Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 361-364

ETEROGENEITA' GENETICA DI ONCHOCERCA VOLVULUS IN AFRICA: DIFFERENZIAMENTO DI POPOLAZIONI DI SAVANNA E DI FORESTA

S. Kumlien (a), F. Villani (b), R. Cianchi (a), M. Karam (c), M.C. Henry (d) e L. Bullini (a)

(a) Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italia
(b) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italia
(c) World Health Organization, Onchocerciasis Control Programme, B.P.549, Ouagadougou, Burkina Faso
(d) Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, University of Kinshasa, Zaire

Riassunto. - Mediante analisi elettroforetica di 25 loci enzimatici è stata confrontata la struttura genetica di popolazioni africane della filaria Onchocerca volvulus, provenienti da regioni ed habitat diversi: Mali(savanna), Costa d'Avorio (foresta) e Zaire (savanna). I risultati ottenuti mostrano una notevole eterogeneità genetica in O.volvulus. La distanza genetica media tra le popolazioni dell'Africa occidentale e quella dello Zaire (D=0,11) é legata soprattutto ai loci Mdh-1 e 6Pgdh; altri tre loci: Ldh, Hbdh e G6pdh differenziano le popolazioni di savanna da quella di foresta. Questi dati risultano in accordo con l'ipotesi che i diversi quadri epidemiologici osservati nell'area di diffusione dell'oncocercosi siano legati a differenze intrinseche nel parassita.

Summary (Genetic heterogeneity of Onchocerca volvulus from Africa: differentiation between savannah and forest populations).- The genetic structure of populations of Onchocerca volvulus from different African regions and habitats (Mali, savannah; Ivory Coast, forest; Zaire, savannah) is compared on the basis of the electrophoretic analysis of 25 enzyme loci. A considerable genetic heterogeneity is shown to exist within O. volvulus. The average value of Nei's genetic distance between West African populations and that from Zaire (D=0.11) is mainly due to the loci Mdh-1 and 6Pgdh, while other three loci: Ldh, Hbdh and G6pdh differentiate between forest and savannah populations. These data support the hypothesis that the discrepant epidemiological patterns of human onchocerciasis are related to intrinsic differences in the parasite.

Introduzione

L'oncocercosi, malattia tropicale molto diffusa caratterizzata da lesioni oculari di varia intensità fino alla cecità completa, presenta quadri clinici differenti nelle varie aree geografiche e in zone bioclimatiche diverse di una tessa regione (1). E' stato ipotizzato che ciò sia dovuto alla presenza di va-

rie "forme" (razze biologiche o specie) nel parassita che causa la malattia, la filaria Onchocerca volvulus. A livello morfologico popolazioni di O.volvulus di diversa origine geografica non risultano differenziabili a nessuno degli stadi di sviluppo; a livello istochimico esisterebbero alcune differenze tra microfilarie di alcune regioni (2), ma il loro significato tassonomico é incerto.

Per valutare il livello di eterogeneità genetica esistente in O.volvulus abbiamo iniziato ricerche sulla struttura genetica di popolazioni africane di questo parassita mediante analisi elettroforetica di numerosi sistemi gene-enzima. Nel presente lavoro vengono riportati dati su tre popolazioni di O.volvulus provenienti da aree geograficamente ed ecologicamente diverse: Mali (savanna), Costa d'Avorio (foresta) e Zaire (foresta a galleria in savanna).

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido singoli esemplari adulti per 25 loci enzimatici: alcol deidrogenasi (Adh), lattato deidrogenasi (Ldh), idrossibutirrato deidrogenasi (Hbdh), malato deidrogenasi-1,-2 (Mdh-1, Mdh-2), enzima malico (Me), isocitrato deidrogenasi-1,-2(Idh-1,Idh-2), 6-fosfogluconato deidrogenasi (6Pgdh), glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6pdh), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (G3pdh), superossido dismutasi-1,-2 (Sod-1, Sod-2), glutammico-ossalacetico transaminasi-1 (Got-1), esochinasi-2 (Hk-2), creatino chinasi (Ck), adenilato chinasi (Adk), fosfoglucomutasi (Pgm), fosfatasi alcalina (Aph), fosfatasi acida (Acph), aldolasi (Ald), anidrasi carbonica (Ca),trioso-fosfato isomerasi (Tpi),mannosio-fosfato isomerasi (Mpi), glucosio-fosfato isomerasi (Gpi). Le tecniche utilizzate sono state descritte da Cianchi et al.(3). La divergenza genetica tra le popolazioni studiate é stata calcolata con le formule di Nei (4) dell'identità e della distanza genetica standard.

Risultati

Dei 25 loci analizzati, 8 (Mdh-2, G3pdh, Sod-1, Sod-2, Ck, Adk, Ca e Tpi) sono risultati monomorfici per lo stesso allele in tutte le popolazioni studiate, gli altri 17 polimorfici (criterio dell'1%) per un numero variabile di alleli (da 2 a 4) in almeno una popolazione. Di questi loci, 2 (Mdh-1 e 6Pgdh) sono risultati significativamente differenziati tra lo Zaire e l'Africa occidentale, mentre altri 3 (Ldh, Hbdh e G6pdh) differenziano le popolazioni di savanna e da quella di foresta. In particolare gli alleli $Mdh\text{-}1^{95}$ e $6Pgdh^{107}$, molto comuni nella popolazione dello Zaire, non raggiungono lo 0,10 in quelle del Mali e della Costa d'Avorio, dove gli alleli più comuni sono invece $Mdh\text{-}1^{100}$ e $6Pgdh^{100}$. Sia nella popolazione dello Zaire che in quelle dell'Africa occidentale gli alleli $Ldh\text{-}1^{100}$ e $Hbdh^{100}$ mostrano frequenze superiori a 0,70 in savanna, mentre in foresta risultano molto comuni gli alleli $Ldh\text{-}1^{110}$ e $Hbdh^{108}$ (frequenza 0,70). Per quanto riguarda il locus G6pdh, studiato solo in Africa occidentale, l'allele 100 prevale nella popolazione di savanna e il 105 in quella di foresta.

La distanza genetica media (D) tra la popolazione dello Zaire e quelle dell'Africa occidentale é risultata 0,11 , mentre quella tra le popolazioni di

savanna e foresta dell'Africa occidentale é 0,04 . La popolazione dello Zaire risulta più affine a quella di savanna del Mali (D=0,07) che a quella di foresta della Costa d'Avorio (D=0,13).

Conclusioni

I dati sopra riportati, anche se relativi ad un numero esiguo di popolazioni, mostrano chiaramente l'esistenza di una notevole eterogeneità genetica in O. volvulus. Ciò risulta in accordo con l'ipotesi che i diversi quadri epidemiologici osservati nell'area di diffusione dell'oncocercosi siano legati a differenze intrinseche nel parassita. Particolarmente interessante é l'osservazione che ai loci Ldh, Hbdh e G6pdh prevalgono alleli diversi in savanna (Ldh^{100}, $Hbdh^{100}$, $G6pdh^{100}$) e in foresta (Ldh^{110}, $Hbdh^{108}$, $G6pdh^{105}$). Sulla base dei risultati ottenuti é possibile un'identificazione biochimica di popolazioni di O.volvulus aventi differente origine geografica e/o legate ad habitat diversi (savanna, foresta). Ciò appare di particolare rilievo per una migliore conoscenza dell'epidemiologia dell'oncocercosi umana.

BIBLIOGRAFIA

1. DUKE, B.O.L. 1981. Geographical aspects of onchocerciasis. Ann. Soc. belge Méd. trop. 61: 179-186.
2. OMAR, M.S. 1978. Histochemical enzyme-staining patterns of Onchocerca volvulus microfilariae. Tropenmed.Parasit. 29:.462-472.
3. CIANCHI, R., KARAM, M., HENRY, M.C., VILLANI, F., KUMLIEN, S. & BULLINI, L. Preliminary data on the genetic differentiation of Onchocerca volvulus in Africa. Submitted to Acta tropica.
4. NEI, M. 1972.Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 365-368

RICERCHE SUL DIFFERENZIAMENTO GENETICO DI POPOLAZIONI ITALIANE DEL GRUPPO REPTANS (DIPTERA, SIMULIDAE)

R. Cianchi (a), L. Rivosecchi (b), S. Kumlien (a), P. Casolini (a) e L. Bullini (a)

(a) Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Roma
(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Viene studiato il differenziamento genetico di popolazioni del gruppo reptans mediante analisi elettroforetica di 21 loci enzimatici. I risultati ottenuti mostrano che le popolazioni italiane con 8 rami pupali, attribuite a S.pictum e a S.galeratum, sono assai poco differenziate a livello genetico (D tra 0,012 e 0,047) ed appartengono presumibilmente a un'unica specie (S.reptans =S.pictum). I loci che più contribuiscono a tale divergenza sono Pgm, che risulta differenziato nella popolazione dell'Arrone (attribuita a S.galeratum) e Hk, differenziato nella popolazione della val d'Adige. A una specie distinta appartengono le popolazioni con 10-14 rami pupali. La forma a 10 rami (S.voilense, sensu Rubzov(1)) non mostra alcun differenziamento genetico rispetto a quella a 12-14 rami (S.colombaschense, sensu Rivosecchi(2)); cumulandole, il campione ottenuto risulta in equilibrio di Hardy-Weinberg per tutti i loci polimorfici. La distanza genetica media tra la specie a 8 rami pupali e quella a 10-14 è risultata 0,187.

Summary (Genetic differentiation between Italian populations of blackflies of the reptans group). - The genetic differentiation between populations of blackflies of the reptans group was electrophoretically investigated on the basis of 21 enzyme loci. The data obtained show that the Italian populations with 8 pupal branches, assigned to S.pictum and S.galeratum, are genetically poorly differentiated (Nei's D between 0.012 and 0.047), and presumably belong to a single species (S.reptans=S.pictum). Their divergence is mainly due to the loci Pgm, differentiating the population from the Arrone river (assigned to S.galeratum), and Hk, differentiating that from the Adige valley. The Italian populations having 10-14 pupal branches belong to a distinct species; the form with 10 branches (S.voilense, sensu Rubzov(1)) is not differentiated genetically from that with 12-14 (S.colombaschense, sensu Rivosecchi(2)); their pooled sample show all the polymorphic loci in Hardy-Weinberg equilibrium. An average genetic distance of 0.187 was found between the species with 8 and that with 10-14 pupal branches.

Introduzione

I simulidi del gruppo reptans presenti in Italia sono, secondo Rivosecchi

(2);S.galeratum (rinvenuto nel Lazio);S.pictum (diffuso in tutta Italia);S.voilense(Italia centro-settentrionale);S.colombaschense (val d'Adige) e S.liriense (Lazio e Abruzzo). Poichè la tassonomia di questi simulidi presenta ancor oggi molte incertezze,abbiamo iniziato studi sulla struttura genetica di popolazioni di questo gruppo mediante analisi elettroforetica di un numero elevato di sistemi gene-enzima. Ricerche preliminari,condotte su popolazioni della val d'Adige,hanno confermato l'esistenza in questa regione di due entità riproduttivamente isolate(3).Esse sono morfologicamente indistinguibili allo stadio larvale e adulto, ma differenziate nella pupa, avendo l'una 8 rami,l'altra 10-14.Queste due specie risultano identificabili elettroforeticamente a tutti gli stadi di sviluppo per la presenza di loci "diagnostici" (cioè loci con alleli diversi nelle due specie),come Mdh-2 (3,4). La specie con 8 rami pupali, corrispondente a S.pictum sensu Rubzov (1),è stata da noi indicata come S.reptans, S.pictum essendo stato recentemente sinonimizzato con S.reptans da Zwick e Crosskey (5). Quanto alla specie con 10-14 rami pupali, essa è stata da noi provvisoriamente attribuita a S.voilense,alla cui descrizione ben corrisponde,in attesa che il problema della sinonimia di S.voilense con S.colombaschense venga definitivamente risolto. Nel presente lavoro viene confrontata la struttura genetica di popolazioni del gruppo reptans del Lazio e della val d'Adige, attribuite a specie diverse.

Materiale e Metodi

Sono stati studiati campioni provenienti dalle seguenti località: canale Biffi e centrale di Avio(val d'Adige);fiume Fiora,presso Ponte San Pietro(Viterbo);fiume Treia,presso Civita Castellana(Viterbo);fiume Arrone,presso Maccarese (Roma).Gli esemplari provenienti dalla val d'Adige sono stati divisi in tre gruppi,a seconda che derivassero da pupe con 8 rami (S.pictum,sensu Rubzov(1)), 10 (S.voilense,sensu Rubzov(1)),o 12-14 (S.colombaschense,sensu Rivosecchi(2)). Gli esemplari del Fiora e del Treia,tutti con pupe a 8 rami,corrispondono a S.pictum (sensu Rubzov(1)),mentre quelli dell'Arrone,anch'essi con pupe a 8 rami,sono stati attribuiti a S.galeratum (sensu Rivosecchi(2)).

Gli esemplari dei vari campioni sono stati saggiati mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido per i seguenti loci enzimatici: α-Gpdh-1,Ldh, Mdh-1,Mdh-2,Me,Idh-1, Idh-2,G6pdh,Nadh-dh, Sod-1,Sod-2, Got-1,Got-2,Hk,Adk,Pgm, Est-1,Aph,Acph,Tpi e Gpi. Il differenziamento genetico tra le popolazioni studiate è stato calcolato con le formule di Nei(6)dell'identità e della distanza genetica standard sulla base delle frequenze alleliche ai 21 loci analizzati.

