phlebovirus isolati in Italia

Sono state eseguite diverse inchieste sierologiche per determinare la diffusione in Italia dell'infezione con i due virus della febbre da pappataci ed inoltre per verificare la capacità dei due virus di nuovo isolamento (Toscana e Arbia) di causare infezioni nell'uomo. I risultati di tali indagini hanno confermato la endemicità dell'infezione con i virus Sicilian e Naples della febbre da pappataci in ogni regione italiana controllata (Friuli, Piemonte, Emilia, Toscana, Lazio, Campania, Calabria, Sicilia) (9). Da uno studio, nel quale è stata analizzata la presenza di anticorpi neutralizzanti per i virus Sicilian e Naples in sieri di soggetti appartenenti a diverse classi di età, si è potuto però dedurre che a seguito del trattamento antimalarico effettuato negli anni '50 si è virtualmente eliminata l'infezione umana con questi due virus (10). Gli anticorpi infatti erano presenti solo in individui nati prima della campagna di disinfestazione. E' stato dimostrato dopo infezione in volontari umani che anticorpi neutralizzanti per questi virus possono persistere per più di 30 anni (11). Il trattamento antimalarico avrebbe perciò interrotto la trasmis-

Tabella 1 - Phlebovirus (Bunyaviridae) isolati in Italia.

Virus	Isolamento			Vettore	Malattia
	Anno	Luogo	Specie		
Sicilian sandfly fever	1943	Sicilia	Uomo	<u>Phlebotomus papatasi</u>	Febbre dei 3 giorni
Naples sandfly fever	1944	Campania	Uomo	<u>Phlebotomus papatasi</u>	Febbre dei 3 giorni
Toscana	1971	Toscana	<u>Phlebotomus perniciosus</u>	<u>P.perniciosus</u> <u>P.perfiliewi</u>	Meningite Malattia febbrile?
Arbia	1980	Toscana	<u>Phlebotomus perniciosus</u>	<u>P.perniciosus</u> <u>P.perfiliewi</u>	?

sione virale, riducendo la popolazione di P.papatasi.

Studi sieroepidemiologici hanno dimostrato la capacità del virus Toscana di infettare l'uomo. Anticorpi neutralizzanti per questo virus sono stati infatti ritrovati in varie percentuali, specialmente nei residenti in diverse zone della Toscana (10). Un alto tasso di infezione (24,8%) è stato ritrovato nei residenti della provincia di Firenze. La presenza di anticorpi nei sieri di soggetti appartenenti a tutte le classi di età, comprese quelle più giovani, dimostra che questo virus, a differenza del virus Sicilian e Naples, circola ed è trasmesso all'uomo per lo meno nelle zone studiate. Questo dato enfatizza l'importanza della biologia del vettore, in questo caso P.perniciosus e P.perfiliewi, nel determinare la possibilità di infezione nell'uomo.

La dimostrazione ottenuta con i dati sierologici della capacità del virus Toscana di causare infezione nell'uomo, ha stimolato ulteriori ricerche per valutare un suo ruolo eziologico in diverse manifestazioni morbose. I risultati di infezioni sperimentali avevano dimostrato la capacità del virus Toscana di causare infezioni neurologiche in diversi animali di laboratorio, comprese scimmie della specie Macaca fascicularis (7). Si è cercato quindi se esistesse una associazione eziologica fra questo virus e infezioni acute del sistema nervoso centrale (SNC) verificatisi nelle zone di possibile circolazione del virus durante i periodi di attività dei vettori. A tale scopo dal 1977 sono stati studiati, per la presenza di anticorpi verso il virus Toscana, sieri di pazienti con varie sindromi a carico del SNC, ospedalizzati in Toscana.

In numerosi pazienti si è potuta dimostrare una sieroconversione in due successivi prelievi di siero, che rifletteva una infezione recente con il virus Toscana in connessione con la malattia neurologica. La maggior parte dei pazienti con sieroconversione per il virus Toscana presentava una diagnosi clinica di meningite asettica o di encefalite. Tali casi si erano inoltre verificati in ogni anno nei mesi fra Giugno ed Ottobre, enfatizzando così la possibilità che si trattasse di una malattia trasmessa da un vettore. La neurovirulenza del virus Toscana è stata inoltre confermata dall'isolamento del virus stesso dal liquor di alcuni di questi pazienti.

