Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 415-418

RUOLO DEI LINFONODI MESENTERICI E DELLA MILZA NELLE INFESTAZIONI CON HYMENOLEPIS NANA NEL TOPO

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

Istituto di Parassitologia (Fac. di Medicina), Università di Cagliari, Cagliari

Riassunto. - Linfoblasti mesenterici di donatori sani si accumulano selettivamente nei linfonodi mesenterici di topi C57 Bl/6N infestati con uova di H.nana, suggerendo la presenza di un effetto trappola. L'accumulo si riscontra già in topi infestati da solo 8h e il fenomeno persiste almeno fino a 9 giorni dall'infestazione. L'effetto trappola sembra cessare dopo l'espulsione dei parassiti, dato che le cellule di memoria, linfociti T, sono presenti in ugual numero sia nei linfonodi mesenterici che nella milza.

Summary (Mesenteric lymph node and spleen in immunity to Hymenolepis nana: assessment of cell-trapping). - Mesenteric lymph node cells (MLNC) taken from uninfected donors, labelled with ^{51}Cr, showed an increased accumulation in MLN of C57 Bl/6N mice infected with H.nana eggs. The level of activity in the MLN increased even 8hr after infection and the phenomenon was consistant till day 9 after infection. Trapping effect disappear after parasite expulsion.

Introduzione

Benché già da qualche tempo sia noto che la memoria immunologica e la migrazione dei linfoblasti mesenterici giochino un ruolo essenziale nella risposta immunitaria contro gli elminti gastrointestinali (per es. 1, 2), poco è stato chiarito per quanto riguarda il ruolo della milza e dei linfonodi mesenterici in questi fenomeni. Nel modello sperimentale Hymenolepis nana/topo precedenti lavori hanno dimostrato che la risposta immune si instaura molto precocemente (3) e che l'espulsione del parassita dall'intestino è mediata dai linfoblasti (4). Si è pensato quindi di usare questo modello per studiare la migrazione dei linfoblasti e la dislocazione delle cellule portatrici di memoria.

Materiali e metodi

Sono stati usati topi femmine di 12 settimane di età del ceppo C57 Bl/6N. Ogni gruppo sperimentale era costituito da 5 topi. Il ceppo di H.nana, i metodi di infestazione e di raccolta dei parassiti sono stati già descritti (3). Le sospensioni di cellule dai linfonodi mesenterici (CLM) e dalla milza (CLS) sono

Tabella 1.- Localizzazione di CLM normali marcati con ^{51}Cr in topi infestati con 100 uova di H.nana da diversi periodi di tempo (media della percentuale della radioattività ritrovata rispetto alla dose iniettata ± E.S.).

Organo	Non infestati	Infestati 3 giorni prima	Infestati 6 giorni prima	Infestati 9 giorni prima
Linfonodi mesenterici	8,48±1,18	16,65±1,45	12,90±1,50	14,99±1,69
Milza	20,63±2,84	17,88±1,57	16,67±2,60	16,80±1,09
	Non infestati	Infestati 8 ore prima	Infestati 24 ore prima	Infestati 48 ore prima
Linfonodi mesenterici	4,85±1,08	8,75±0,90	9,70±0,50	9,00±1,03
Milza	10,00±1,07	10,03±1,40	12,50±1,10	11,09±2,42

state preparate secondo i metodi standard (5). I linfoblasti sono stati marcati con Cr^{51} secondo una metodica già nota (6). La quantità di radioattività è stata espressa come percentuale della dose iniettata.

Risultati

Topi recipienti hanno ricevuto $3x10^7$ CLM marcate con Cr^{51} da topi donatori non infestati 3, 6 e 9 giorni dopo essere stati infestati con 100 uova di H.nana. 24 h dopo il trasferimento di cellule tutti i topi, insieme con i controlli iniettati ma non infestati, venivano uccisi e i linfonodi mesenterici e la milza erano rimossi e contati per la radioattività. Solo i linfonodi mesenterici mostravano un aumento significativo di radioattività dovuto ad un accumulo di CLM marcate (Tab. 1). Per verificare il punto di inizio del fenomeno, l'esperimento è stato ripetuto con topi infestati da 8, 24 e 48 h. Anche in questo caso solo i linfonodi mesenterici mostravano un accumulo di linfoblasti marcati. Per verificare se i linfonodi mesenterici mantenessero questa funzione anche come sede della memoria immunitaria, $5x10^7$ cellule prelevate dai linfonodi mesenterici e dalla milza di topi infestati 30 giorni prima e ormai privi dei parassiti, venivano trasferite in topi recipienti infestati lo stesso giorno. I risultati dimostravano (Tab. 2) che cellule non separate sia dei linfonodi mesenterici che della milza non avevano alcun effetto sull'espulsione del parassita, mentre lo stesso numero di cellule costituito dalla sola frazione T arricchita accelerava in modo significativo l'espulsione.