Risultati e Discussione

I campioni della val d'Adige, rispettivamente a 10 e 12-14 rami pupali,non risultano geneticamente differenziati (D=0,002);cumulandoli,il campione ottenuto è in equilibrio di Hardy-Weinberg per tutti i loci polimorfici. Le due forme vanno pertanto attribuite ad un'unica specie,provvisoriamente indicata come S. voilense per i motivi sopra esposti.La distanza genetica tra le popolazioni a 8 rami pupali varia da 0,012(tra il campione del Treia e quello del Fiora)a 0,047 (tra il campione della val d'Adige e quello dell'Arrone).Si tratta di valori re

lativamente bassi,che suggerirebbero l'appartenenza di tali popolazioni ad un'unica specie(S.reptans=S.pictum).Il differenziamento genetico tra le popolazioni a 8 rami pupali del Lazio e quella della val d'Adige(D=0,036)è determinato principalmente dal locus Hk.Nel Lazio il confronto tra la popolazione del fiume Arrone,attribuita a S.galeratum,e quelle del Treia e del Fiora,attribuite a S.pictum, mostra che il loro differenziamento genetico (D=0,031)é legato quasi esclusivamente al locus Pgm,che presenta nel campione dell'Arrone frequenze alleliche notevolmente diverse da quelle delle altre popolazioni italiane a 8 rami pupali. Una possibile spiegazione é che tali differenze siano dovute a fenomeni di deriva genetica.La popolazione del fiume Arrone,oltre ad avere dimensioni relativamente modeste,é soggetta come molte altre del gruppo reptans in Italia centrale a drastiche riduzioni del numero degli individui, legate principalmente all'immissione di sostanze inquinanti nei corsi d'acqua che ospitano i focolai larvali.Tale fenomeno ha causato tra l'altro la probabile estinzione in questi ultimi anni di S.liriense,che era presente nei fiumi Sacco, Liri e Sangro,e la quasi completa scomparsa dall'Italia centrale di S.voilense. Alcune differenze a livello morfologico ed ecologico tra le popolazioni italiane attribuite a S.galeratum e le altre a 8 rami pupali non permettono tuttavia di escludere l'ipotesi che galeratum sia un taxon distinto;la corrispondenza di questa forma con S.galeratum della Svezia richiede in ogni caso conferma.Infine la distanza genetica media tra le popolazioni italiane a 8 rami pupali e quelle a 10-14 é risultata 0,187; un valore di 0,30 era stato da noi precedentemente ottenuto sulla base di un diverso e meno numeroso campione di loci(3).

Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano che le popolazioni italiane del gruppo reptans con 8 rami pupali,attribuite a S.pictum e a S.galeratum,sono assai poco differenziate a livello genetico ed appartengono presumibilmente ad un'unica specie(S.reptans=S.pictum).A una specie distinta (S.voilense=S.colombaschense?) appartengono,invece,le popolazioni con 10-14 rami pupali;la forma a 10 rami non mostra alcun differenziamento genetico rispetto a quella a 12-14 rami.

BIBLIOGRAFIA

1. RUBZOV, J.A. 1964. Simuliidae d'Italia. Memoria I. Mem. Soc. Entom. Ital. 43:5-123.
2. RIVOSECCHI, L. 1978. Diptera Nematocera Simuliidae. Fauna d'Italia, vol. XIII. Calderini, Bologna.
3. RIVOSECCHI, L.,CIANCHI, R. & BULLINI, L. 1983. Dati preliminari per una tassonomia biochimica dei gruppi ornata e reptans (Diptera, Simuliidae). Atti XIII Congr. Naz. It. Ent.:505-509.
4. RIVOSECCHI, L., CIANCHI,R. & BULLINI, L. L'identificazione elettroforetica dei simulidi del complesso reptans(Diptera,Nematocera)nello studio degli attacchi al bestiame in val d'Adige.Ann.Ist.Sup.Sanità,in corso di stampa.
5. ZWICK, N. & CROSSKEY,R.N. 1980. The taxonomy and nomenclature of the black flies (Diptera, Simuliidae) described by Meigen.Aquatic Insect 2: 225-247.
6. NEI, M. 1972. Genetic distance between populations.Am.Nat.106:283-292.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 369-372

STRUTTURA GENETICA DI *CULEX QUINQUEFASCIATUS* IN AFRICA (DIPTERA, CULICIDAE)

S. Urbanelli (a), F. Villani (b) e L. Bullini (a)

(a) Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Roma
(b) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "la Sapienza", Roma

Riassunto. - Vengono esposti i risultati di ricerche sulla struttura genetica di popolazioni africane di *Culex quinquefasciatus*. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli di letteratura su popolazioni dello stesso taxon degli Stati Uniti e di *Culex pipiens* del Vecchio e del Nuovo Mondo. La variabilità genetica di *Cx.quinquefasciatus* dell'Africa(He=0,06 P=0,44 ,A=1,47) è del tutto simile a quella osservata negli U.S.A.,ma molto inferiore a quella di *Cx. pipiens* (He=0,14 , P=0,52 e A=1,64). Le popolazioni di *Cx.quinquefasciatus* sono geneticamente molto più omogenee (D=0,004) di quelle di *Cx.pipiens* (D=0,04). La divergenza genetica tra *Cx.quinquefasciatus* dell'Africa e degli U.S.A. è estremamente bassa (D=0,003) e conferma l'ipotesi di un'introduzione di *Cx.quinquefasciatus* in America dall'Africa mediante trasporto passivo ad opera dell'uomo. La distanza genetica media tra *Cx.quinquefasciatus* e *Cx.pipiens*, sulla base dei 17 loci studiati, è 0,166. A tale differenziamento contribuiscono soprattutto i loci *Got-2* e *Me-2*; in quest'ultimo sono stati osservati gli alleli *100* e *108* in *Cx.pipiens*, *106* in *Cx.quinquefasciatus*.

Summary (Genetic structure of *Culex quinquefasciatus* from Africa). - Data are reported on the genetic structure of *Culex quinquefasciatus* from Africa. They are compared with literature data on populations of this taxon from the U.S.A. and of *Cx.pipiens* from the Old and the New World.The genetic variability of *Cx. quinquefasciatus* from Africa (He=0.06,P=0.44,A=1.47) is similar to that found in the U.S.A.,and much lower than that observed in *Cx.pipiens* (He=0.14, P=0.52, A=1.64). *Cx.quinquefasciatus* populations appear genetically much more homogeneous than those of *Cx.pipiens* (average Nei's D =0.004 within the former taxon, about ten times more within the latter). The genetic divergence between *Cx. quinquefasciatus* from Africa and the U.S.A. is very low(D=0.003),supporting the hypothesis of an African origin for the New World *Cx.quinquefasciatus*, via passive transport by man. The average genetic distance found between *Cx.quinquefasciatus* and *Cx.pipiens*, on the basis of the 17 loci studied, is 0.166; the most differentiated loci are *Me-2* and *Got-2*, the former showing the alleles *100* and *108* in *Cx.pipiens*, and *106* in *Cx.quinquefasciatus*.

Introduzione

Lo status tassonomico di Culex pipiens e Cx.quinquefasciatus,i due membri del complesso Culex pipiens più diffusi e più importanti da un punto di vista sanitario, è tuttora oggetto di discussione. Tra i vari caratteri biologici e morfologici utilizzati per identificare questi due taxa l'unico che ha mostrato una certa affidabilità è l'edeago, le cui principali caratteristiche sono state combinate in un singolo valore ed espresse come rapporto DV/D,dove DV è la distanza tra le estremità del braccio dorsale e ventrale e D è la distanza tra le estremità dei bracci dorsali(1,2). Mediante l'uso di questo carattere sono state condotte numerose ricerche sul campo e in laboratorio,tendenti a chiarire il problema dei rapporti tra Cx.pipiens e Cx.quinquefasciatus(3). Ibridi F di laboratorio mostrano un rapporto DV/D intermedio,mentre nei reincroci si osserva tutta la gamma di valori tra la forma ibrida e le forme parentali (3);ciò indica che questo carattere é controllato da più geni.Il rapporto DV/D é stato usato per evidenziare aree di ibridazione e di intergradazione in natura. Queste aree sono state osservate tra il 36° e il 39°N in America, a nord del 34°N in Giappone ed Estremo Oriente, in Australia sud-orientale ed in alcune aree del Medio Oriente (3). Nessuna informazione é disponibile per il Sud America. In Africa non sembrano esistere zone di ibridazione (4,5). Un altro approccio utilizzato per valutare l'entità del flusso genico in aree di simpatria si basa sull'analisi elettroforetica di sistemi gene-enzima (6,7). Ricerche condotte in popolazioni nord americane di Cx.pipiens e Cx.quinquefasciatus non hanno portato ad evidenziare loci con alleli diversi nei due taxa;le frequenze alleliche ad alcuni loci (Hk,Gpi,6Pgdh e Pgm) hanno tuttavia mostrato un gradiente di variazione sostanzialmente coincidente con quello osservato mediante l'esame dei valori di DV/D (6,7).

Materiali e Metodi

I campioni di Cx.quinquefasciatus provenivano dalle seguenti località: Kaolak,Senegal; Bamako,Mali; Ouagadougou,Burkina Faso; Benin City,Nigeria; Maputo, Mozambico. Le larve provenienti dal campo sono state allevate in laboratorio fino allo stadio adulto. Per i maschi si è proceduto all'identificazione morfologica calcolando il rapporto DV/D nel modo descritto precedentemente. L'elettroforesi su gel d'amido é stata effettuata su omogenati di singoli esemplari per 17 loci enzimatici: α-Gpdh,Mdh-1,Mdh-2,Me-1,Me-2,Idh-1,Idh-2,6Pgdh, G3pdh,Got-1,Got-2,Hk-1,Adk,Pgm,Ald,Tpi e Gpi. Per ciascun locus sono stati analizzati più di 50 individui per campione. La variabilità genetica é stata stimata utilizzando i seguenti parametri:eterozigosi media attesa per locus (He), proporzione dei loci polimorfici con il criterio dell'1% (P) e numero medio di alleli per locus (A). Il differenziamento genetico tra le popolazioni é stato stimato mediante gli indici di identità e distanza genetica standard, calcolati con le formule proposte da Nei (9).

Risultati e Conclusioni

I risultati ottenuti sulle popolazioni di Cx.quinquefasciatus africane sono stati confrontati con quelli riportati in letteratura per questo taxon

negli U.S.A. (6) e per Cx.pipiens nel Vecchio (8) e nel Nuovo Mondo(6). Sono stati messi in evidenza: a) livelli simili di variabilità genetica nei campioni di Cx.quinquefasciatus dell'Africa (He=0,06, P=0,44, A=1,47) e degli USA; tali valori sono notevolmente inferiori a quelli osservati in Cx.pipiens (He=0,14, P=0,52, A=1,64); b) un'omogeneità genetica molto più elevata tra le popolazioni di Cx.quinquefasciatus che tra quelle di Cx.pipiens (D=0,004 per le prime, circa 10 volte maggiore per le seconde); c) valori di divergenza genetica tra Cx. quinquefasciatus africano e americano estremamente bassi (D=0,003),che confermano l'ipotesi di una introduzione di Cx.quinquefasciatus in America dall'Africa mediante trasporto passivo ad opera dell'uomo,come nel caso di Aedes aegypti (10). Il confronto tra Cx.quinquefasciatus e Cx.pipiens del Vecchio Mondo ha mostrato che il primo é geneticamente più affine alle popolazioni italiane di Cx.pipiens pipiens (D=0,145) che a quelle di Cx. pipiens molestus sia italiane (D=0,186) che medio-orientali(D=0,168).La distanza genetica media tra Cx. quinquefasciatus e Cx.pipiens,sulla base dei 17 loci studiati,è 0,166. A tale differenziamento contribuiscono soprattutto i loci Me-2 e Got-2,che hanno frequenze alleliche molto diverse nei due taxa. In particolare al locus Me-2 sono stati osservati gli alleli 100 e 108 in Cx.pipiens, 106 in Cx.quinquefasciatus. La scoperta di un locus apparentemente "diagnostico" tra questi due taxa appare di grande importanza per studiare il flusso genico tra Cx.pipiens e Cx.quinquefasciatus nelle diverse aree geografiche e le sue conseguenze evolutive.

BIBLIOGRAFIA

1. SUNDARARAMAN, S. 1949. Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of Culex pipiens and Culex quinquefasciatus in the United States. Am.J.Hyg. 50:307-314.
2. BELKIN, J.N. 1962. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). Volumes I & II. Berleley, Univ.Calif. Press.
3. BARR, A.R. 1982. The Culex pipiens complex. In: Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors (W.W.M. Steiner,W.J.Tabachnick,K.S. Rai & S.Narang, eds.).Stipes Publ.Co.,Champaign,Illinois,pp.551-572.
4. JUPP, P.J. 1978. Culex(Culex)pipiens pipiens Linnaeus and Culex(Culex) pipiens quinquefasciatus Say in South Africa: morphological and reproductive evidence in favour of their status as two species.Mosq.Syst. 10:461-473.
5. DONALDSON, J.M.I. 1979. The Culex pipiens complex in South Africa. J.ent. Soc.sth.Afr. 42:35-50.
6. CHENG,M.L.,HACKER,C.S.,PRYOR,S.C.,FERREL,R.E. & KITTO,B. 1982.The ecological genetics of the Culex pipiens complex in North America.In:Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors(W.W.M.Steiner,W.J.Tabachnick,K.S.Rai & S.Narang,eds.).Stipes Publ.Co.,Champaign,Ill.,pp.581-627.
7. TABACHNICK,W.J. & POWELL,J.R. 1983. Genetic analysis of Culex pipiens populations in the Central Valley of California.Ann.ent.Soc.Am. 76: 715-720.
8. URBANELLI, S., CIANCHI, R., PETRARCA, V., SABATINELLI, G., COLUZZI, M. & BULLINI, L. 1981. Adaptation to the urban environment in the mosquito Culex pipiens (Diptera, Culicidae). In: Ecologia (A. Moroni, O. Ravera & A. Anelli, eds.). Zara, Parma, pp.305-316.
9. NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. Am.Nat. 106:283-292.
10. TABACHNICK, W.J. & POWELL, J.R. 1979. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. Gen.Res. 4:215-229.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 373-376

RICERCHE ELETTROFORETICHE SU POPOLAZIONI DI CULEX PIPIENS EGIZIANE E ISRAELIANE (DIPTERA, CULICIDAE)

F. Villani (a), S. Urbanelli (b), A. Gad (c), S. Nudelman (d) e L. Bullini (b)

(a) Istituto di Parassitologia, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italia
(b) Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italia
(c) Research and Training Center on Vectors of Diseases, Ain Shams University, Abbassia, Cairo, Egypt
(d) Department of Zoology, The Hebrew University of Gerusalem, Israel

Riassunto. - E' stata studiata la struttura genetica di popolazioni di Culex pipiens, provenienti da varie località egiziane e israeliane, mediante analisi elettroforetica di 17 loci enzimatici(α-Gpdh,Mdh-1,Mdh-2,Me-1,Me-2,Idh-1,Idh-2, 6Pgdh,G3pdh,Got-1,Got-2,Hk-1,Adk,Pgm,Ald,Tpi e Gpi). I parametri di variabilità genetica considerati hanno dato i seguenti valori medi:He=0,12 ,P=0,47 ,A=1,54. E' stata osservata una notevole omogeneità genetica sia nell'ambito delle popolazioni egiziane (D medio=0,013) che di quelle israeliane (D medio=0,011). In questi due paesi non esisterebbero pertanto due forme geneticamente differenziate come lo sono le popolazioni di pipiens e molestus in Europa. La distanza genetica media tra i campioni dell'Egitto e di Israele è 0,028 . Le popolazioni di Cx.pipiens di questi paesi sono risultate geneticamente più affini alle popolazioni italiane di molestus (D medio=0,023) che a quelle di pipiens (D medio=0,056).