Non si hanno ancora dati definitivi sulla capacità del virus Arbia, l'altro nuovo Phlebovirus isolato in Italia, di causare infezioni nell'uomo. I risultati di una limitata inchiesta sierologica, condotta in una zona della

Toscana, non sembrano indicare la capacità di questo virus di causare infezioni nell'uomo.

Ecologia dei Phlebovirus isolati in Italia

La presenza dei vettori e dei focolai naturali del virus Toscana è stata ricercata nelle località di possibile infezione dei pazienti che avevano presentato sierconversione per questo virus. Nell'estate del 1980 sono quindi iniziate raccolte periodiche di flebotomi in diverse zone delle province di Firenze e di Siena. In provincia di Firenze sono stati raccolti numerosi esemplari di flebotomi, tutti della specie P. perniciosus, mentre in provincia di Siena la maggior parte dei flebotomi raccolti erano della specie P. perfiliewi e solo pochi esemplari della specie P. perniciosus.

In totale dal 1980 al 1984 sono stati raccolti e processati per isolamento virale più di 10.000 flebotomi. Da questi sono stati isolati numerosi ceppi di virus Toscana e Arbia. Il maggior numero di isolamenti virali si è ottenuto da flebotomi raccolti durante il mese di Luglio in corrispondenza della più elevata densità dei flebotomi. Il tasso di infezione dei flebotomi è risultato essere molto elevato (circa 0,5%), più tipico di un rapporto virus-vettore di zone tropicali, che non di zone temperate. Isolamenti virali sono stati ottenuti da flebotomi sia maschi che femmine. Poiché i flebotomi maschi non succhiano sangue, tale dato suggerisce la possibilità che i virus Toscana e Arbia possano essere mantenuti in natura per via transovarica senza il passaggio in un ospite vertebrato. Simili prove indirette dell'esistenza di una trasmissione verticale nei flebotomi sono state pubblicate per altri Phlebovirus (12). La dimostrazione diretta di questo fenomeno è stata ottenuta per alcuni virus dopo infezione sperimentale di flebotomi di laboratorio (13) e anche per i virus Toscana e Arbia (14).

L'ecologia dei Phlebovirus trasmessi dai flebotomi sembrerebbe quindi differire da quella convenzionale descritta per la maggior parte dei virus conosciuti come arbovirus, che comporta un ciclo fra vertebrato e un artropode vettore.

Non si conosce un vertebrato serbatoio per molti Phlebovirus, inclusi i virus Sicilian e Naples della febbre da pappataci, benché anticorpi per questi due virus siano stati ritrovati in alcuni roditori. Apparentemente i flebotomi potrebbero infettarsi da un malato con viremia, che fungerebbe quindi da "amplificatore". Non si conosce un vertebrato che possa fungere da serbatoio per i virus Toscana e Arbia. Anticorpi per questi due virus sono stati trovati in percentuali molto basse nei mammiferi selvatici o domestici saggiati. È possibile quindi che il principale meccanismo di mantenimento in natura di questi due virus come anche dei due virus della febbre da pappataci avvenga tramite trasmissione verticale in un artropode suscettibile. La trasmissione transovarica fornirebbe inoltre un meccanismo efficiente per la sopravvivenza dei virus durante i periodi invernali in assenza di ospiti vertebrati suscettibili. Queste particolari caratteristiche ecologiche devono perciò essere tenute in considerazione per eventuali tentativi di controllo dei flebotomi che trasmettono virus causa di malattie nell'uomo.

Infezione sperimentale in flebotomi allevati in laboratorio

Gli studi sull'ecologia dei Phlebovirus suggeriscono un peculiare rapporto fra questi virus e il loro flebotomo vettore. È sembrato perciò interessante studiare il comportamento dei nuovi Phlebovirus, Toscana e Arbia, nei loro vettori. Studi di laboratorio di questo tipo sono stati in genere molto limitati per la difficoltà di disporre di colonie di flebotomi suscettibili allevati in laboratorio. Disponendo quindi di una colonia di laboratorio di P. perniciosus, allestita per lo studio della trasmissione sperimentale di leishmania, (15), si è potuta studiare la suscettibilità di questa specie di flebotomi all'infezione di laboratorio con i virus Toscana e Arbia, per i quali detta specie funge da vettore naturale. Si è potuta dimostrare la moltiplicazione di ambedue i virus dopo inoculazione intratoracica dei flebotomi. Il livello di moltiplicazione e

la concentrazione virale ottenuta nel singolo flebotomo risultava però molto bassa, come si poteva aspettare in un artropode non suscettibile (14).