Discussione

I risultati di questo lavoro dimostrano che linfoblasti prelevati da topi donatori sani si accumulano selettivamente nei linfonodi mesenterici di topi in-

Tabella 2.- Numero di parassiti ritrovati in topi infestati da 14 giorni con 100 uova di H.nana e iniettati lo stesso giorno dell'infestazione con CLM e CLS prelevate da topi donatori infestati 30 giorni prima con 300 uova di H.nana.

Gruppi	Media	E.S.
Controllo - non iniettati	70,1	6,5
Iniettati con $5x10^7$ CLM non separate	64,8	7,4
Iniettati con $5x10^7$ CLS non separate	70,7	4,7
Iniettati con $5x10^7$ cellule T dei linfonodi mesenterici	24,4	5,1
Iniettati con $5x10^7$ cellule T della milza	20,1	6,5

festati con H.nana da sole 8h e fino ad almeno 9 giorni dopo l'infestazione, suggerendo l'ipotesi che i linfonodi mesenterici siano particolarmente attrattivi per i blasti mesenterici durante un'infestazione intestinale. Le cellule portatrici di memoria, presenti nella sola frazione T, si ritrovano invece ugualmente nei linfonodi mesenterici e nella milza, avvalorando l'ipotesi che anche in questo modello sperimentale si tratti di piccoli linfociti facenti parte del pool ricircolante.

BIBLIOGRAFIA

1. HOPKINS, C.A. 1980. Immunity and Hymenolepis diminuta. In: The biology of the Tapeworm Hymenolepis diminuta, Academic Press, New York and London, pp. 551-614.
2. ROSE, M.L., PARROT, D.M.V. & BRUCE, R.G. 1976. Migration of lymphoblast to the small intestine. I. Effect of Trichinella spiralis infection on the migration of mesenteric lymphoblast and mesenteric T lymphoblast in singeneic mice. Immunol. 31: 723-730.
3. FERRETTI, G., GABRIELE, F. & PALMAS, C. 1980. Methodology in experimental infections of mice with Hymenolepis nana. Boll. di Zool. 47: 165-184.
4. PALMAS, C., WAKELIN, D. & GABRIELE, F. 1984. Transfer of immunity against Hymenolepis nana in mice with lymphoid cells or serum from infected donors. Parasitol. 89: 287-293.
5. WAKELIN, D. & WILSON, M.M. 1979. T and B cells in the transfer of immunity against Trichinella spiralis in mice. Immunol. 37: 103-109.
6. ZATZ, M.M. & LANCE, E.M. 1971. The distribution of ^{51}Cr-labelled lymphocytes into antigen-stimulated mice. J. Exp. Med. 134:224-241

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 419-422

INFLUENZA DEL CEPPO DELL'OSPITE NELLA RISPOSTA IMMUNE ALLE INFESTAZIONI CON TAENIA TAENIAEFORMIS E HYMENOLEPIS NANA NEL TOPO

M. Conchedda, S. Capra, F. Gabriele, C. Palmas, G. Bortoletti

Istituto di Parassitologia, Università di Cagliari, via della Pineta 77

Riassunto. - Viene studiata la diversa resistenza e suscettibilità di vari ceppi di topi all'infestazione con una uova di Taenia taeniaeformis e di Hymenolepis nana e vengono analizzati alcuni parametri della risposta immune alla luce di una ipotizzata minore o accelerata mobilitazione dei meccanismi immunitari nei diversi ceppi.

Summary (Host strain and immune response in Taenia taeniaeformis or Hymenolepis nana infection in mouse). - Different susceptibility to infection with Taenia taeniaeformis or Hymenolepis nana eggs of different mouse strains is studied. Some immunological parameters are investigated and hypothesis is proposed of a more rapid immune response in resistant respect to susceptible strains.

Introduzione

Uno dei meccanismi in gioco nella dinamica parassita/ospite è rappresentato dalle variazioni genetiche che, se da un lato offrono all'ospite una utile chance nel contrastare la possibile strategia di evasione del parassita, dall'altro possono offrire al parassita una possibilità suppletiva di elusione della risposta immune. Queste variazioni infatti, possono tradursi in una ridotta piuttosto che in una accentuata resistenza, sicchè i bassi o non-risponditori favoriranno la trasmissione del parassita (1). In questo quadro nasce la necessità di analizzare sia il controllo genetico di queste variazioni, sia i meccanismi effettori attraverso cui queste variazioni possono essere espresse in ospiti geneticamente ben definiti e in agevoli modelli di laboratorio.