Summary (Electrophoretic study of populations of Culex pipiens from Egypt and Israel) - Data are reported on the genetic structure of populations of Culex pipiens from Egypt and Israel, on the basis of the electrophoretic study of 17 enzyme loci (α-Gpdh,Mdh-1,Mdh-2,Me-1,Me-2,Idh-1,Idh-2,6Pgdh,G3pdh,Got-1,Got-2, Hk-1,Adk,Pgm,Ald,Tpi, and Gpi). The following average values of genetic variability have been observed: He=0.12,P=0.47,A=1.54. The populations from Egypt, as well as those from Israel, are genetically fairly homogeneous (average Nei's D=0.013 and 0.011 respectively). No evidence has been found for the presence in these two countries of two genetically differentiated forms such as the European populations of pipiens and molestus. The average genetic distance between the samples from Egypt and Israel is 0.028. Cx.pipiens populations from these countries appear to be genetically more related to Italian molestus (average D= 0.023) than to Italian pipiens (average D=0.056).

Introduzione

La zanzara Culex pipiens presenta forme differenziate a livello morfologico (numero di denti del mentum, forma del sifone larvale), fisiologico (anautogenia/autogenia,eterodinamia/omodinamia),ecologico (adattamento ad acque più o meno inquinate), etologico (zoofilia/antropofilia,eurigamia/stenogamia); tali forme sono state indicate con vari nomi: pipiens s.s. (o forma "rurale"), autogenicus, molestus (o forma "urbana"). Autogenicus Roubaud (1) è stato sinonimizzato con molestus Forskål (2);più recentemente(3)quest'ultimo taxon è stato sinonimizzato con pipiens s.s. D'altra parte l'esistenza di barriere antiibridazione a livello precopula tra pipiens e molestus=autogenicus(4,5),ha fatto considerare questi due taxa come semispecie (6) o come specie distinte (7).

Ricerche elettroforetiche sul differenziamento genetico di pipiens e molestus, condotte su popolazioni di diversa origine geografica (5,8,9), hanno portato a risultati contrastanti. Secondo Pasteur (8), che ha studiato popolazioni della Francia meridionale sulla base di 12 loci, le due forme appartengono ad un unico taxon, caratterizzato da popolazioni grandi e da focolai larvali epigei; i focolai ipogei verrebbero colonizzati occasionalmente da individui di queste popolazioni, dando origine a sub-popolazioni isolate con frequenti fenomeni di deriva genetica. Il termine molestus non corrisponderebbe quindi a un taxon valido. Al contrario Miles e Paterson (9), che hanno confrontato sulla base di 18 loci popolazioni di molestus australiane e di pipiens s.s. inglesi, trattano questi taxa come specie distinte. Urbanelli et al.(5) hanno analizzato le relazioni di affinità genetica esistenti tra popolazioni di varie regioni italiane (dal Sud Tirolo alla Calabria), con diversi gradi di adattamento all'uomo e al suo ambiente. Sono stati evidenziati tre clusters distinti di cui due, geneticamente più differenziati (distanza genetica media = 0,05), corrispondono rispettivamente a pipiens s.s. e a molestus, mentre il terzo comprende popolazioni morfologicamente, biologicamente e geneticamente intermedie. Le popolazioni di quest'ultimo tipo, apparentemente ben adattate almeno nelle regioni con inverni miti a focolai larvali epigei con acque inquinate, sarebbero il risultato di fenomeni di ibridazione e introgressione tra pipiens e molestus.Nel la presente nota viene analizzata la struttura genetica di popolazioni di Cx.pipiens provenienti da varie località egiziane e israeliane. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli precedentemente osservati in popolazioni italiane (5).

Materiali e Metodi

Sono state studiate 8 popolazioni provenienti dall'Egitto (Alessandria;Abu Heif,Sharqyia; Cairo; El Nazla,El Fayum; Quseir,Mar Rosso; Marsa Alam,Mar Rosso; Kom Ombo; El Seyl,Assuan) e 4 da Israele (Kefar Yuval; Qiryat Shemona; Beth Shemesh; Eilat). I focolai larvali di queste popolazioni avevano caratteristiche ecologiche diverse (epigei o ipogei; acqua da pulita a variamente inquinata; vegetazione presente o assente; densità larvale bassa o alta). Sono stati analizzati 17 loci (α-Gpdh,Mdh-1,Mdh-2,Me-1,Me-2,Idh-1,Idh-2,6Pgdh,G3pdh,Got-1, Got-2, Hk-1, Adk,Pgm, Ald,Tpi e Gpi) mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido. La variabilità genetica è stata stimata utilizzando i seguenti parametri: eterozigosi media attesa per locus (He), proporzione di loci polimorfici col criterio dell'1% (P), numero medio di alleli per locus (A). Il differenzia-

mento genetico tra le popolazioni è stato stimato mediante gli indici proposti da Nei (10) di identità e distanza genetica standard.

Risultati e Conclusioni

Nelle popolazioni egiziane e israeliane i parametri di variabilità genetica considerati hanno mostrato i seguenti valori: He da 0,07 a 0,14 (media 0,12), P da 0,35 a 0,59 (media 0,47), A da 1,35 a 1,76 (media 1,54). La variabilità genetica media osservata in Italia é più elevata: He=0,17 , P=0,58 , A=1,81 (5), ma sia in questo paese che in Francia (7) le popolazioni di molestus sono in media meno variabili di quelle di pipiens, con valori di poco superiori a quelli trovati nel presente studio.

Le popolazioni egiziane sono risultate notevolmente omogenee dal punto di vista genetico (D medio=0,013), così come quelle israeliane (D medio=0,011). In questi due paesi non sembrano pertanto essere presenti due forme geneticamente differenziate come lo sono le popolazioni di pipiens e molestus in Europa.

La distanza genetica media tra i campioni dell'Egitto e di Israele é 0,028. Le popolazioni egiziane e israeliane di Cx.pipiens sono risultate geneticamente più affini alle popolazioni italiane di molestus (D medio=0,023) che a quelle di pipiens (D medio=0,056). Questo dato corrisponde sostanzialmente con quanto osservato a livello morfologico e biologico.

BIBLIOGRAFIA

1. ROUBAUD, E. 1933. Essai synthétique sur la vie du moustique commun, Culex pipiens. Ann.Sc.Nat.Zool. 16:5-168.
2. FORSKÅL, P. 1775. Descriptiones animalium, avium, amphibiorum, piscium, insectorum,vermium,quae in itinere orientali observavit.Molleri, Hauniae.
3. HARBACH, R.E., HARRISON, B.A. & GAD, A.M. 1984. Culex (Culex) molestus Forskål (Diptera: Culicidae):neotype designation, description, variation, and taxonomic status. Proc.ent.Soc.Wash. 86:521-541.
4. SPIELMAN, A. 1964. Studies on autogeny in Culex pipiens populations in nature. I. Reproductive isolation between autogenous and anautogenous populations. Am.J.Hyg. 80:175-183.
5. URBANELLI,S., CIANCHI,R., PETRARCA,V., SABATINELLI,G., COLUZZI,M. & BULLINI, L. 1981. Adaptation to the urban environment in the mosquito Culex pipiens (Diptera,Culicidae). In: Ecologia (A.Moroni, O.Ravera, A.Anelli, eds.) Zara, Parma, pp.305-316.
6. BULLINI, L., URBANELLI,S., CIANCHI,R. & COLUZZI,M. 1982. Genetic divergence and taxonomy of European Culex pipiens. Proc.V Int.Congr.Parasitol.,Toronto, 358.
7. MILES, S.S. 1977. Laboratory evidence for mate recognition behaviour in a member of the Culex pipiens complex (Diptera, Culicidae). Aust.J.Zool. 25:491-498.
8. PASTEUR, N. 1977. Recherches de génétique chez Culex pipiens pipiens L. Polimorphisme enzimatique, autogénèse et resistance aux insecticides organophosphorés. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier.
9. MILES, S.J. & PATERSON, H.E. 1979. Protein variation and systematics in the Culex pipiens group of species. Mosquito Systematics 11:187-193.
10. NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. Am.Nat. 106:283-292.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 377-380

ISOLAMENTO E COMPORTAMENTO IN VIVO DELL'AGENTE EZIOLOGICO DELLA LEISHMANIOSI CUTANEA IN ITALIA

E. Pozio, L. Gradoni e M. Gramiccia

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'isolamento ed il mantenimento in vivo ed in vitro di leishmanie prelevate da lesioni cutanee di pazienti in Italia, hanno sempre rappresentato un problema per coloro che hanno tentato di studiare questo parassita (1). A causa della comune convinzione dell'esistenza di un'unicità di specie responsabile della leishmaniosi cutanea nel Bacino del Mediterraneo, molti autori hanno utilizzato per i loro studi parassiti non isolati in Italia e che molto probabilmente appartenevano alle specie Leishmania tropica che facilmente si coltiva in vitro e L.major che facilmente si coltiva sia in vivo che in vitro. Per poter giungere all'identificazione dell'agente eziologico della leishmaniosi cutanea in Italia e poter studiare l'epidemiologia, che presenta ancora numerosi punti oscuri, il primo ostacolo che doveva essere superato era quello di mantenere in vivo e/o in vitro il parassita.

Nel corso di alcuni anni abbiamo avuto l'opportunità di prelevare materiale bioptico da lesioni cutanee di 14 pazienti delle province di Teramo, Pescara e Cosenza. Il materiale prelevato dalla lesione, omogenato in soluzione fisiologica é stato inoculato in vari animali di laboratorio (criceti inbred LHC, PD4, LSH; criceti outbred; topi inbred Balb/c, C3H, DBA; topi outbred PO; gerbilli; ratti wistar): intraperitoneo, intravena caudale (solo nei topi), intracute nel muso, zampe, base della coda e dorso. Ai criceti inbred, outbred, topi outbred PO e ai ratti wistar é stato somministrato cortisone acetato (200mg/Kg ogni 3 giorni) per tre volte; successivamente la somministrazione di cortisone era subordinata alle condizioni dell'animale che veniva trattato solo se non presentava un marcato deperimento.

Solo in criceti inbred LHC, trattati con cortisone, é stato isolato il parassita (Tabella); la stessa linea inbred non trattata con cortisone presenta invece un'infezione non patente, che si manifesta solo dopo somministrazione di cortisone. I parassiti sono localizzati esclusivamente negli organi e tessuti interni (milza, fegato e midollo osseo) con un'infezione simile a quella provocata da parassiti di L.infantum isolati da forme viscerali umane, canine e murine. Sette ceppi isolati in criceti LHC sono stati mantenuti con passaggi seriali nella stessa linea di criceti, trattando gli esemplari con cortisone nei primi passaggi. Dopo il I passaggio i parassiti di un isolato hanno infettato anche criceti outbred trattati con cortisone (tabella). Dopo il II passaggio 7

TABELLA – CEPPI DI LEISHMANIA OTTENUTI DA LESIONI CUTANEE UMANE:

ISOLAMENTO ED ADATTAMENTO IN VIVO

ANIMALI DI LABORATORIO	N.CEPPI ISOLATI/INOCULATI		N.CEPPI ADATTATI/INOCULATI					
			DOPO IL I PASSAGGIO		DOPO IL II PASSAGGIO		DOPO IL III PASSAGGIO	
	senza cortisone	con cortisone	senza cortisone	con cortisone	senza cortisone	con cortisone	senza cortisone	con cortisone
Criceti inbred PD4	0/1	0/1	0/1	0/1				
Criceti inbred LSH	0/1	1/2 (1)	0/1	0/1				
Criceti inbred LHC	7/7 (2)	7/7	1/7 6/7 (2)	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
Criceti outbred	0/4	0/5	0/5	1/5	0/5	3/5	1/4	4/4
Topi outbred PO	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	1/2

(1) In un esemplare si é manifestata sul muso una lesione cutanea in cui erano presenti rari amastigoti.
(2) Infezione non patente; l'infezione diviene patente solo dopo trattamento con cortisone.

ceppi su 7 hanno provocato un'infezione patente nei criceti LHC senza la necessità di somministrare cortisone; 3 ceppi su 5 hanno infettato criceti outbred trattati con cortisone (Tebella). Dopo il III passaggio 4 ceppi su 4 hanno infettato criceti outbred trattati con cortisone, tra questi un ceppo ha anche infettato topi outbred PO trattati con cortisone e criceti outbred senza cortisone.

Il mantenimento in vivo dell'agente eziologico della leishmaniosi cutanea in Italia, permette di poter sviluppare gli studi su questo parassita. La viscералizzazione del parassita negli animali di laboratorio fornisce una spiegazione su alcuni casi di leishmaniosi cutanea seguiti dalla forma viscerale della malattia (2)(3) e avvalla la sua appartenenza al gruppo L.infantum come confermato dalla tipizzazione isoenzimatica (4)(5). Attualmente l'unico elemento in nostro possesso per distinguere l'agente eziologico della forma cutanea da quello della forma viscerale, é che mentre il primo é possibile isolarlo solo in criceti inbred LHC, trattati con cortisone, il secondo attecchisce facilmente sia in vivo che in vitro.

BIBLIOGRAFIA

1.POZIO, E., GRADONI, L., GRAMICCIA, M., BETTINI, S. & PAMPIGLIONE, S. 1982. The "puzzle" of cuteneous leishmaniasis epidemiology in Italy. Acta Mediterranea di Patologia Infettiva e Tropicale 1:109-115.

2.PAMPIGLIONE, S. 1971. Leishmaniosi cutanea seguita da Kala-Azar in adulto, in provincia di Teramo (Abruzzi). Parassitologia 13:231-239.