Nello stesso studio P. perniciosus si è dimostrato invece relativamente refrattario all'infezione per via orale, che dovrebbe rappresentare il meccanismo naturale di infezione in natura da un ospite viremico. Solo dopo ingestione di un pasto di sangue contenente una gran quantità di virus, si è ottenuta l'infezione dei flebotomi, ma molti insetti sono risultati resistenti all'infezione per questa via. Se si dovesse ipotizzare che una simile situazione si verificasse in natura, solo un ospite vertebrato viremico con un livello elevato di virus nel sangue potrebbe servire come fonte di virus per i flebotomi. Come detto precedentemente non si conosce un ospite vertebrato naturale per i virus Toscana e Arbia, né i livelli di viremia che questi virus possono raggiungere anche nell'uomo.

I risultati delle infezioni sperimentali di questi due virus nel loro vettore naturale porterebbero perciò a confermare quanto sospettato a seguito dei ripetuti isolamenti ottenuti da esemplari di flebotomi maschi raccolti in natura e cioè il mantenimento dei virus in natura tramite trasmissione transovarica e non tramite un ciclo fra un vertebrato viremico e un flebotomo. Nell'interpretazione dei dati sperimentali non si può però escludere la possibilità di cambi di suscettibilità all'infezione virale verificatisi nei flebotomi a seguito della propagazione in laboratorio.

Si è potuta dimostrare sperimentalmente la possibilità di trasmissione transovarica dopo infezione per via intratoracica di P. perniciosus sia con il virus Toscana che con il virus Arbia.

Un altro dato che emerge dagli studi di infezione sperimentale con questi due Phlebovirus è la bassa concentrazione virale dimostrabile nei flebotomi infetti. Poiché tali basse concentrazioni virali non differiscono sostanzialmente dai livelli virali ritrovati nei flebotomi infetti in natura, si può dedurre che i risultati sperimentali ottenuti sono caratteristici di questa associazione virus-vettore. Poiché si è dimostrata la presenza di anticorpi per il virus Toscana in sieri umani, si può anche dedurre che tale basso livello di virus presente nel flebotomo è però sufficiente perché l'insetto possa, pungendo, trasmettere l'infezione e causare la malattia nell'uomo.

Conclusioni

L'isolamento di due nuovi e diversi Phlebovirus in aeree differenti e da due diverse specie di flebotomi (P. perniciosus e P. perfiliewi) fa supporre che la potenzialità di trasmettere virus da parte dei flebotomi in Italia, così come un possibile ruolo di questi virus nel causare infezioni nell'uomo, meritano ulteriori studi.

Il periodico verificarsi di casi clinici di malattie ricollegabili a infezioni con il virus Toscana e l'individuazione di focolai naturali di questo virus e del virus Arbia nelle stesse zone e in anni successivi dimostra la presenza di focolai virali stabili. La possibilità di mantenimento dei virus in natura principalmente mediante trasmissione transovarica nei flebotomi associate al noto limitato spostamento dei flebotomi risulta in una distribuzione focale dell'infezione.

Non è nota la distribuzione dei focolai naturali dei virus Toscana e Arbia. Finora essi sono stati isolati solo in Italia in varie zone della Toscana e da alcuni esemplari di flebotomi raccolti in provincia di Teramo. Probabilmente la distribuzione di questi virus nel bacino del Mediterraneo è sovrapponibile a quella dei loro vettori (P. perniciosus e P. perfiliewi). Recentemente è stato riportato l'isolamento del virus Toscana da un caso umano di encefalite in uno svedese che aveva presumibilmente contratto l'infezione durante un soggiorno estivo in Portogallo (16). Questo dato conferma sia la possibilità di una maggior estensione dei focolai di questi Phlebovirus sia l'importanza del virus Toscana come causa di malattia neurologica nell'uomo.

Ringraziamenti

La realizzazione delle ricerche di cui sono stati riportati sommariamente alcuni risultati è stata possibile per una proficua e pluriennale collaborazione fra il Laboratorio di Virologia dell'Istituto Superiore di Sanità e a) il Laboratorio di Parassitologia dello stesso Istituto, b) l'Unità epidemiologica di ricerca sui virus neurotropi della Regione Toscana, c) la Divisione di Malattie Infettive, Ospedale S. Maria Nuova, Firenze, d) la Clinica Neurologica dell'Università di Firenze, e) l'Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma. Si ringrazia inoltre il Sig. G. Caricati per la preziosa assistenza editoriale.