Materiali e Metodi

Sono stati utilizzati topi C3H/Rl/CNR, C57/Bl/CNR, Ibridi F_1 (C3HxC57), Balb/cJ, Swiss, Biozzi H e Biozzi L. Gli animali sono stati infestati al giorno zero con uova di Taenia taeniaeformis o di Hymenolepis nana e sacrificati, quando non diversamente indicato, 45 giorni dopo l'infestazione (p.i.) nelle infestazioni con T.taeniaeformis e 14 giorni p.i. nelle infestazioni con H. nana. Per costruire la curva di eliminazione di H. nana nei diversi ceppi,

gruppi di animali sono stati sacrificati 14, 18, 25, 30, 35 giorni p.i..

Risultati

I topi C3H sono un ceppo suscettibile alle infestazioni con T.taeniaeformis poichè sviluppano invariabilmente larve fertili, i C57 sono invece resistenti, poichè le larve che si rinvengono sono in genere sterili e vengono lentamente riassorbite (2). Dato il ruolo centrale dell'immunità umorale in questo sistema (3), abbiamo voluto verificare se topi selezionati come alti o bassi produttori di anticorpi verso i globuli rossi di montone (Biozzi H e Biozzi L), mostravano un diverso esito dell'infestazione con T. taeniaeformis.Nei topi bassi rispondi tori (Biozzi L) l'attecchimento è stato quasi del 100%, in seguito ad una infestazione con 100 uova, e tutte le larve erano fertili; negli alti risponditori (H), l'attecchimento è stato circa del 30% e il 10% erano larve sterili.

Benchè non si possa trascurare la possibilità che meccanismi di difesa cellulare aspecifica (es. Macrofagi) possano incidere in modo non irrilevante sull'esito dell'infestazione, il meccanismo centrale della risposta potrebbe essere una accelerata o ritardata produzione anticorpale. Per verificarlo si è proceduto al trasferimento passivo in topi C3H di siero immune prelevato 14, 21 o 28 gg. p.i. da topi C3H e C57. Mentre il siero dei C57 già 14 gg. p.i. è in grado di conferire protezione, il siero dei C3H raggiunge questa stessa efficacia a 28 gg. p.i.. Nel valutare tali risultati non si può comunque trascurare la possibilità che anticorpi specifici vengano"catturati" dalla larva in rapido accrescimento nel ceppo suscettibile, mentre restano disponibili in maggiore quantità nei ceppi resistenti. E' inoltre la sottolineare che la complessità della risposta non può totalmente essere ricondotta ad una accelerata o ritardata produzione anticorpale poichè altri meccanismi giocano un ruolo importante: ad es. il complemento, di alcune frazioni del quale i C3H paiono deficitari (3), o i linfociti helper, richiesti per innescare la reazione, ma non necessari nella fase effettrice, come dimostrato dalla sperimentazione con topi "nude", incapaci di distruggere le larve di T.taeniaeformis, ma passivamente protetti dalla somministrazione di siero da animali non-"nude" infestati (4).

Per verificare se una accelerata o ridotta velocità di risposta può essere in gioco in parassitosi intestinali per le quali è nota l'importanza di fenomeni infiammatori anticorpo e T-cellule dipendenti (5), abbiamo infestato vari ceppi di topi con uova di H.nana e verificato la curva di eliminazione del parassita sacrificando gruppi di animali a distanza di tempo. I parassiti vengono eliminati rapidamente nei topi C57 e negli ibridi C3HxC57, sicchè 18 gg. p.i. gli animali sono praticamente liberi dai parassiti, mentre sono presenti molto più a lungo, almeno fino a 30 gg. p.i. nei topi C3H, che mostrano di essere anche in questo sistema un ceppo suscettibile.

La rapidità di risposta nei due ceppi (C3H e C57) è stata valutata infestando gruppi di animali al giorno zero con 10 uova di H.nana e reinfestandoli con 50 uova a distanza di 24, 48 o 72 ore p.i. insieme ad adeguati gruppi di controllo. L'interferenza tra le due infestazioni è stata valutata calcolando il rapporto tra numero di parassiti rinvenuti negli animali reinfestati e numero atteso, corrispondente alla somma dei parassiti nei controlli della prima e nei controlli della seconda infestazione. Nei topi C57 un'interferenza è verificabile negli animali reinfestati già 48 ore p.i. ed è marcatissima dopo 72 ore,

quando si rinviene un numero complessivo di parassiti pari a circa 1/3 dei controlli. Nei topi C3H invece, tale interferenza non è evidenziabile a 48 ore ed è minima e non significativa anche a 72 ore. L'interferenza viene annullata dall'irradiamento degli animali.

Discussione

La presenza di una variabilità nella risposta immune umorale e/o cellulare sia verso parassiti tissutali che intestinali, pone problemi non solo teorici ma anche pratici, per i risvolti che questa può avere oltre che nella diagnostica immunologica di parassitosi importanti dal punto di vista medico e veterinario, anche riguardo una possibile strategia di vaccinazione.