3.SCHILIRÓ, G., RUSSO, A., MUSUMECI, S. & SCIOTTO, A. 1978. Visceral leishmaniasis following a skin lesion in a six-year-old Sicilian girl. Trans.Roy.Soc. Trop.Med.Hyg. 72:656-657.

4.POZIO, E., GRAMICCIA,M., GRADONI, L. & AMERIO P. 1985. Isolation of the agent causing cutaneous leishmaniasis in Italy and its visceralization in inbred hamsters. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 79 (in stampa).

5.GRAMICCIA, M., GRADONI, L. & POZIO, E. 1985. Il genere Leishmania in Italia. Parassitologia (in stampa).

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 381-384

IL GENERE LEISHMANIA IN ITALIA

M. Gramiccia, L. Gradoni & E. Pozio

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

In Italia la leishmaniosi viscerale (LV) e la leishmaniosi cutanea (LC) sono presenti in forma endemica con una diffusione maggiore della LV in Sicilia e nel versante tirrenico della penisola e della LC sul versante adriatico (1).

Durante indagini da noi condotte in territorio nazionale sulle due malattie sono stati ottenuti 74 isolati di Leishmania che, tipizzati mediante l'analisi elettroforetica degli isoenzimi, ci hanno permesso di identificare i parassiti appartenenti a tale genere in Italia.

I ceppi, ottenuti da sei regioni italiane dove le leishmaniosi sono endemiche, sono stati isolati: 10 dall'uomo (4 da LV e 6 da LC), 52 dal cane, 4 dal ratto nero (Rattus rattus), 1 dalla volpe (Vulpes vulpes) e 7 da gechi (Tarentola mauritanica e Cyrtodactylus kotschyi).

La tipizzazione é stata effettuata mediante analisi elettroforetica su gel d'amido di 9-16 enzimi (PGM,PGI,GOT,G6PD,6PGD,ME,MDH,IDH,NH,MPI,PK,PEP.D,ALAT, SOD,GD,ES)(2,3). Sono stati utilizzati 6 ceppi di riferimento internazionali: MRHO/SU/59/NealP per L.major, MHOM/ASIA/74/Ackerman-LV514 per L.tropica, MHOM/ET/72/L100 per L.aethiopica, MHOM/IN/80/DD8 per L.donovani, MHOM/FR/78/LEM75 per L.infantum e RTAR/FR/78/LEM124 per L.tarentolae.

I risultati dell'analisi elettroforetica, riportati in Tabella 1, hanno mostrato che sui 74 ceppi di Leishmania esaminati, 56 sono risultati identici a L.infantum s.st., 8 differiscono da L.infantum s.st. per un enzima (NH), 3 differiscono da L.infantum s.st. per tre enzimi (GOT,MDH,NH) e 7 sono risultati identici a L.tarentolae. Sono stati quindi individuati 4 zimodemi di Leishmania: L.infantum s.st., isolato prevalentemente da casi a patologia viscerale; L.infantum NH variante (m_e = 130) isolato, al contrario, soprattutto da casi di LC; L.infantum GOT,MDH,NH variante (m_e =113,112,137 rispettivamente) isolato esclusivamente dal cane e dalla volpe e L.tarentolae , ottenuto solamente da gechi, che differisce da L.infantum s.st. per 8 sui 9 enzimi saggiati.

Tali risultati ci permettono di confermare il cane quale serbatoio principale della LV e , in aggiunta, di incriminare R.rattus quale serbatoio selvatico della malattia. Viene inoltre esclusa L.tropica dall'eziologia della LC confermando l'ipotesi che nell'area centro-occidentale del Mediterraneo tale malattia é provocata da ceppi dermotropi di L.infantum s.l.(4). Dall'analisi dei dati epidemiologici che caratterizzano i focolai da cui originano gli isolati di Leishmania gli zimodemi più diffusi sono risultati L.infantum s.st. e L.infantum

NH variante. Tuttavia, il primo appare prevalente nei focolai tirrenici caratterizzati dalla presenza di LV e dall'elevata densità di Phlebotomus perniciosus mentre il secondo predomina nelle regioni adriatiche dove é diffusa la LC ed il probabile vettore e P.perfiliewi.

Tabella 1. Caratterizzazione enzimatica di 74 ceppi di Leishmania

Sigla	Ospite	Patologia	Zimodema
ISS [(1)] 8-11, 13-15,17,18, 20,26,28-30, 32-35,37-41, 43,52,55,58, 59,61-67,72-76,78,80,81, 83,92,96,97, 102	CANE	Viscerale	L.infantum s.st.
ISS 3-5,12	RATTUS RATTUS	Viscerale	
ISS 16,82,84	UOMO	Viscerale	
ISS 53	UOMO	Cutanea	
ISS 98-101, 103	UOMO	Cutanea	L.infantum NH variante
ISS 54, 60	CANE	Viscerale	
ISS 7	UOMO	Viscerale	
ISS 1,2	CANE	Viscerale	L.infantum GOT,MDH,NH variante
ISS 6	VULPES VULPES	Viscerale	
ISS 19,21-23, 31,36	TARENTOLA MAURITANICA	Ematica	L.tarentolae
ISS 24	CYRTODACTYLUS KOTSCHYI	Ematica	

(1) ISS: ceppi mantenuti nella criobanca del Laboratorio di Parassitologia, reparto di Protozoologia, Istituto Superiore di Sanità.

BIBLIOGRAFIA

1. PAMPIGLIONE, S. & BETTINI, S. 1981. Bibliografia italiana delle leishmaniosi dalle origini al 1980. Ann.Ist.Sup.Sanità 17: 2-50.
2. MAAZOUN,R., LANOTTE, G., PASTEUR. N., RIOUX, J.A., KENNOU, M.F. & PRATLONG, F. 1981. Ecologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. 16.Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévennes, Côte d'Azur, Corse et Tunisie. Ann.Parasitol.hum.comp. 56: 131-146.
3. MILES, M.A., LANHAM, S.M., DE SOUZA, A.A. & POVOA, M. 1980. Further enzymic characters of Trypanosoma cruzi and their evaluation for strain identification. Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg. 74: 221-237.
4. RIOUX, J.A., LANOTTE, G., MAAZOUN, R., PERELLO, R. & PRATLONG,F. 1980. Leishmania infantum Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. C.R.Acad.Sc.Paris 291: 701-703.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp.385-386

STATO ATTUALE DELLA TASSONOMIA DI LEISHMANIA NEL BACINO DEL MEDITERRANEO

L. Gradoni, M. Gramiccia e E. Pozio

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La tipizzazioe di alcune centinaia di isolati di Leishmania da parte di centri nazionali ed internazionali di referenza ha fornito dati sufficienti a tracciare un quadro riassuntivo dello stato tassonomico di questi parassiti nel bacino del Mediterraneo. Il lavoro svolto da tali centri é stato recentemente discusso al Colloquio Internazionale sulla Tassonomia e Filogenesi di Leishmania tenuto a Montpellier (1).

Leishmaniosi viscerale (LV)

La distribuzione della LV nel Mediterraneo coincide sostanzialmente con quella di L.infantum . Questa specie appare molto omogenea, ed il suo caratteristico zimogramma é stato rilevato in isolati dall'uomo e dal cane in molti paesi Mediterranei. Il parassita é stato anche isolato da mammiferi selvatici e flebotomi. A dispetto della sua omogeneità alcune varianti enzimatiche di questa specie sono state messe in evidenza in isolati da casi di LV umana e canina in Italia, Spagna e Francia.

Leishmaniosi cutanea (LC)

A differenza della LV la tipizzazione biochimica ha messo in evidenza una molteplicità di specie agenti di questa infezione diffusa in tutti i paesi mediterranei (2). L.tropica, agente del classico bottone d'Oriente (bottone secco) mostra una distribuzione limitata alla fascia orientale del Mediterraneo. In Europa é stata segnalata finora solo in Grecia (3). Il parassita non é mai stato isolato da animali, domestici o selvatici, confermando così la natura antroponotica della malattia. L.major, agente del cosiddetto'bottone umido' ha invece una vasta distribuzione, essendo presente in tutta l'Africa del nord e in Medio Oriente. Oltre che dall'uomo il parassita é stato isolato da roditori selvatici appartenenti ai generi Meriones e Psammomys (Gerbillidi). Questo fatto stabilisce definitivamente la natura zoonotica di questa infezione.
E' ormai evidente l'assenza di queste due specie dermotrope di Leishmania nel Mediterraneo centro-occidentale. Tutti gli isolati ottenuti finora da decine di casi di LC di quest'area sono risultati infatti appartenere a L.infantum s.l. E' interessante notare come talvolta si tratti di parassiti apparentemente identici alla specie che causa la LV, mentre il più delle volte sono risul-

tati parassiti varianti da essa per 1-2 enzimi. Inoltre tali varianti (isolate in Francia, Spagna, Italia e Algeria) sembrano differire da un'area all'altra. Attualmente appare prematuro fare ipotesi dul ciclo vitale di questi parassiti.

Per riassumere, mentre per alcuni paesi l'agente eziologico delle leishmaniosi appare essere unico, per altri (per esempio Tunisia e Israele) il quadro é notevolmente più complicato: la sola LC appare infatti causata da ben tre specie diverse di parassiti, tutte a differente epidemiologia.

BIBLIOGRAFIA

1. AUTORI VARI. 1984. Colloque International sur la Taxonomie et la Phylogenèse des Leishmania , Montpellier, 2-5 luglio 1984.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1984. The leishmaniases. Techn.Re.Ser.701,WHO, Geneva.
3. GARIFALLOU, A., SCHNUR, L.F., STRATIGOS, J.D., HADZIANDONIOU M., SAVIGOS, M., STAVRIANEAS, N. & SERIE, C. 1984. Leishmaniasis in Greece.II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. Ann.trop.Med.Parasit. 78: 369-375.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 387-390

TIPIZZAZIONE ISOENZIMATICA DI CEPPI DI PLASMODIUM BERGHEI E PLASMODIUM YOELII

O. Casaglia (a), E. Dore (b), C. Frontali (b), P. Zenobi (a) & D. Walliker (c)

(a) Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Laboratorio di Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(c) Istituto di Animal Genetics, University of Edimburgh

Gli isolati di plasmodi malarici sono ottenuti da un ospite infettatosi naturalmente, ed in conseguenza di ciò non sempre sono geneticamente omogenei contenendo assai spesso specie diverse. Per questo motivo negli ultimi anni sono stati messi a punto metodi elettroforetici per l'analisi degli isoenzimi che permettono di determinare l'esatta composizione di un isolato. (1). Nel nostro caso è stata esaminata la linea P. berghei NK65C ottenuta dalla Wellcome Research di Londra confrontandola con cloni di riferimento.

Nella tab. 1 vengono riportate le linee ed i cloni di parassiti che sono stati esaminati ed i metodi elettroforetici impiegati per la determinazione delle varianti dell'enzima GPI,

Tabella 1.

PARASSITI ESAMINATI

a) LINEA DI PARASSITI ORIGINARIAMENTE CLASSIFICATI COME P. BERGHEI

-NK65C-Linee non clonate
a) London I
b) London II

- NK65C - Cloni

a) Cloni A-B-C-D- ottenuti dalla linea London II

b) CLONI DI RIFERIMENTO (EDINBURGO Prof. WALLIKER)

- P. berghei ANKA
- P. yoelii yoelii 17x,33x,A/C.
- P. yoelii nigeriensis N67.

METODI ELETTROFORETICI IMPIEGATI

A) Elettroforesi su acetato di cellulosa (ph 8.6)

B)isoelectrofocusing su polyacrilamide (range di ph 3.5-9.5)

La (Fig. 1) mostra i patterns elettroforetici ottenuti su acetato di cellulosa delle linee in esame e dei cloni di riferimento.

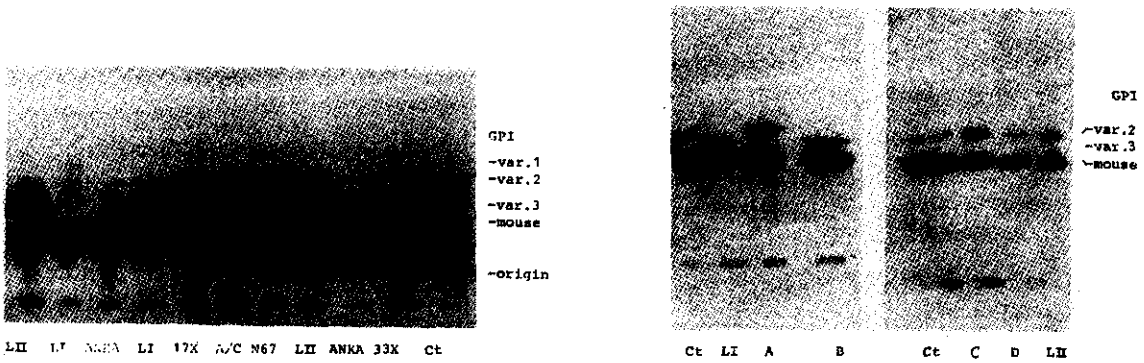


Fig. 1-Elettroforesi su acetato di cellulosa delle linee in esame e dei cloni di riferimento.

Le forme di GPI trovate sono state comparate con quelle dei cloni di riferimento. La numerazione di ciascuna variante segue quella descritta da Carter (2). La linea London I possiede, come atteso, GPI-3 tipica di tutte le linee di P.berghei, inclusa ANKA, e viceversa la linea London II ed i cloni da essa ottenuti A-C-D possiedono GPI-2 come quelli di referenza per P. yoelii (33X,A/C, N67) mentre il clone B possiede GPI-3 e può essere identificato come P. berghei. Se ne deduce quindi che la linea London II è una linea mista dato che sono stati ottenuti da essa cloni appartenenti a specie diverse e che, contrariamente a quanto atteso, in essa prevale P. yoelii rispetto a P. berghei.