BIBLIOGRAFIA

1. TESH, R.B., CHANIOTIS, B.N., PERALTA, P.H. & JOHNSON, K.M. 1974. Ecology of viruses isolated from Panamanian phlebotomine sandflies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 258-269.
2. TRAVASSOS da ROSA, A.P., TESH, R.B., TRAVASSOS da ROSA, J.F., HERVE, J.P. & MAIN, A.J. 1984. Carajas and Maraba viruses, two new Vesiculoviruses isolated from Phlebotomine sand flies in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 999-1006.
3. GLIGIC, A., TESH, R.B., MISCEVIC, Z., TRAVASSOS da ROSA, A. & ZIVKOVIC, V. 1983. Jug Bogdanovac virus—a new member of the Vesicular stomatitis virus serogroup. (Rhabdoviridae: Vesiculovirus) isolated from phlebotominae sandflies in Yugoslavia. Mikrobiologija 20: 97-105.
4. TRAVASSOS da ROSA, A.P., TESH, R.B., PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS da ROSA, J.F. & PETERSON, N.E. 1983. Characterization of eight new Phlebotomus fever serogroup arboviruses (Bunyaviridae: Phlebovirus) from the Amazon region of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 1164-1171.
5. SABIN, A.B., PHILIP, C.B. & PAUL, J.R. 1944. Phlebotomus (pappataci or sandfly) fever. A disease of military importance. Summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. J. Am. Med. Assoc. 125: 603-606, and 693-699.
6. SCHMIDT, J.R., SCHMIDT, M.L. & SAID, M.I. 1971. Phlebotomus fever in Egypt. Isolation of Phlebotomus fever viruses from Phlebotomus papatasi. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 483-490.
7. VERANI, P., LOPES, M.C., NICOLETTI, L. & BALDUCCI, M. 1980. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy: I. Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus. Pages 195-201 in J. Vesenjak-Hirjan et al., eds., Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zbl. Bakt. Suppl. 9 Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
8. 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.
9. VERANI, P., BALDUCCI, M. & LOPES, M.C. 1979. Arboviruses in Italy. Pages 101-121 in E. Kurstak ed., Artic and Tropical Arboviruses, Academic Press, New York.

10. NICOLETTI, L., VERANI, P., CIUFOLINI, M.G., LOPES, M.C. & ZAMPETTI, P. 1980. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy: II. Serologic status of human beings. Pages 203-208 in J. Vesenjak-Hirjan et al., eds., Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zbl. Bakt. Suppl. 9 Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
11. BARTELLONI, P.J. & TESH, R.B. 1976. Clinical and serologic responses of volunteers infected with Phlebotomus fever virus (Sicilian type). Am. J. Trop. Med. Hyg. 25: 456-462.
12. TESH, R.B., SAIDI, S., JAVADIAN, E. & NADIM, N. 1977. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from Phlebotomus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 288-297.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. EHRNST, A., PETERS, C.J., NIKLASSON, B., SVEDMYR, A. & HOLMGREN, B. 1985. Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in swedish man after visit to Portugal. Lancet 1: 1212-1213.

SANDFLY CONTROL PERSPECTIVES

N. Rishikesh

Division of Vector Biology and Control, World Health Organization, CH-1211 Geneva 27

Introduction

Sandflies are detrimental to human health as they are vectors of leishmaniasis, sandfly fever and bartonellosis, and also cause harara which is by far the more serious in terms of human suffering and mortality. In the absence of effective vaccines and therapeutic agents, prevention of transmission by attacking the vectors constitutes an important component of control of sandfly-borne human diseases.

Chemical Control

Insecticides have played a significant role in control of sandfly vectors (1). Often, insecticides used to control other vectors (especially malaria vectors) or pests have yielded collateral benefit by way of reducing (and sometimes eliminating) the sandflies and leishmaniases (2-6). DDT is still the insecticide of choice remaining effective for 1-2 years if left undisturbed (7). Only Ph.papatasi in Bihar state in India has so far shown any sign of resistance to DDT (8,9).

ACL was eliminated from the cities of Barda and Kirovabad in Azerbaijan in USSR by focal insecticide spraying against sandfly vectors combined with detection and treatment of human cases (10). Through insecticide treatment against the adult sandfly vectors and their breeding sites (and eliminating the sick dog reservoirs), they also reported eradication of VL in several districts in Azerbaijan. In Kenya in Africa, termite hills, especially those which were eroded, were sprayed for the control of vectors of VL.