Solo con uno studio dettagliato sui meccanismi in gioco nei vari sistemi si potrà tentare di verificare la possibilità di modificare questa bassa risposta così da ridurre il successo dell'evasione dalla risposta immune da parte dei parassiti.

BIBLIOGRAFIA

1. WAKELIN D. 1984. Evasion of the immune response: survival within low responder individuals of the host population. Parasitology 88: 639-657.
2. CONCHEDDA M. & FERRETTI G. 1984. Susceptibility of different strains of mice to various levels of infection with the eggs of Taenia taeniaeformis Int. J. Parasitol. 4: 541-546.
3. RICKARD M.D. & WILLIAMS J.F. 1982. Hydatidosis/Cysticercosis: Immune mechanisms and immunization against infection. Adv. Parasitol., Ac. Press, London, New York 21: 229-296.
4. MITCHELL G.F., GODING J.W. & RICKARD M.D. 1977. Studies on the immune response to larval Cestodes in mice. I. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothimic mice to Taenia taeniaeformis and analysis of passive transfer of resistance with serum. Austr. J. Exp. Biol. & Med. Sc. 55: 165-186.
5. PALMAS C., WAKELIN D. & GABRIELE F. 1984. Transfer of immunity against Hymenolepis nana in mice with lympoid cells or serum from infected donors. Parasitology 89: 287-293.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 423-426

RUOLO DI ALCUNE SUBPOPOLAZIONI DI LINFOCITI T NELLA RISPOSTA IMMUNE A TRICHINELLA SPIRALIS NEL TOPO

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

Istituto di Parassitologia (Fac. di Medicina) Università di Cagliari, Cagliari

Riassunto. - Il trasferimento di una subpopolazione di linfociti T selezionati negativamente usando l'anticorpo monoclonale citotossico anti-Ly 2.2, dimostra che la subpopolazione Ly 1^+. 2^- (T helper) è quella maggiormente coinvolta nell'espulsione di T. spiralis dall'intestino.

Summary (Adoptive transfer of immunity against T. spiralis in mice: role of Ly subsets).- Negative selection of T cells substes using a citotoxic anti-Ly 2.2 coupled with adoptive transfer techniques demonstrated that Ly 1^+.2^- T cells (T helper) were the major subset involved in the expulsion of T. spiralis from the intestine.

Introduzione

E' noto che l'immunità contro Trichinella spiralis nel topo può essere trasferita con cellule prelevate dai linfonodi mesenterici di animali precedentemente infestati e che l'immunità così acquisita non influenza l'attecchimento dei parassiti ma ne accelera l'espulsione dall'intestino (1). Diversi lavori hanno dimostrato che il fenomeno è dovuto all'azione delle cellule T, particolarmente T blasti. Se infatti si tratta la frazione B, precedentemente separata su colonna di nylon-wool, con un anticorpo monoclonale IgM anti-thy 1.2+complemento per ottenere la lisi delle cellule T contaminanti, essa non è più in grado di trasferire l'immunità (2). In questo lavoro si è cercato di vedere se tutte le cellule T fossero implicate nella risposta immune contro T. spiralis o se vi fosse una subpopolazione specifica responsabile del trasferimento dell'immunità.

Materiali e metodi

Sono stati usati topi NIH e C57 BlOG, background H-2, (Olac Ltd) di circa sei settimane, per ogni gruppo sperimentale sono stati usati 5 animali. Le sospensioni di cellule erano preparate secondo tecniche standard (3) ed iniettate intraperitoneo nei topi riceventi in un volume non eccedente 0,5 ml. Le tecniche di infestazione e di raccolta dei parassiti erano quelle standard (4). Il siero di cavia veniva adsorbito con agarosio per eliminare la citotossicità verso le

Tabella 1. - Trasferimento dell'immunità contro T. spiralis con frazioni di cellule T selezionate negativamente con anti-Ly 2.2+complemento (media del numero di parassiti ritrovati±E.S.).

Gruppi	Media	E.S.
Controllo-non iniettato	253,8	5,9
Iniettati con $2,5x10^7$ cellule T non trattate	115,2	5,0
Iniettati con $2,5x10^7$ cellule T trattate con il sol anticorpo	109,3	9,0
Iniettati con $2,5x10^7$ cellule T trattate con il solo complemento	112,0	5,3
Iniettati con $1,4x10^7$ cellule T trattate con anticorpo+complemento	119,2	5,3
Iniettati con $1,4x10^7$ cellule T non trattate	180,3	4,8

cellule di topo. L'anticorpo monoclonale anti-Ly 2.2 era acquistato dalla Miles Lab. Ltd.