Nella (Fig.2) sono riportati i risultati della analisi degli stessi campioni con l'isoelectrofocusing

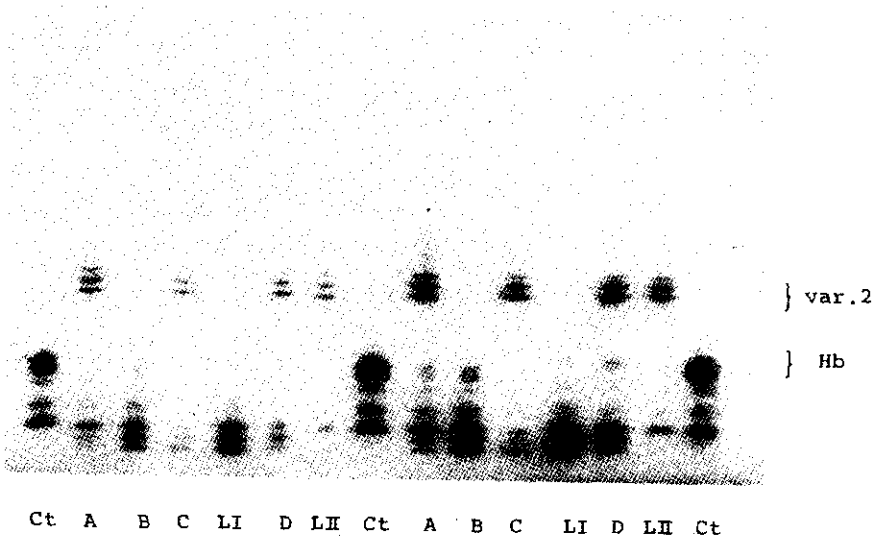


Fig. 2- Isoelectrofocusing su gel di polyacrilamide (range di ph. 3.5-9.5)

Le differenze fra la linea London I e London II sono confermate così come quelle fra il clone B ed i cloni A-C-D. Si nota però che in queste condizioni la variante GPI-3 (P.berghei) del parassita non si separa da quella dell'ospite e che la GPI-2 possiede un punto isoelettrico notevolmente più basso che conferma la sua relativamente alta mobilità elettroforetica in acetato di cellulosa a pH8.6

Nella(Fig.3) sono mostrati i patterns elettroforetici ottenuti su acetato di cellulosa della linea London I e della linea London II al 2° 48° 153° passaggio dopo trasmissione in zanzara.

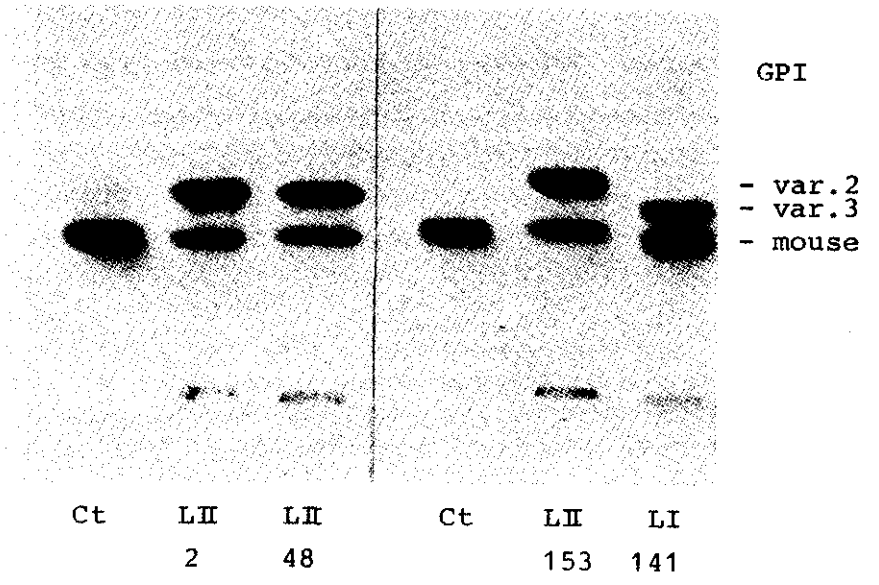
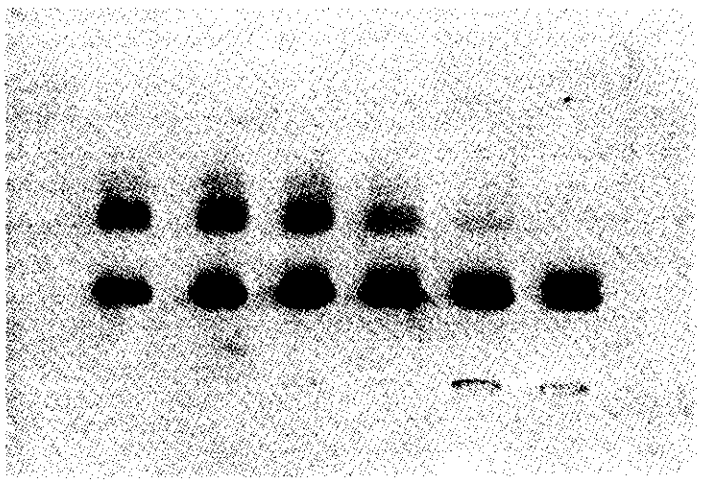


Fig. 3- Elettroforesi su acetato di cellulosa delle linee London I e London II attraverso passaggi in topini.

L'identità del pattern ottenuto per London II nel tempo sta a significare che nel corso di passaggi attraverso siringa non si sono verificati grossi effetti selettivi o contaminazione. Tali risultati però non escludono la presenza di una minoranza di parassiti di P. berghei nel materiale in esame che non viene rivelata elettroforeticamente. Per verificare il limite di sensibilità del metodo sono state fatte in vitro miscele di estratti di due cloni di riferimento P. berghei ANKA e P. yoelii N67. I risultati ottenuti mostrano (Fig. 4) che il componente minore nella miscela può essere rivelato elettroforeticamente soltanto quando è presente in quantità superiore al 20% del materiale totale. Evidentemente la linea London II che originariamente era P. berghei NK65C nel momento in cui ci è pervenuto era prevalentemente P. yoelii e conteneva solo<20% di P. berghei che non si sarebbe visto se non fosse stato fatto il clonaggio. Da altri studi da noi eseguiti sappiamo d'altronde che l'infettività verso le zanzare di P. berghei è assai inferiore a quella di P. yoelii. E' quindi molto probabile che nel passaggio per zanzara fatto prima di essere spedito la linea London II, che inizialmente era in maggioranza P.berghei abbia subito un effetto selettivo a favore di P. yoelii. Infatti la pressione selettiva introdotta da successivi passaggi in zanzara tende ad eliminare quei ceppi che hanno una ridotta infettività. E' possibile quindi in conseguenza di ciò che il contaminante presente inizialmente nell'isolato in quantità minore, perda più lentamente del componente principale l'infettività, avvantaggiandosi così selettivamente. Da questi risultati si può quindi concludere che: 1) il metodo elettroforetico impiegato risolve abbastanza soddisfacentemente la GPI del topo e le varianti 1-2-3- del parassita, ma non mette in evidenza contaminazioni presenti nei cam-

pioni al di sotto del 20%; 2) l'electrofocusing conferma la differenza di mobilità elettroforetica osservata a pH 8.6 fra le varianti GPI 1-2, ma non separa la variante GPI-3 da quella dell'ospite.



ANKA	0	20	40	60	80	100	%
N67	100	80	60	40	20	0	%

Fig. 4- Elettroforesi su acetato di cellulosa di miscele in vitro fra cloni di riferimento ANKA ed N67.

La messa a punto di questi metodi ci ha permesso di risalire alla storia della linea London II, mettendo ancora una volta in evidenza la necessità di utilizzare sempre linee clonate e ben caratterizzate.

BIBLIOGRAFIA

1. R. Killick- Kendrick, W. Peters 1978- Rodent Malaria Accademic Press.
2. R. Carter - 1978. Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites Plasmodium berghei, P. yoelii, P. winckey and P. chabaudi by starch gel electrophoresis. Parasitology 76, 241-267.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 391-394

PROBABILE ANNULLAMENTO DELLA CLOROCHINO-RESISTENZA NEL PLASMODIUM BERGHEI INOCULATO IN MUS MUSCULUS PRECEDENTEMENTE PANIRRADIATO CON DOSI SUBLETALI (300_γ) DI RAGGI X

E. Brambilla e L. Galli-Mandarini

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia, Pavia

Riassunto. - Nel presente lavoro viene osservato un probabile annullamento della clorochino-resistenza nel Plasmodium berghei ottenuto mediante panirradiazione (300_γ) dell'ospite (topo) sulla base di un'ipotesi di lavoro riguardo il meccanismo d'azione della clorochino-resistenza stessa.

Summary (Probable loss of cloroquine-resistance of Plasmodium berghei inoculated in X rays-treated mice (300_γ). - The coupling of physical parasites-depressing treatments (thermic stess at +35°C and whole body irradiation at 300_γ before infection) to chloroquine administration in mice Sw/W with chloroquine-resistant P.berghei strain has shown a notable reduction of drug request. Furthermore effective dose found at 300_γ is similar for chloroquine-sensible and resistant strain. The fact demonstres a probable loss of resistance.

Introduzione

L'abbinamento di trattamenti fisici parassito-depressivi (esposizione a +35°C per tutta la durata dell'infezione e panirradiazione a dose singola non letale (300_γ) di topi infettati con Plasmodium berghei) alla terapia sperimentale antimalarica con clorochina, ha consentito di osservare, in entrambi i casi una significativa riduzione della richiesta di farmaco terapeuticamente attivo. Infatti le dosi terapeutiche efficaci sono passate da 5 a 1,2 mg/Kg e da 5 a 0,6 mg/Kg rispettivamente per ambedue i trattamenti (1). L'importanza dei risultati ci ha indotto ad intraprendere due tipi di sperimentazioni consequenziali: 1) abbianre questi trattamenti con la terapia clorochinica contro infezioni da ceppi di P.berghei clorochinoresistenti, nell'intento di riuscire a somministrare dosi terapeutiche subletali; 2) verificare una nostra ipotesi di lavoro sul probabile annullamento della clorochino-resistenza mediante panirradiazione dell'ospite (1) basata su un'altra ipotesi circa il meccanismo d'azione della clorochino-resistenza stessa (2,3). Possiamo formulare il concetto nel seguente modo: la clorochino-resistenza è dovuta ad un errore metabolico del parassita a livello della degradazione dell'emoglobina a causa del quale la conversione dell'acido ferriemico in emozoina è rallentata rispetto alla formazione dello stesso dalla emina. In pratica, la sequenza di reazioni: emoglobina ⟶ emina ⟶ acido ferriemico ⟶ emozoina, è molto spostata verso l'a-

cido ferriemico che accumulatosi forma dei complessi con la clorochina (ferriemato di clorochina) terapeuticamente inattivi come dimostrato in vitro (2, 3). Ora è noto (4) che la panirradiazione determina nell'animale alterazioni sensibili a livello emoglobinico nella sintesi dell'eme, della globina e dei parametri correlati. Appare possibile che queste alterazioni possono interferire nelle sequenze metaboliche degradative dell'emoglobina e, o non portare più alla formazione di acido-ferriemico, o provocare una sua sensibile diminuzione. In questi casi, nel ceppo resistente non avverrebbe più l'accumulo dell'acido e la formazione del complesso terapeuticamente inattivo (acido ferriemico-clorochina) non sarebbe più possibile. Il ceppo diventerebbe farmaco sensibile rispondendo, presumibilmente, alle stesse dosi del controllo clorochino-sensibile.

Materiali e Metodi

Come parassita sono stati usati due ceppi di P.berghei Londra$_{K173}$ S e R,uno farmaco sensibile ed uno farmaco resistente ottenuto in laboratorio sottoponendo in vivo i parassiti a pressione selettiva per 4 mesi mediante dieta clorochinata (0,008%) degli ospiti Mus musculus (Sw/W) ♀♀, usati anche nelle sperimentazioni. La valutazione del grado di clorochino-sensibilità o resistenza e quindi di risposta alle dosi utilizzate nella ricerca è stata effettuata mediante il Test di Hawking (5). Esso consente di costruire in logaritmica una curva dose-risposta che raggiunge livelli di significatività terapeutica quando, al 5° giorno dalla inoculazione e dopo 4 giorni di somministrazione di una serie di dosi a 10 animali ciascuna, permette di osservare una % media di abbattimento dei parassiti, rispetto ai controlli, pari al 98% o più con un residuo del 2% o meno di parassiti nel sangue. L'esposizione dei topi a +35° si è ottenuta mantenendo gli animali in apposite camerette termostate per tutta la durata dell'infezione. La panirradiazione è stata effettuata esponendo singoli animali alla dose di 300$_r$.

Risultati

Nei nostri esperimenti abbiamo saggiato sul ceppo supposto farmaco-resistente le dosi di: 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 5; 10; 20; 40 mg/Kg di farmaco rilevando resistenza fino alla dose di 20 mg/Kg e sensibilità alla dose di 40 mg/Kg (DL 50 per il topo). Successivamente abbiamo inoculato questo ceppo in animali esposti immediatamente prima allo stress termico ed ai raggi X saggiando dosi di: 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 5; 10; 20; 40 mg/Kg. I risultati ottenuti con il Test di Hawking (Tabella 1) sembrano confermare le aspettative ipotizzate nell'introduzione, infatti: ambedue i trattamenti consentono di ottenere una riduzione della dose efficace, ora perfettamente tollerata dagli animali che passa da 40 a 10 mg/Kg nei soggetti esposti allo stress termico e da 40 a 0,6 mg/Kg in quelli trattati con radiazioni ionizzanti. In quest'ultimo caso la coincidenza del valore trovato (0,6 mg/Kg) con quello osservato nelle medesime condizioni sperimentali per gli animali di controllo incoulati con ceppo farmaco sensibile, suggerisce che si possa essere verificato un annullamento della farmaco-resistenza con meccanismo d'azione presumibilmente simile a quello ipotizzato

nella parte introduttiva del lavoro.

Tabella I. - Test di Hawking. Percentuali di parassitemia residua (P.R.) e dose terapeutica efficace (D.T.E.) in topi infettati con P.berghei, clorochino-sensibile (S) e resistente (R) ed esposti a +35°C ed a 300_r.