Indoor residual spraying may not have much impact on exophilic vectors of ZCL. However, in Turkmenia in USSR, a mixture of DDT or HCH with automobile exhaust fumes was used to control sandflies (and rodent reservoir) in the rodent burrows. Such control strategies were, however, developed after detailed study of the epidemiology of the disease including territorial distribution of the parasite, the reservoirs and the vector and the landscape characteristics so as to identify weak links in the chain of transmission (4).

CL in the New World is difficult to control by measures against the vectors as they have a diffuse distribution in the forests and breed in the organic debris of the forest floor. Outdoor application of insecticides as a routine measure of control will not be practical or economical and may adversely affect non-target fauna. However, a pilot study in a neotropical forest in Panama showed that bimonthly treatment of sandfly resting sites such as tree

trunks with 2% malathion emulsion concentrate reduced sandfly densities and the rate of CL among immigrant military and constructions crews (11). Such residual application of insecticide was found more effective and convenient, less costly and safer to the environment than ULV spraying of 95% of malathion. CL (UTA) transmitted by Ph. verrucarum has been controlled by indoor and outdoor (stone wall crevices) spraying of DDT and helped protect immigrant workers in construction camps in Peru (12). Mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) transmission occurring in deep forest are difficult to control by insecticide spraying against the vector.

Biological Control

Biological control has been defined as "the control of pests, including the vectors of human disease by the direct or indirect use of natural enemies with or without their metabolites" (13).

Natural regulation of living organisms including vector populations occurs through diseases carried by pathogens or the action of predators and competitors. Practically all biological control agents developed or being developed act against the immature stages of the vectors. However, records of pathogens from sandflies are mostly from adults (14,15), presumably as sandfly breeding sites are little known.

Genetic Control

Genetic control aims at either directly suppressing a vector population or substituting an existing population with a modified one which does not transmit disease or which is more amenable to control by other means (16). Genetic control by Sterile Insect Technique has so far not been successful in operational programmes against any disease vectors. Genetic studies on sandflies have been hampered by difficulties in rearing them in the laboratory although problems of colonization are recently being progressively overcome (17).

Environmental Management

Environmental management for vector control aims at "modification and/or manipulation of environmental factors or their interaction with man with a view to preventing or minimizing vector population and reducing man-vector-pathogen contact" (18).

Environmental changes brought about by urbanization and deforestation have been known to affect sandfly populations. In Uzbekistan in USSR, the upperpart of the burrows of large gerbils was destroyed by thorough ploughing, leading to drastic reduction in sandfly densities (19). In Turkmenia, a tractor was used for similar destruction of rodent burrows with very satisfactory impact on sandfly densities (6). Environmental management may in general not be practical or cost-effective when the adult sandfly has a diffuse distribution as in neotropical forest and the larval breeding occurs in forest litter.

Methods of reducing vector/man contact have an important role. Thus human settlements and especially immigrant worker camps could be located at safe distances (beyond vector flight range) from known sandfly breeding sites. It has been found in India that moving labour camps even a short distance stopped leishmaniasis transmission (1). Screening of houses and sleeping within bed-nets could help avoid sandfly bites and infection. Wearing of suitable clothing to protect as much of the body as possible and use of repellents (DEET, for example) on exposed parts such as face, neck and hands, will give protection from sandfly bites during unavoidable outdoor activities.

New Approaches

Efforts need to be made to develop methods which are simple and economical and which could be put to use by the community in integrated vector control strategies.

Sandfly traps could be rendered more effective by the incorporation of attractants. Bed-nets impregnated with an insecticide such as permethrin could enhance reduction of man-vector contact through its killing and repellent effect (20,21).

Community participation is an important element of primary health care approach (22). Vector control can often be carried out by the community on a self-supporting basis after specialists have developed appropriate control strategies (1). Experience in USSR has shown that active participation of the community is of importance in urban sandfly control (4).

Integrated Vector Control

"IVC can be considered as the utilization of all appropriate technological and management techniques to bring about an effective degree of vector suppression in a cost-effective manner" (23). For example in Hunger (Golodnaya) steppe in Uzbekistan in USSR where various workers used DDT and HCH spraying, elimination of gerbils by poisoned baits, elimination of both gerbils and sandflies with chloropicrin, calcium and sodium cyanide mixture and gas explosion method, individual protection, detection and treatment of cases and vaccine prophylaxis among others (19). Finally, in a area of 100'000 hectares, direct destruction of the burrows of large gerbils by tractors was used as the sole method against the reservoirs and vectors at on the average 6 times less the cost of other methods, and led to elimination of transmission of CL in the area from the fourth year of the operations.