Risultati

Linfociti T prelevati dai linfonodi mesenterici di topi C57 BlOG (Ly 2.2) infestati 8 giorni prima con 300 T. spiralis e purificati su colonna di nylon wool venivano trattati con l'anticorpo monoclonale anti-Ly 2.2 e complemento di cavia. Questo trattamento riduceva il numero di cellule del 42,8%. Le cellule sopravvissute venivano trasferite in topi NIH (Ly 2.1) secondo diversi schemi sperimentali (Tab. 1). Lo stesso giorno del trasferimento tutti i topi riceventi e l'adeguato controllo veivano infestati con 350 larve di T. spiralis. Sette giorni dopo tutti i topi venivano sacrificati e i parassiti ancora presenti venivani raccolti e contati. I risultati riportati in Tabella mostrano che la deplezione delle cellule Ly 2.2 non ha alcun effetto sul trasferimento dell'immunità.

Discussione

Le cellule trattate con anticorpo monoclonale anti-Ly 2.2 mantengono inalterato il proprio potere di accelerare l'espulsione dei parassiti, suggerendo l'ipotesi che la subpopolazione di T linfociti Ly $1^+.2^-$ (T helper) sia quella determinante nella risposta immune del topo nei confronti del nematode T. spiralis.

BIBLIOGRAFIA

1. WAKELIN, D. & LLOYD, M. 1976. Accelerated expulsion of adult Trichinella spiralis in mice given lymphoid cells and serum from infected donors. Parasitol. 72: 307-315.
2. GRENCIS, R.K. & WAKELIN, D. 1982. Short lived, dividing cells mediate adoptive transfer of immunity to Trichinella spiralis in mice. I. Availability of cells in primary and secondary infections in relation to cellular changes in the mesenteric lymph node. Immunol. 46: 443-449.
3. WAKELIN, D. & WILSON, M.M. 1979. T and B cells in the transfer of immunity against Trichinella spiralis in mice. Immunol. 37: 103-109.
4. WAKELIN, D. & LLOYD, M. 1976. Immunity to primary and challenge infections of Trichinella spiralis in mice: a re-examination of conventional parameters. Parasitol. 72: 307-315.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 427-430

IMMUNITA' CROCIATA TRA TRICHINELLA SPIRALIS E TRICHINELLA PSEUDOSPIRALIS NELLE INFESTAZIONI SPERIMENTALI NEL TOPO

C. Palmas (a), D. Wakelin (b) & W. Cabaj (c)

(a) Istituto di Parassitologia, Facoltà di Medicina, Università di Cagliari
(b) Department of Zoology, University of Nottingham
(c) Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland

Riassunto. - La cross immunità tra T. spiralis e T. pseudospiralis è stata studiata su due ceppi di topo, NIH (veloce risponditore) e BlOG (lento risponditore). Mentre negli NIH l'andamento della risposta era simile, nei BlOG T. pseudospiralis rispondeva con una settimana di ritardo nei confronti di T. spiralis. Comunque l'immunità ad entrambi i parassiti poteva essere stimolata da una prima infestazione con il parassita omologo e/o da una inoculazione di antigene di T. spiralis-larve e poteva essere trasferita con cellule di linfonodi prese da topi infestati con il parassita omologo ed eterologo.

Summary. - Comparative experiments were carried out with T. spiralis and T.pseudo spiralis in rapid- (NIH) and slow- (BlOG) responder strains of mice. In NIH mice both parasites stimulated a strong response by day 8 of infection.
In BlOG mice T. spiralis elicited an earlier peak response (day 12) than T.pseudo spiralis (day 18). Immunity to both parasites could be stimulated in NIH mice by prior infection with either parasite, by injection of T. spiralis larval antigen and by adoptive transfer of immune mesenteric lymph node cells taken from mice infected with either parasite.

Introduzione

Trichinella pseudospiralis, descritta per la prima volta da Garkavi nel 1972, si differenzia dalle altre trichinelle per grandezza, infettività ed in particolare per la mancanza della parete cistica intorno alla larva. In letteratura sono state riportate differenze sia dal punto di vista morfologico che dal punto di vista istochimico, ma poco si conosce sugli aspetti immuni (1-2-3).

Studi preliminari condotti in comparazione con T. spiralis hanno dimostrato che la dinamica di espulsione di una prima infestazione era sostanzialmente simile nei topi NIH, ceppo noto per essere un veloce risponditore, mentre differiva nei C57 BlOG, lento risponditore. Per cercare di chiarire alcuni degli aspetti immuni del rapporto parassita-ospite in T. spiralis e T. pseudospiralis, sono state esaminate in dettaglio: a) la stimolazione della immunità con una infestazione naturale e con l'inoculazione di antigene, b) l'attività blastica in vitro e la possibilità di trasferire l'immunità con cellule di linfonodi mesenterici (CLM I) immuni omologhi ed eterologhi.