Dosi mg/Kg	Controllo S % P.R.	D.T.E.	Controllo R	+35°C S	300_r S	+35°C R	300_r R
0,15	82,3		97,2	42,8	31,6	61,3	35,8
0,30	64,5		85,4	36,5	10,2	45,8	12,1
0,60	22,8		86,2	9,9	1,2 0,6	21,3	2 0,6
1,2	7,3		67,3	1,8 1,2	0,9	10,8	1,1
5	1,6	5	44,2	1,6	0,6	5,6	0,7
10	1,1		23,3	0,9	0,1	1,9 10	0,2
20	0,8		15,8	0,3	0,06	1,6	0,005
40	0,09		1,9 40	0,04	0,01	0,3	0,002

Discussione

I risultati ottenuti nella presente ricerca rivestono un particolare interesse sperimentale relativamente al problema della clorochino-resistenza. Tuttavia la loro trasferibilità in medicina umana è per ora impensabile in quanto i dati orientativi, e ottenuti in vivo nei topi, dovrebbero essere replicati sia su di un più ampio campione, sia in vitro mediate prove respirometriche con apparecchio di Warburg o con monitore biologico di ossigeno.

BIBLIOGRAFIA

1. BRAMBILLA, E., GALLI, L. e CAPROTTI, M. 1974. Effetto di trattamenti fisici parassito-depressivi sull'entità della dose terapeutica efficace di clorochina nel Mus musculus infettato con Plasmodium berghei. Riv. Parass. 4: 227-244.
2. PHIFER, K.O., YELDING, K.L. & COHN, S.N. 1966. Investigation of the possible relation of ferriheme acid to drug resistance in Plasmodium berghei. Expl. Paras. 19: 102-109.
3. SCHUELER, F.W., & KANTRELL, W.F. 1969. Antagonism of the antimalarial action of chloroquine by ferrihemate and an hypothesis for the mechanism of chloroquine resistance. J. Pharm. Exp. Ther. 143: 278-281.
4. KLEIN, J.R. 1969. Heme and globin synthesis and related parameters in blood from the irradiated mice. Rad. Res. 37: 50-56.
5. HAWKING, K. 1966. Chloroquine resistance in Plasmodium berghei. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 287-293.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 395-398

AZIONE DI DUE ANTIBIOTICI A STRUTTURA AMINOGLICOSIDICA SULL'INFEZIONE DA *PLASMODIUM BERGHEI* IN *MUS MUSCULUS*

E. Brambilla e L. Galli-Mandarini

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia, Pavia

Riassunto. - Viene studiata la risposta a due antibiotici a struttura aminoglicosidica (Gentamicina e Sisomicina) dell'infezione sperimentale da *Plasmodium berghei* nel topo. Vengono trovate le dosi efficaci per due ceppi letali di parassita ($Roma_{GB67}$ e $Londra_{K173}$) a differenti caratteristiche di virulenza.

Summary (Action of aminoglicosidic antibiotics on *Plasmodium berghei* infection in *Mus musculus*). - The action of two aminoglicosidic antibiotics (Gentamicina and Sisomicina) on infection with *P.berghei* in *Mus musculus* were studied. Therapeutical effective doses were found for two lethal strains of parasaites ($Roma_{GB67}$ and $Londra_{K173}$) at different features of virulence. Hawking's tests of 2% was used for analysis.

Introduzione

La crescente importanza del problema malarico e l'indesiderato ma purtroppo frequente fenomeno della farmacoresistenza (Clorochinoresistenza), (1, 2) impongono lo studio di farmaci nuovi e alternativi. Il presente lavoro fornisce i risultati ottenuti in un primo approccio sperimentale orientativo somministrando antibiotici a struttura aminoglicosidica (Gentamicina e Sisomicina) a topi infettati con ceppi di *P.berghei* letali e a differente virulenza.

Materiali e Metodi

I ceppi di parassiti usati nella sperimentazione sono stati: $Londra_{K173}$ (standard) e $Roma_{GB67}$. Essi, oltre a diversificazioni parassitologiche, morfologiche e cliniche presentano in particolare tempi di sopravvivenza dalla inoculazione rispettivamente di $\bar{x}_{20} \pm$ e.s. = 20,9 ± 2,1 e 5,4 ± 1,1 con recettività e mortalità del 100% (3,4). Tali ceppi sono mantenuti *in vivo* mediante passaggio meccanico di sangue infetto in ♀ ♀ di *Mus musculus* dello stipite Sw/W di 5-8 mesi inoculate per via endoperitoneale con $1,5 \times 10^6$ parassiti *pro capite*. I quantitativi di farmaco usati per la ricerca della dose terapeutica efficace e somministrati per endoperitoneo, sotto forma di soluzione iniettabile,

sono stati di 0,5; 1; 2; 4; 8 mg/Kg per la Gentamicina per 5 gruppi di 10 animali di ceppo $Londra_{K173}$ e 12 e 16 mg/Kg per i 2 gruppi di 10 animali infettati con il ceppo $Roma_{GB67}$ di 4; 8; 16. 32 mg/Kg per la Sisomicina, sperimentata solo su 4 gruppi di 10 animali infettati con il ceppo più virulento. Il criterio di valutazione dell'efficacia dei farmaci si è basato principalmente sulla loro capacità di abbassare la parassitemia, di ridurre il numero di schizonti, di consentire l'osservazione di forme degenerate (F.D.) e di prolungare la sopravvivenza. Per la ricerca specifica della dose terapeutica efficace D.T.E. si è utilizzato il test di Hawking o del 2%. Esso consente di considerare efficace la dose capace di ridurre al 5° giorno dalla inoculazione e dopo 4 giorni di somministrazione, a partire dal giorno della infezione, la parassitemia del 98% o più rispetto ai controlli, consentendo un residuo parassitemico del 2% o meno (% di parassitemia redisua P.R.).

Risultati

I risultati ottenuti (Tabella 1) con la Gentamicina per il ceppo $Londra_{K173}$ dimostrano che il farmaco somministrato per via endoperitoneale in due emidosi giornaliere, è un buon schizonticida già alla dose di 1 mg/Kg (1,2 ± 0,3% di schizonti residui al 5° giorno rispetto al 18,7 ± 2,8% dei controlli) e che la dose terapeutica efficace corrisponde a 8 mg/Kg con il 100% di F.D. Per il ceppo $Roma_{GB67}$ il farmaco è un buon schizonticida alla dose di 12 mg/Kg (7,3 ± 5,5% di schizonti residui rispetto al 61,8 ± 0,59% dei controlli, valore quest'ultimo sensibilmente più elevato al 5° giorno di quello dei precedenti controlli trattandosi del ceppo più virulento). La dose di 16 mg/Kg (con il 77,6 ± 7% di F.D.)risulta essere efficace per il test. E' importante segnalare che la sospensione della somministrazione (non si tratta di una cura radicale) consente

Tabella 1. - Variabili parassitologiche e Test di Hawking per lo studio della risposta alla Gentamicina e Sisomicina di due ceppi di *P. berghei* nei topi (riferite alle sole dosi significative).

Dosi mg/kg	% Paras. x̄+e.s.	% Schizonti	%FD	Exitus	Morti N/10	Guariti N/10	Test %PR
			GENTAMICINA LONDRA				
0 CONTR.	4,8±2,1	18,7±2,8	0	21,7±2,3	10	0	-
0,5x2	1,1±0,3	1,2±0,3	36,2±2,3	21,5±2,1	10	0	22,9
4 x2	0,1±0,03	0,0±0,0	100 ±0,0	19,2±1,2	3	7	2,0DTE
			GENTAMICINA ROMA				
0 CONTR.	85,9 ±0,61	61,8 ±0,59	0	5,25±0,25	10	0	-
6 x2	3,15±0,5	7,3 ±0,55	62,3±3,2	9,0 ±0,4	10	0	3,6
8 x2	1,15±0,5	2,85±0,25	77,6±0,7	14,25±0,4	8	2	1,3DTE
			SISOMICINA ROMA				
0 CONTR.	86,6 ±1,58	61,5 ±1,35	0	5,75±0,47	10	0	-
8 x2	5 ±0,2	8,35±0,5	58,5±6,8	10,5 ±0,9	9	1	5,8
16x2	1,15±0,5	2,6 ±0,35	77,1±1,55	13,5 ±0,64	5	5	1,3DTE

di ottenere, dopo un numero variabile di giorni, il 75% e il 50% di casi di guarigione alle due dosi efficaci trovate per i due ceppi. Queste dosi sono inoltre molto lontane dalle DL_{50} e DL_{100} per il topo (430 e 860 mg/Kg) ed il tempo di sopravvivenza si allunga significativamente passando per i due ceppi da 21,7 ± 2,3 a 29,2 ± 1,2 giorni e da 5,25 ± 0,25 a 14,25 ± 0,4 rispettivamente. La risposta ottenuta con la Sisomicina (saggiata come accennato solo su il ceppo più virulento) è stata meno sensibile. Anche per questo farmaco si è osservato un discreto potere schizonticida, ma che inizia ad essere significativo alla dose di 16 mg/Kg (8,35 ± 0,5% di schizonti residui rispetto ai controlli 61,5 ± 1,35%) e con il 58,5 ± 6,85 di F.D. La dose terapeutica efficace risulta essere di 32 mg/Kg (il doppio di quella osservata per la Gentamicina) e con un residuo di schizonti comunque basso (2,6 ± 0,35) ed elevata presenza di forme degenerate (77,1 ± 1,55%). La percentuale di guarigioni è del 50% e la media del tempo di sopravvvenza passa da 5,75 ± 0,47 a 13,5 ± 0,64. La dose efficace, pur essendo relativamente elevata, è ancora lontana dalle DL_{50} e DL_{100} (62,5 e 125 mg/Kg). Nella Tabella 1 sono riportati, per le variabili parassitologiche considerate e per il Test di Hawking, solo i risultati ottenuti per le dosi ad azione significativa o terapeuticamente efficaci.

Discussione

Da quanto riferito possiamo considerare i due farmaci saggiati, specialmente la Gentamicina, come terapeuticamente attivi sulla malaria sperimentale dei topi, ma sulla base di questi primi esperimenti orientativi su di un campione non particolarmente ampio e senza il suffragio di sitematiche prove in vitro, l'adozione di essi in medicina umana come terapie alternative nei casi di farmaco resistenza, non può ancora essere effettuata.

BIBLIOGRAFIA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981. Synopsis of the world malaria situation. Weekly epidemiological record, Geneve, 15 Mai 1981.
2. ONORI, E. 1981. Resistenza di Plasmodium falciparum agli antimalarici. Implicazioni pratiche e prospettive di controllo. Parassitologia 1, 2, 3: 31-62.
3. GALLI, L. e BRAMBILLA, E. 1967. Progressivo aumento della virulenza di un ceppo di Plasmodium berghei. Riv. Parass. 29: 97-100.
4. GALLI-MANDARINI, L. e BRAMBILLA, E. 1982. Caratteristiche biologiche di un ceppo di Plasmodium berghei ad altissima virulenza ($Roma_{GB67}$) in Mus musculus Swiss/Webster. Boll. Zool. 49: 85.
5. HAWKING, F. 1966. Chloroquine resistance in Plasmodium berghei. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 287-293.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 399-402

PROVE DI IMMUNITA' CROCIATA IN TRE CEPPI DI PLASMODIUM BERGHEI A DIFFERENTE VIRULENZA IN MUS MUSCULUS GUARITI DALLA INFEZIONE MEDIANTE STRESS TERMICO (+35°C)

L. Galli-Mandarini e E. Brambilla

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia, Pavia

Riassunto. - Su tre ceppi di Plasmodium berghei a differenti caratteristiche di virulenza, sono state effettuate prove di immunità crociata mediante inoculazione in topi guariti dai rispettivi attacchi primari dopo esposizione a +35°C. I risultati non consentono di considerare i tre ceppi antigenicamente diversi.

Summary (Cross immunity in three strains of different virulent Plasmodium berghei in mice recovered by thermic stress (+35°C) exposition). - In this work the immunological behaviour in three strains of different virulent P. berghei are studied. Cross immunity proof have demonstred that antigenical structure of strains is probably similar.

Introduzione

L'osservazione di sensibili differenze morfologiche, parassitologiche e cliniche di tre ceppi di Plasmodium berghei a diverse caratteristiche di virulenza, acquisite nel corso di una selezione di circa 15 anni (1, 2, 3) ci hanno indotto nel sospetto che queste differenze potessero mascherare più profonde diversificazioni a livello antigenico e presumibilmente tassonomico. Per valutare queste eventuali diversificazioni, sono necessarie preliminarmente prove biologiche indirette d'immunità crociata e successivamente analisi biochimiche a livello di immunoelettroforesi e/o immunofluorescenza.
Nel presente lavoro è stata affrontata la prima parte della sperimentazione. I ceppi di parassiti da noi studiati, sono tutti letali per il topo ed in teoria non utilizzabili per il tipo di ricerca sopra menzionata, ma l'esposizione degli animali infetti ad una temperatura ambientale elevata (+35°C), per tutta la durata dell'infezione, consente la guarigione di un'alta percentuale (80%) di animali nei quali si instaura uno stato di immunità "sterile" (in assenza di parassiti), e duratura che si manifesta o con completa refrattarietà alla 2^ inoculazione o con l'instaurarsi di una infezione blanda a basse % di parassitismo, di breve durata e che si conclude con la guarigione (4).

Materiali e Metodi

I ceppi utilizzati nella ricerca, disposti in ordine crescente di virulenza: $Pavia_{BG69}$, $Londra_{KI63}$ e $Roma_{GB67}$ che presentano tempi di sopravvivenza, rispettivamente di $\bar{x}_{20} \pm$ e.s. = 26,3 ± 1,2; 19,8 ± 1,3; 5,6 ± 1,9 ed una sottospecie di P.berghei (Plasmodium berghei Killicki) con una letalità per il topo del 50%, usata come controllo. La metodica immunologica adottata è stata la seguente: 1) selezione di animali con crisi parassitolitica e guarigione o indotta dallo stress termico per i tre ceppi letali o spontanea per la sottospecie; 2) accertamento della guarigione completa (sterile in assenza di parassiti). Questo accertamento si è effettuato mediante il seguente sistema selettivo: a) subinoculazione del sangue degli animali di cui al punto 1 (donatori) in 3 animali sani (accettori) per ogni soggetto; b) selezione dei donatori la cui subinoculazione negli accettori ha dato esito negativo; c) splenectomia chimica dei donatori negativi mediante somministrazione di 0,5 g/Kg di etil-palmitato per via endovenosa (5) allo scopo di svelare, in questi individui, un'eventuale infezione latente con parassitemia al di sotto della reperibilità microscopica in quanto immunodepressa dalla presenza della milza con meccanismo linfomacrofagico e biochimico; d) selezione degli animali splenectomizzati che non hanno presentato ricadute successivamente al blocco splenico; e) reinfezione di questi animali clinicamente guariti e privi di parassiti con il ceppo di P.berghei omologo; con quelli eterologi e con la sottospecie per l'accertamento dello stato d'immunità crociata.