Training

A universal method of vector control is not possible due to the varied biology and ecology of the vectors and the different epidemiological situations. Chemical control has to be based on a knowledge of the vector habits and behaviour and IVC demands even a greater understanding of vector bionomes. Personnel, who could study the vector and formulate control strategies, are often lacking in developing countries. There is need for suitable training of professionals (and sub-professionals) in endemic countries. It is also important to provide an adequate career structure for the trainees in order to attract and retain high calibre staff.

REFERENCES

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1984. The leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Techn. Rep.Ser. 701.
2. SANYAL, R.K. 1979. Resurgence of kala-azar and its control. Ann.Natl. Acad.Med.Sci. (India) 15 (4): 228-240.
3. THAKUR, C.P., KUMAR, M. & PATHAK, P.K. 1981. Kala-azar hits again. J. Trop. Med. Hug. 84: 271-276.
4. SAF'JANOVA, V.M. 1971. Leishmaniasis control. Bull. WHO 44: 561-566.
5. MARINKELLE, C.J. 1980. The control of leishmaniasis. Bull. WHO 158 (6): 807-818.
6. VYUKOV, V.N. 1980. Control of sandflies. WHO Travelling Seminar on Leishmaniasis Control, Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, AMS

USSR, Moscow.

7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1982. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance A. Smith (Ed.). WHO/VBC/82, 841.
8. KAUL, S.M. et al. 1978. Preliminary observations of the susceptibility-status of Phlebotomus argentipes and P. papatasi to DDT in two districts of Bihar (India). J. Com. Dis. 10: 208-211.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1980. Resistance of vectors of disease to pesticides. Fifth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Techn. Rep. Ser. 655.
10. NAJAFOV, A.Yu. & GASAN-ZADE, G.B. 1980. The experience of eradication of the foci of anthroponotic cutaneous and visceral leishmaniasis in Azerbaijan, USSR. WHO Travelling Seminar on Leishmaniasis Control, Gamaleya Institute of Epidemiology & Microbiology, AMS USSR, Moscow.
11. CHANIOTIS, B.N., PARSONS, R.E., HARLAN, H.J. & CORREA, M.A. 1982. A pilot study to control Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a neotropical rain forest. J. Med. Entomol. 19 (1): 1-5.
12. HERTIG, M. & FAIRCHILD, G.B. 1948. The control of Phlebotomus in Peru with DDT. Am. J. Trop. Med. 28: 207-230.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1982. Biological control of vectors of disease. Sixth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Techn. Rep. Ser., 679.
14. YOUNG, D.G. & LEWIS, D.J. 1977. 1. Pathogens of Psychodidae (Phlebotomine sandflies) in Pathogens of medically important arthropods. D.W. Roberts & M.A. Strand (Eds). Bull. WHO 55 (suppl. 1).
15. DAOUST, R.A. 1981. Pathogens of Psychodidae (Phlebotomine sandflies). In: Bibliography of pathogens of medically important arthropods. D.W. Roberts, R.A. Daoust & S.P. Wraight (Eds) VBC/83.1.
16. DAVIDSON, G. 1974. Genetic control of insect pests. Academic Press Inc., London.
17. WHITE, G.B. & KILLICK-KENDRICK, R. 1975. Polytene chromosomes of the sandfly Lutzomyia longipalpis and the cytogenetics of Psychodidae in relation to other Diptera. J. Ent. (A) 50 (3): 187-196.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1980. Environmental management for vector control. Fourth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Techn. Rep. Ser. 649.
19. FAYSULIN, F. 1980. The experience of zoonotic cutaneous leishmaniasis control in Hunger (Colodnaya) steppe, Uzbekistan, USSR. WHO Travelling Seminar on Leishmaniasis Control, Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, AMS USSR, Moscow.
20. RANQUE, P. et al. 1984. Etude expérimentale sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à 8mg/m² dans la lutte contre la transmission du paludisme. Ecole Nationale de Médecine, Bamako, Mali.
21. DARRIET, F. et al. 1984. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. ORSTOM, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (Haute-Volta).
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1980. Formulating strategies for health for all by the year 2000. WHO, Geneva.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1983. Integrated vector control. Seventh report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Techn. Rep. Ser. 688.