Materiali e Metodi

Gli animali usati erano topi maschi del ceppo NIH e C57 BlOG di circa 6-8 settimane (OLAC, 1976 Ltd). I gruppi sperimentali erano costituiti da 5 topi. Il ceppo di T. spiralis, il metodo d'infestazione, la raccolta dei parassiti adulti e la tecnica per stimare la fecondità delle femmine sono gli stessi descritti in precedenti lavori (5). Il ceppo di T. pseudospiralis è stato fornito dal Dr Cabaj. L'antigene usato, prodotto da larve di T. spiralis, è stato preparato secondo tecniche standard, mentre i metodi per preparare le sospensioni di cellule e per stimare l'attività blastica in vitro sono stati già descritti (4).

Risultati

Nelle prove di stimolazione della immunità condotte comparativamente con il parassita omologo ed eterologo, nei due ceppi di topo usati, non è stata evidenziata alcuna differenza nel livello di immunità tra l'infestazione omologa e quella eterologa. Questo fatto, già noto per altri elminti intestinali, conferma il presumibile alto numero di determinanti antigenici in comune. Anche nelle prove di immunizzazione con l'antigene grezzo da larve di T. spiralis, gli animali immuni infestati con T. spiralis e T. pseudospiralis non mostravano differenze e in entrambi i casi la carica parassitaria era ridotta di oltre il 50% rispetto ai controlli. Unico fra i parametri esaminati a mostrare risultati divergenti è stata l'attività blastica in vitro. Essa infatti è simile per i due parassiti negli NIH (veloci risponditori), mentre differisce sostanzialmente nei C57 BlOG, dove T. pseudospiralis raggiunge il picco della risposta solo dopo il 18° giorno dall'infestazione, quando T. spiralis non stimola più alcuna risposta blastica (che presenta invece il suo picco dopo 8 giorni).

Per verificare infine la possibilità di trasferire l'immunità con CLMI omologhe ed eterologhe, due gruppi di topi NIH sono stati inoculati i.v. con $3x10^7$ cellule prelevate da animali infestati con T. spiralis e T. pseudospiralis. I gruppi riceventi le cellule sono stati infestati insieme ai gruppi di controllo con il parassita omologo ed eterologo nel giorno del trasferimento. I risultati della tabella 1 mostrano che in entrambi i casi il trasferimento di cellule era efficace sia nei confronti del numero dei parassiti che della fecondità.

Tabella 1. - Trasferimento dell'immunità contro T. spiralis e T. pseudospiralis con CLMI omologhe ed eterologhe in topi NIH (media ± E.S.).

	T. spiralis		fecondità	T. pseudospiralis		fecondità
	n° parassiti		larve/♀/h	n° parassiti		larve/♀/h
Controllo	178.3	14.5	5.2	192.3	17.3	1.1
T. spiralis CLMI	91.6	7.6	2.0	112.4	6.7	0.4
T. pseudospiralis CLMI	94.5	6.8	2.6	88.3	13.8	0.3

Discussione

Sebbene l'immunità crociata tra specie diverse di elminti sia un fenomeno comune, spesso, come ad esempio nel fenomeno infiammatorio, si tratta di un tipo di risposta aspecifica. I risultati ottenuti con T. spiralis e T. pseudospiralis mostrano invece che la risposta ottenuta sia in seguito ad una infestazione naturale che in seguito alla somministrazione di un antigene è di tipo specifico e può essere trasferita contro il parassita eterologo. L'unico dato che appare discordante è quello relativo alla risposta blastica, particolarmente evidente nel ceppo di topi lenti risponditori. La lentezza della risposta può essere interpretata con una minore antigenicità della T. pseudospiralis, anche se questa differenza è così piccola da non essere in grado di influenzare la risposta nel ceppo veloce risponditore. Comunque, sebbene i dati presentati mostrino una qualche differenza tra i due parassiti nella dinamica della espulsione immune, questa non appare influenzare né la cross reattività né la cross resistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. GARKAVI, B. L. 1972. Species of Trichinella isolated from wild animals. Veterinariya 10: 90-91.
2. BRITOV, V. A. 1975. Cross immunity in rats infected with Trichinella spp.. Wiadamoshi Parzytol. 21: 633-638.
3. MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R., SANMARTIN-DURAN, M. L., ORTEGA, M. G. & GARATE, T. 1981. Cross immunity levels among sibling species of Trichinella. In: Trichinellosis. C.W. Kim, E.J. Ruitemberg & J.S. Teppema (Eds), Reedbooks Ltd, Chertesey.
4. PALMAS, C., CONCHEDDA, M., BORTOLETTI, G. & GABRIELE, F. 1985. In vitro cellular immune response in mice and rabbits immunized with Trichinella spiralis antigen. Boll. Ist. Sier. Terap. Milanese. in press
5. WAKELIN, D. & WILSON, M.M. 1977. Transfer of immunity to Trichinella spiralis in the mouse with mesenteric linpho-node cells: time of appearance of cells in donors and expression of immunity in recipients. Parasitology 74: 215-224.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 431-432