Risultati

I risultati ottenuti (Tabella 1) nelle combinazioni sperimentali hanno consentito di osservare la presenza di immunità alla 2^ infezione con casi di totale refrattarietà o di malattia ad andamento benigno, di breve durata e con bassa % di parassitismo.

Tabella 1. - Comportamento immunitario crociato di 3 ceppi di P.berghei e della sottospecie P.b.Killicki in topi guariti dall'attacco primario provocato dal ceppo di P. berghei $Londra_{KI73}$ (dati relativi ad una sola combinazione).

Ceppi	Incub.	% Paras. Max	Recettivi N/10	Exitus	Giorno negatività microscopica
Controlli	1,8 ± 0,6	85,3 ± 2,5	10	19,8 ± 1,3	-
Londra	1,5 ± 0,8	10,6 ± 1,2	4	guariti	12,3 ± 1,6
Pavia	1 ± 0,0	4,8 ± 0,3	2	guariti	9,5 ± 1,9
Roma	1,5 ± 0,4	20,5 ± 4,2	6	guariti	17,2 ± 2,1
P.b.Killicki	4,4 ± 1,6	64,3 ± 0,7	5	27,3 ± 4,1	35,6 ± 2,1

Per tali caratteristiche dello sviluppo della 2^ infezione è sempre stata pos-

sibile una correlazione diretta con le caratteristiche di virulenza del ceppo inoculato. Così ad esempio i 10 animali guariti dalla infezione da P.berghei ceppo $Londra_{K173}$ reinoculati con il ceppo omologo, hanno mostrato 6 casi di non recettività e 4 infezioni caratterizzate da un periodo di incubazione medio di 1,5 ± 0,8 giorni; % di parassitismo massimo di 10,6 ± 1,2 al 7° giorno dalla reinoculazione; durata della positività di 10,5 ± 2,3 giorni; negatività all'esame microscopico al 12,3 ± 1,6 giorni e successiva guarigione clinica. La reinoculazione di altri 10 animali con il ceppo eterologo $Pavia_{BG69}$ ha consentito l'osservazione di 8 casi di non recettività e 2 infezioni con incubazione di 1 giorno, % di parassitismo massimo di 4,8 ± 0,3%, durata della positività di 8 giorni e negatività all'esame microscopico raggiunta al 9,5 ± 1,9 giorni e successiva guarigione degli esemplari. Infine la reinoculazione con il ceppo più virulento $Roma_{GB67}$ ha fatto registrare 4 casi di non recettività e 6 infezioni caratterizzate da 1,5 ± 0,4 giorni d'incubazione, % massima di parassitemia di 20,5 ± 4,2 al 2° giorno, durata della positività di 15,5 ± 1,8 giorni e negatività raggiunta al 17,2 ± 2,1 giorni con successiva guarigione di tutti gli animali. Per contro la reinoculazione degli stessi 3 ceppi in animali guariti dalla infezione con P.berghei Killicki ha permesso la osservazione di andamenti parassitologici propri dei ceppi usati e simili a quelli osservati nei gruppi di controllo.

Discussione

Il complesso dei risultati ottenuti nella presente ricerca consente di considerare i tre ceppi analizzati, appartenenti alla medesima specie e senza differenziazioni di tipo antigenico. L'acquisizione di questo dato ci sembra importante ed utile soprattutto ai fini sperimentali, consentendo, nell'ambito della stessa specie, una più ampia duttilità parassitologica sia per l'inserimento di variabili tra loro comparabili sia come ricerca di base per studi immunochimici di animali guariti mediante stress termico.

BIBLIOGRAFIA

1. GALLI, L. e BRAMBILLA, E. 1967. Progressivo aumento della virulenza in un ceppo di Plasmodium berghei. Riv. Parass. 28: 173-176.
2. GALLI-MANDARINI, L. e BRAMBILLA, E. 1982. Caratteristiche biologiche di un ceppo di Plasmodium berghei ad altissima virulenza ($Roma_{GB67}$) in Mus musculus Sw/W. Boll. Zool. 49: 85.
3. GALLI-MANDARINI, L. e BRAMBILLA, E. 1981. Influenza della via di inoculazione di ceppi di Plasmodium berghei a differente virulenza sull'infezione in stipiti di Mus musculus. Parassitologia 23: 181-184.
4. GALLI, L. e BRAMBILLA, E. 1965. Influenza della temperatura ambientale sull'infezione da Plasmodium berghei nei topi. Boll. Zool. 32: 425-427.
5. STUART, A.E. 1960. Chemical splenectomy. Lancet 2: 896-897.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 403-406

ASPETTI ULTRASTRUTTURALI DELLA CRIPTOSPORIDIOSI NATURALE DEGLI OVINI

A. Leoni & G. Garippa

Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale e Cattedra di Malattie Parassitarie degli Animali Domestici, Università di Sassari, Sassari.

Riassunto. - Gli AA. descrivono i risultati di una indagine ultrastrutturale sulla criptosporidiosi naturale degli ovini.

Summary (Ultrastructural aspects of the natural sheep-cryptosporidiosis). - The AA. describe the results of an ultrasctructural research on the natural sheep-cryptosporidiosis.

Premessa e scopi della ricerca

La criptosporidiosi è un'infezione causata dal protozoo Cryptosporidium, appartenente alla famiglia Cryptosporididae, sott'ordine Eimeriorinae, ordine Eucoccidioridae, classe Sporoasidae. Di tale protozoo sono state recentemente (Levine, 1984) identificate almeno 4 specie (C. nasorum, C. crotali, C. meleagridis, C. muris) che parassitano numerose specie animali, con possibilità di trasmissione della malattia da una all'altra di queste.

I criptosporidi sono considerati per lo più parassiti a sede intestinale extracellulare ma sono stati evidenziati anche nella borsa di Fabrizio, nella cloaca, nel sacco congiuntivale e nelle prime vie respiratorie (cavità nasali, trachea, bronchi) di alcuni volatili, nello stomaco e nei dotti biliari e pancreatici di puledri ed infine nello stomaco di serpenti.

La Criptosporidiosi offre ancor oggi ampia materia di studio soprattutto per la diversa gravità con la quale si manifesta nei vari animali che colpisce. Ratti, topi e cavie subiscono, ad esempio, una infezione del tutto asintomatica; i ruminanti invece, e lo stesso uomo, specie se in giovanissima età, patiscono seri danni e possono addirittura andare incontro a morte. La malattia può comunque svilupparsi anche in individui adulti, in particolare quando siano privi di particolari difese immunitarie. La possibilità di trasmissione della Criptospirodiosi dagli animali all'uomo e da questo ad altri animali fa si che essa possa a tutto diritto essere considerata una zoonosi o antropozoonosi.

Molto si è discusso comunque sul reale potere patogeno dei criptosporidi nella specie animale di allevamento in quanto, in certi casi, l'infezione decorreva contemporaneamente a quella causata da altri enteropatogeni (virus, batteri). Non si era dunque sicuri che la sintomatologia e le stesse lesioni anatomo-patologiche di volta in volta osservate fossero causate dal protozoo. Studi recenti hanno però chiarito che i criptosporidi hanno un ruolo di primo piano nel determinismo delle diarree neonatali di varie specie animali, soprattutto domestiche allevate intensivamente.

In Italia la Criptosporidiosi era stata da tempo segnalata in alcune specie di volatili, nel bovino e nel bufalo. In occasione del 38° Convegno S.I.S. VET. (Rimini, 12/15 settembre 1984) abbiamo avuto occasione di descrivere la malattia nell'ovino, con particolare riguardo ai suoi aspetti clinici ed

anatomo-patologici. L'infezione, caratterizzata da particolare gravità, si era sviluppata in un gregge di oltre 600 capi nel quale, su 500 agnelli ben 125 risultavano infettati da Cryptosporidium.

Dall'abbondante materiale esaminato è stato possibile allestire dei preparati per la microscopia elettronica a trasmissione ed in questa nota intendiamo appunto riferire su quanto è scaturito dall'indagine ultrastrutturale. In particolare si è cercato di studiare le varie fasi di sviluppo del parassita, il tipo di rapporto che questo contrae con l'enterocita e, segnatamente, se il parassita sia rivestito della membrana protoplastica cellulare e sia dunque da considerare o meno a sede extracellulare. Abbiamo cercato inoltre di valutare il grado di danneggiamento subito dalle ultrastrutture cellulari nel corso della malattia.

Risultati

Con l'osservazione al M.E.T. era possibile evidenziare nei dettagli la morfologia del parassita. I trofozoiti si presentavano come grosse cellule uninucleate, con citoplasma fortemente elettrondenso, nei primi momenti dello sviluppo. Evidenti erano anche le forme di passaggio da trofozoita a schizonte, riconoscibili per la presenza di 8 nuclei periferici. Gli schizonti maturi, oltre che per le maggiori dimensioni, si riconoscevano per la presenza al loro interno di 8 merozoiti nudi. Degli elementi sessuati era possibile evidenziare solo i macrogametociti, infarciti di abbondanti granuli di polisaccaridi e liquidi e, nelle forme più evolute, provvisti di un complesso reticolo endoplastico. Le oocisti, con all'interno 4 merozoiti, erano presenti soprattutto nel lume intestinale ma talvolta le si notava ancora aderenti all'enterocita.

Tutte le forme di sviluppo di Cryptosporidium aderivano alla mucosa attraverso una ben rilevabile "area di fusione" particolarmente elettrondensa. In molti casi era anche apprezzabile tra parassita e superficie dell'enterocita una sorta di vacuolo contenente strutture membranose e che, secondo alcuni AA., sarebbe da identificare come un "organello di nutrizione".

I parassiti, in particolare gli schizonti, i macrogametociti e le oocisti, risultavano poi costantemente avvolti da una membrana caratterizzata da notevole somiglianza di struttura con la membrana protoplastica dell'enterocita. Entrambe infatti mostravano due bande elettrondense. Non solo, ma in taluni casi sembrava potersi notare un'evaginazione della membrana cellulare che si protendeva ad avvolgere il parassita.

Sulla superficie della mucosa si poteva apprezzare lo scompaginamento dei microvilli e, in molte cellule, addirittura la loro completa scomparsa.

Lo stato di sofferenza degli enterociti infetti era manifestato dalle alterazioni a carico delle varie componenti ultrastrutturali. Erano infatti evidenti: mitocondri di tipo "condensato", di forma rotondeggiante, piccole dimensioni e con creste scarsamente pronunciate; numerosi vacuoli di probabile origine endoplasmico rugosa; particolare abbondanza di lisosomi; grosse masse di eterocromatina addossate alla membrana nucleare.

Le cellule maggiormente danneggiate ed in via di desquamazione, oltre alla totale perdita dei microvilli, mostravano estesi processi autolitici.

Conclusioni

Da quanto osservato al M.E.T. ci sembra di poter affermare che, a partire da un certo stadio di sviluppo, i criptosporidi risultavano essere avvolti dalla membrana protoplastica dell'enterocita. Dunque il parassita potrebbe essere considerato anche a sede intracellulare; ciononostante la sua collocazione fisica (tutto sporgente verso il lume intestinale) lo differenzia nettamente dagli altri coccidi che si sviluppano all'interno del citoplasma cellulare.

Resta il fatto che la natura del rapporto ospite-parassita non può non compromettere quelle che sono le più importanti funzioni della membrana dell'enterocita, in particolare la regolazione della pressione osmotica fra ambiente extra ed intracellulare. Con questo presupposto possono quindi venire giustificati tutti i danneggiamenti subiti dalle ultrastrutture cellulari.

Lo sfruttamento del metabolismo cellulare da parte del parassita e l'alterazione della membrana dell'enterocita, accompagnata o meno dalla scomparsa dei microvilli, sono dunque da indicare come i meccanismi patogenetici responsabili della grave sintomatologia e delle cospicue lesioni rilevabili nel corso della Criptosporidiosi ovina.

BIBLIOGRAFIA

1. ANGUS, K.W. e coll. 1982. An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. Vet. Rec. 110: 129-130.
2. CANESTRI-TROTTI, G. e coll. 1982. Prima seganlazione di protozoi del genere Cryptosporidium TIZZER 1907 in vitelli in Italia. Atti Soc. It. Buiatria 14: 289-292.
3. GENCHI, C. e coll. 1984. La criptosporidiosi del vitello, fattore determinante nella diarrea neonatale. Praxis Vet. 3: 5-8.
4. HEINE, J. & BOCH, J. 1981. Kriptosporidien-infectionen beim kalb. Nachweis, vorkommen und experimentelle ubertragung. Berl. Muenich. Tierarzl Wochenschr. 94: 298-292.
5. LEVINE, N.D. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus Cryptosporidium (Protozoa, Apicomplexa). J. Protozool. 31(1): 94-98.
6. MANDELLI, G. & VALERI, A. 1972. Coccidi del genere Cryptosporidium in alcune specie aviarie. Atti XI Conv. Patol. Aviarie 2: 239-245.
7. PEARSON, G.R. & LOGAN, E.F. 1983. Scanning and trasmission electron microscopic observation on the host-parasite relationship in intestinal cryptosporidiosis on neonatal calves. Res. Vet. Sci. 34: 149-154.
8. SNODGRASS, D.R., ANGUS, K.W. & GRAY, E.W. 1984. Experimental Cryptosporidiosis in germ free lambs. J. Comp. Pathol. 94: 141-151.
9. TIZZER, E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 5: 12-13.
10. TZIPORI, S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev. 47 (1): 84-96.
11. VETTERLING, J.M., TAKEUCHI, A. & MADDEN, P.A. 1971. Ultrastructure of Cryptosporidium wrairi from the guinea pig. J. Protozool. 18: 248-260.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 407-410

RIDESCRIZIONE DI ANCYLOSTOMA IPERODONTATUM LE ROUX E BIOCCA, 1957

F. Mancianti, M. Magi e G. Macchioni

Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti (Facoltà di Medicina Veterinaria), Università di Pisa, Pisa

Riassunto. - A. iperodontatum Le Roux e Biocca, 1957 viene ridescritto sulla base di numerosi esemplari isolati dalla lince africana (Lynx caracal)in Somalia.