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI UN ANTICORPO MONOCLONALE DIRETTO VERSO L'ANTIGENE "5" DI ECHINOCOCCUS GRANULOSUS E SUO IMPIEGO NELLA DIAGNOSI SIEROLOGICA DELLA IDATIDOSI UMANA

C. Pini, C. Afferni, G. Di Felice & G. Vicari

Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Summary (Isolation and characterization of a monoclonal antibody specific for Echinococcus granulosus antigen 5, and its use in the serodiagnosis of human hydatidosis). - A monoclonal antibody specific for antigen 5 of the parasite Echinococcus granulosus has been isolated and characterized, and has been used in the serodiagnosis of the human hydatidosis using the double diffusion for "arc 5" (DD5) technique.

L'immunodiagnosi della idatidosi umana, malattia causata dal parassita Echinococcus granulosus, si basa sulla valutazione degli anticorpi prodotti verso i due maggiori antigeni del parassita, l'antigene 5 e l'antigene B, ed in particolare di quelli specifici verso l'antigene 5. Per accrescere la sensibilità e la specificità delle tecniche immunodiagnostiche impiegate, un importante obbiettivo da raggiungere è la preparazione di anticorpi di riferimento nella valutazione della reattività dei sieri dei pazienti. A tale scopo sono stati prodotti anticorpi monoclonali mediante la fusione di cellule di mieloma con cellule spleniche provenienti da topi precedentemente immunizzati con liquido idatideo ovino parzialmente purificato. Tali anticorpi sono stati caratterizzati mediante doppia diffusione in gel di agar (DD), immunoelettroforesi (IEF) e immuno-blotting. Un anticorpo monoclonale anti-antigene 5 è stato usato nella DD5 come anticorpo di riferimento insieme ai sieri umani in esame, provenienti da 35 pazienti con idatidosi accertata chirurgicamente. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con altre tecniche sierologiche in grado di evidenziare specificamente gli anticorpi anti-antigene 5, quali la IEF, e con tecniche meno specifiche, quali la DD e la emagglutinazione indiretta (IHA). L'impiego di tale anticorpo monoclonale nella tecnica DD5 ha permesso di rilevare anticorpi specifici per l'antigene 5 nel 52% dei sieri di soggetti con idatidosi provati. Tutti i sieri positivi in DD5 risultano inoltre positivi per l'arco 5 in IEF, indicando che le due tecniche non sono differenti per sensibilità ($p > 5\%$). Le percentuali di positività più elevate ottenute con la DD e la IHA sono spiegabili con la minore specificità di tali tecniche.

Risulta evidente che l'impiego di un anticorpo monoclonale specifico per l'antigene 5 consente di disporre di un reagente monospecifico per la DD5 senza ricorrere a procedure di assorbimento di sieri di coniglio polispecifici ed evitando così la variabilità che tali tecniche comportano.

Tabella 1. - (Sensibilità della tecnica DD5 con anticorpo monoclonale, di due tecniche sierologiche classiche (IHA e DD) e di una tecnica specifica per l'antigene 5 (IEF) valutata su 35 pazienti affetti da idatidosi.

Tecnica	sieri positivi	
	N°	%
IHA	32	91
DD	29	83
IEF	20	57
DD5	18	52

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 433-434

ANTIGENI DI ECHINOCOCCOSUS GRANULOSUS STIMOLANO IN VITRO LA TRASFORMAZIONE DEI LINFOCITI DI PAZIENTI AFFETTI DA IDATIDOSI

A.Siracusano (a),S. Notargiacomo(a), A.Teggi (b)

a) Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità,Roma
b) II^Cattedra di Malattie Infettive,Università di Roma

Riassunto - Gli Autori descrivono la loro esperienza sulla blastizzazione linfocitaria osservata ponendo a contatto i linfociti del sangue periferico di soggetti affetti da idatidosi con liquido cistico *in toto* e sue frazioni purificate

Symmary - The Authors describe their experience about the lymphocyte blastization obtained with peripheral blood lymphocytes of subjects with hydatid disease incubated with crude hydatid fluid and some hydatid purified fractions.