Summary (Further description of Ancylostoma iperodontatum Le Roux e Biocca, 1957) - A further description of a large number of specimens of A. iperodontatum found in Lynx caracal is given.

Introduzione

Ancylostoma iperodontatum venne descritto da Le Roux e Biocca (1957) in base ad un solo esemplare maschio, trovato in un ghepardo (Acinonyx jubatus) ucciso nella Rodesia del Nord. Nello stesso anno Lipparoni esaminò 4 femmine del parassita presenti in Caracal nubicus (Lynx caracal) catturato in Somalia.

Risultando perciò parziale e frammentaria la descrizione di questo nematode abbiamo ritenuto utile ridescriverlo in base all'esame di numerosi esemplari di ambedue i sessi da noi isolati da 8 Lynx caracal (su 9 esaminate) nel corso di uno studio sistematico sull'elmintofauna degli animali selvatici della Somalia.

Morfologia

Si tratta di nematodi, di colore biancastro, con corpo cilindrico rivestito da una cuticola striata trasversalmente, con strie distanti tra loro circa 9 micron ed estremità cefalica rivolta dorsalmente. La capsula buccale è robusta, fornita di due placche chitinose ventrali, provviste, ciascuna, di due denti robusti laterali ed uno mediano più piccolo. Il margine dorsale dell'apertura buccale è caratterizzato da tre paia di protuberanze chitinose o denti dorsali di cui il mediano delimita l'incisione dorsale, mentre gli altri due sono in posizione dorsolaterale. La parete ventrale della capsula buccale presenta lancette chitinose faringee. L'esofago è claviforme, si osservano papille cervicali e l'anello nervoso e il poro escretore si trovano a livello della metà dell'esofago.

Tab. 1 -

	Le Roux e Biocca	Lipparoni	Mancianti, Magi, Macchioni
MASCHIO			
distanza strie			9
lunghezza del corpo	4100		4000-13000 (10556)
larghezza del corpo	215		230-440 (395)
lunghezza esofago	480		490-750(700) x 160-180 (170)
lunghezza spiculi	1150		1240-1526 (1393)
lunghezza gubernaculum	90		100
distanza poro escret.-estr.cefalica			320-315 (342)
distanza papille cefaliche-estr.cef.	305		335-457 (400)
distanza anello nervoso-estr.cefalica	300		300-335 (317)
FEMMINA			
distanza strie		9-10	9
lunghezza del corpo		9000-14500	5157-17000 (11974)
larghezza del corpo		620-638	358-540 (463)
lunghezza esofago		837-855x210	530-1000(792)x 152-220 (190)
distanza poro escret.-estr.cefalica		370-380	345-430 (383)
distanza papille cefaliche-estr.cef.		398-406	340-550 (430)
distanza anello nervoso-estr.cefalica		352-365	321-409 (368)
lunghezza della coda		155-160	149-178 (159)
distanza vulva-estremità posteriore		tra terzo medio e terzo posteriore	1587-5500 (3982)
diametro uova		58-76 x 39-48	57-74 x 38-46

Nella prima colonna sono riportate le misure dell'esemplare di Le Roux e Biocca, nella seconda le misure minima e massima degli esemplari di Lipparoni e nella terza le misure minime e massime da noi riscontrate su 40 esemplari fissati in formalina salata al 2%; tra parentesi sono indicati i valori medi.

Il maschio presenta spiculi uguali e sottili, gubernaculum angolare dilatato nella metà distale; la borsa caudale è relativamente piccola con lobi laterali corti, la costa dorsale lunga circa 130 micron e divisa distalmente in tre rami tridigitati; le coste esterno-dorsali si distaccano dalla parte prossimale della dorsale, le coste laterali sono corte e originano da un lungo tronco comune, le coste dorsali decorrono parallele fino al margine della borsa; il cono genitale è prominente.

Nella femmina la vulva è situata al limite tra terzo medio e terzo posteriore del corpo, la coda è conica e terminante a punta; le uova a guscio sottile, quelle in prossimità dell'apertura vaginale con inizio di segmentazione.

Discussione

Nonostante la notevole letteratura consultata non abbiamo reperito che un'unica segnalazione di ancilostomi nella lince africana (Lynx caracal) e precisamente quella di Lipparoni su A.iperodontatum.

In base alle nostre indagini possiamo affermare che la lince è un ospite specifico per A.iperodontatum e limitatamente al numero degli animali esaminati, l'unico rappresentante della famiglia Ancylostomatidae da noi osservato in questa specie animale.

BIBLIOGRAFIA

1. LE ROUX P., BIOCCA E. 1957. Su una nuova specie del genere Uncinaria e su due nuove specie del genere Ancylostoma . Accad. Naz. Lincei,22:192-199

2. LIPPARONI E. 1957. Sopra alcuni esemplari di femmine di anchilostoma, riportabile ad "A.iperodontatum", parassita di "Caracal nubicus". Lincei Rend.Sc.Fis.Mat.e Nat.,22:539-540.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 411-414

Sessione V

RISPOSTA IMMUNE DEL TOPO NELLA INFESTAZIONE CON *HYMENOLEPIS NANA*: ANDAMENTO DELLE MAST-CELLS INTESTINALI

G. Bortoletti, M. Conchedda, F. Gabriele, O. Limongelli & C. Palmas

Istituto di Parassitologia, Facoltà di Medicina, Università di Cagliari

Riassunto. - Vengono riportati i dati relativi all'incremento del numero delle mast-cells a livello intestinale, durante una prima infestazione di topi C3H con circa 100 uova di *H. nana*.

Summary. - Relationship between a primary *H. nana* egg-infection (100 eggs) and mast-cell responce in C3H mice is reported.

Introduzione

Nel sistema parassita-ospite *Hymenolepis nana*/topo, una prima infestazione ottenuta mediante l'ingestione di uova, a differenza di quella sostenuta da soli cisticercoidi, induce una rapida e forte risposta protettiva conseguente allo sviluppo degli embrioni esacanti all'interno dei villi intestinali. Si ha in pratica una risposta immune sia cellulare che umorale (1) che, pur consentendo al parassita di raggiungere la maturità e di riprodursi, è in grado di determinare la sua eliminazione in un tempo più o meno lungo (self-cure dell'ospite), variabile in relazione al tipo di ospite murino che si considera (2). E' noto inoltre che l'intestino di animali massivamente infestati, ad es. con più di 50 parassiti, si presenta macroscopicamente infiammato. Per verificare anche in questo modello sperimentale come il fenomeno dell'infiammazione rappresenti uno degli aspetti importanti della risposta immune e per evidenziare il ruolo svolto dalle singole popolazioni cellulari nel complesso meccanismo di espulsione dei parassiti dall'intestino, sono stati studiati alcuni aspetti dei cambiamenti che si manifestano durante una prima infestazione, facendo particolare riferimento al parametro istologico relativo al numero delle mast-cells presenti nello spessore della mucosa intestinale nei diversi momenti dell'infestazione.

Materiali e Metodi

Gruppi di 5 topi femmine C3H/R1/CNE di 6-8 settimane, mantenute in laboratorio ed infestati con circa 100 uova di *H. nana*, secondo tecniche ampiamente sperimentate (2), sono stati sacrificati 5,10,15,20 e 25 giorni dopo l'infestazione. Dall'intestino tenue, rapidamente rimosso, ed in particolare da tre precise zone

corrispondenti alla parte prossimale, intermedia e distale, venivano prelevati tre frammenti di circa 1 cm di lunghezza; questi, aperti longitudinalmente e stesi su carta da filtro, venivano fissati per 3-6 ore in fissativo di Carnoy, inclusi in paraffina e sezionati in fettine di 10 um. La colorazione delle sezioni con Alcian blue e Safranina, evidenziando selettivamente i granuli delle mast-cells, ne permetteva la loro conta, effettuata considerando 10 unità di villo (U.V.) per ogni segmento osservato.

Risultati

Nel modello sperimentale *Hymenolepis nana*/topi C3H, utilizzato in questa indagine, il numero dei vermi adulti che si sviluppano nell'intestino in seguito ad una infestazione con circa 100 uova del parassita, corrisponde mediamente al 45% della carica infestante utilizzata. In particolare i parassiti riescono a raggiungere la maturità sessuale, a riprodursi, ma, in relazione alla risposta immune dell'ospite, già a partire dal 14° giorno dopo l'infestazione (p.i.), iniziano ad essere eliminati: gradualmente, tra la 15° e 30° giornata p.i., la loro presenza si riduce a pochi esemplari, mentre generalmente il completamento della "self-cure" dell'ospite avviene circa 40 gioni p.i..

Un esame istologico della parete dell'intestino, effettuato durante lo svolgersi delle diverse fasi di questo processo, permette di evidenziare in questa reazione dell'ospite, il coinvolgimento della popolazione delle mast-cells. Tali cellule, infatti, quando presenti, sono nettamente distinguibili rispetto alle altre per l'intensa colorazione dei loro granuli e, in tutti i campioni osservati, appaiono dislocate prevalentemente nello spessore della mucosa e sottomucosa della parete intestinale e più raramente nella lamina propria dei villi. In particolare, mentre il loro numero appare notevolmente esiguo, del tutto simile a quanto riscontrato nei campioni di controllo, dopo 5 giorni dall'infestazione, dalla 10° giornata p.i. in poi si osserva invece un graduale incremento che raggiunge il suo valore massimo 20 giorni p.i.; nei successivi cinque giorni la presenza delle cel

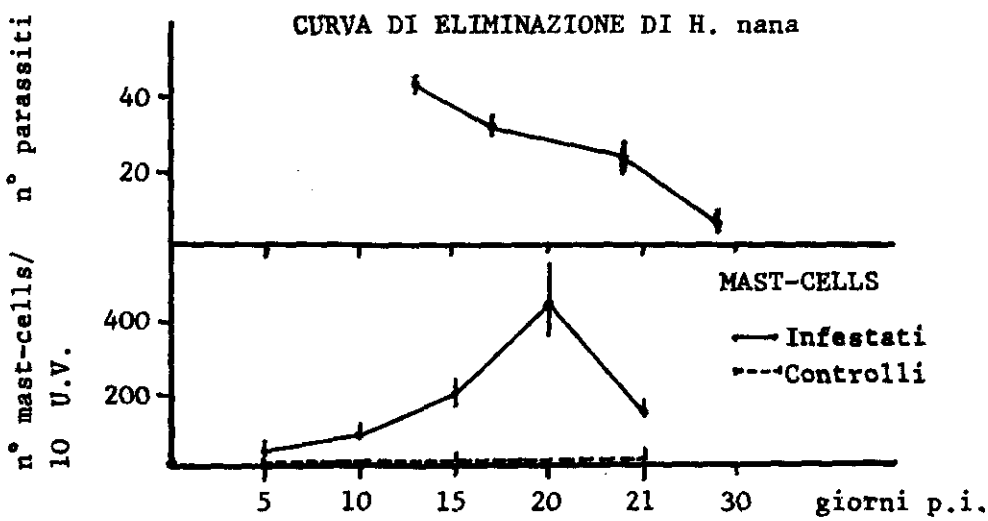


Fig. 1 - Confronto tra la curva di eliminazione di *H. nana* e l'incremento delle mast-cells nell'intestino di topi C3H, infestati con circa 100 uova.

lule diminuisce, riportandosi intorno ai valori rilevati 10 giorni p.i.,peraltro in modo ancora significativamente differente rispetto a quelli dei controlli (Fig. 1). L'incremento del numero delle mast-cells avviene in maniera sincrona e senza sostanziali differenze in tutti e tre i tratti dell'intestino studiati, dimostrando come tutto l'organo sia coinvolto in questo processo, peraltro in modo concorde con il quadro della diffusa infiammazione, evidente macroscopicamente anche subito dopo il sacrificio degli animali.

Discussione

Il processo di eliminazione di *H. nana* dall'intestino dell'ospite definitivo è determinato dall'attuazione di diversi e complessi meccanismi della risposta immune dell'ospite, in grado tra l'altro di provocare in tale organo drastici cambiamenti di natura fisico-chimica, che si evidenziano anche macroscopicamente attraverso una vasta infiammazione ed una forte produzione di muco; questi mutamenti, durante la fase di sviluppo dei cisticercoidi all'interno dei villi, interessano solo la prima parte dell'intestino tenue, mentre si estendono all'intero organo durante la successiva fase di sviluppo enterale.

Il fenomeno dell'attivazione delle mast-cells e il loro richiamo nello spessore della mucosa e sottomucosa intestinale, maggiormente evidente proprio durante la fase espulsiva dei parassiti, rappresenta in questo quadro uno dei numerosi parametri che concorrono a modulare tale processo. L'importanza della loro presenza viene confermata anche in altri modelli sperimentali dal manifestarsi di fenomeni concomitanti al loro incremento; ne sono un esempio l'aumento dell'attività degli eosinofili, richiamati in seguito al rilascio di fattori chemiotattici, e, analogamente, l'attivazione, sempre mediante il rilascio di mediatori chimici, delle "gobblet-cells", presenti nell'epitelio intestinale e secernenti muco (3). Quest'ultimo dato conferma tra l'altro l'importanza della presenza delle mast-cells per lungo tempo (più di 20 giorni) nei siti interessati: il muco infatti sembra svolgere un ruolo molto importante nel blocco dello sviluppo e nella espulsione dei parassiti, ma la sua azione si esplicherebbe secondo un lento processo e pertanto in tempi relativamente lunghi.

BIBLIOGRAFIA

1. PALMAS, C., WAKELIN, D. & GABRIELE, F. 1984. Trasfer of immunity against Hymenolepis nana in mice with lymphoid cells or serum from infected donors. Parasitology 89: 287-293.
2. FERRETTI, G., GABRIELE, F. & PALMAS, C. 1980. Methodology in experimental infections of mice with Hymenolepis nana. Boll. Zool. 47: 165-184.
3. ALIZADEH, H. & WAKELIN, D. 1982. Comparison of rapid expulsion of Trichinella spiralis in mice and rats. Int. J. Parasit. 12: 65-73.
4. LEE, G.B. & OGILVIE, B.M. 1981. The mucus layer in intestinal nematode infections. In: Mucosal immune system in health and disease. P.L. Ogra & J. Bienenstock (Eds). Ross Laboratories,Columbus, Ohio. pp.175-187.