Introduzione

La diagnosi sierologica della idatidosi umana si basa sulla valutazione della risposta anticorpale verso antigeni di Echinococco. L'antigene più immunoreattivo e più specifico sembra essere l'antigene (5 (o A); altri antigeni quali l'antigene B o l'antigene polisaccaridico presente sia nel liquido idatideo che nella membrana, sono meno reattivi o comunque dotati di minore specificità (1).

Il test della trasformazione linfocitaria ai fini di immunodiagnosi della idatidosi umana è stato impiegato molto meno in comparazione con i metodi sierologici. Tuttavia una reattività linfocitaria verso liquido idatideo è stata dimostrata in pazienti di idatidosi (2,3).

Materiali e Metodi

Utilizzando un test di trasformazione linfocitaria, che misura l'incorporazione di timidina triziata *in vitro*, abbiamo analizzato 12 pazienti affetti da idatidosi (8 con cisti epatica, 2 con cisti disseminate e 2 con cisti polmonare) e 14 controlli sani.Sono state utilizzate quattro preparazioni antigeniche: il liquido cistico idatideo di origine ovina, una frazione purificata preci-

pitata a PH5,a bassa molarità, dal liquido cistico e contenente l'antigene 5 (A) e l'antigene B (Fr A+B), la frazione residua di liquido cistico (Super ppt a Ph 5) (4), ed un antigene polisaccaridico purificato dalla membrana di cisti idatidea (5).

Risultati

Dei 12 pazienti testati 12 (100%) hanno mostrato una trasformazione linfocitaria con il liquido cistico, 8(67%) con la frazione A+B, 12 (100%) con la frazione Super pH 5 e 4(36%) con l'antigene polisaccaridico purificato. I controlli sani sono risultati tutti negativi.

Discussione

Dall'analisi dei risultati si può notare che per tutti i pazienti il test di trasformazione linfocitaria è risultato positivo utilizzando come preparazione antigenica il liquido cistico in toto analogamente a quanto si verifica nel caso delle varie tecniche sierologiche in uso per la valutazione della risposta umorale. A differenza di quanto si riscontra nel caso della immunità umorale, dove la maggiore reattività del paziente è rivolta verso l'antigene 5 (oA) contenuto nella frazione pptpH5,nel caso dell'immunità cellulare, in base ai nostri risultati, la risposta è maggiormente rivolta verso un antigene (o antigeni) diversi dall'antigene 5. Tali antigeni sono contenuti nella frazione residua (sopranatante) di liquido idatideo dopo precipitazione degli antigeni 5 (o A) e B a pH5 e a bassa forza ionica; essi non sono stati ancora isolati e caratterizzati e comunque non sono da identificarsi con l'antigene polisaccaridico come dimostrato dalla bassa reattività di questo ultimo nel test di trasformazione linfocitaria.

BIBLIOGRAFIA

1. CAPRON ET AL. Le diagnostic immunologique de l'echinococcose humaine (bilan personnel à propos de 400 observations). 1970. Pathol. et Biol.18:357-365
2. MIGGIANO V., FERRARI S., INGRAO F. Echinococcus Granulosus and lymphocyte stimulation.1966. Lancet 2:1422
3. YUSUF I.N.,FRAYA G.B. & MALAKIAN A.H. Echinococcus Granulosus: host lymphocyte transformation by parasite antigens. 1975. Exp.Parasitol. 38:30-37
4. ORIOL R.,WILLIAMS J.F., PEREZ ESANDI M.V.& ORIOL C. Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus Granulosus from sheep hydatid fluid. 1971. Am.J.Trop.Med.Hyg.20:569-574
5. RUSSI S., SIRACUSANO A. & VICARI G. Isolation and characterization of a blood P_1 active carbohydrate antigen of Echinococcus Granulosus cyst membrane. 1974. J.Immunol.112:1061-1069

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 435-438

INDAGINE SUI CASI DI IDATIDOSI UMANA OPERATI IN SARDEGNA NEL PERIODO 1974-1981

M. Conchedda, S. Capra, F. Putzolu, G. Bortoletti, C. Palmas, F. Gabriele

Istituto di Parassitologia, Università degli Studi, Cagliari

Riassunto. - Vengono riferiti i primi risultati relativi ad una indagine retrospettiva sui casi di Idatidosi umana operati in Sardegna tra il 1974 e il 1981. I dati sono stati correlati alla struttura della popolazione per evidenziare l'impatto dell'Idatidosi come problema di salute pubblica, nelle diverse aree e nei diversi gruppi di popolazione.

Summary (Survey on hydatid disease in man in Sardinia from 1974 to 1981). - First results of a retrospective survey on human cases of hydatid disease surgically treated in Sardinian hospitals from 1974 to 1981 and correlation with structure of population are reported.

Introduzione

La reale prevalenza dell'idatidosi nell'uomo non può essere misurata direttamente, a causa della asintomaticità di un certo numero di casi. Si può solo stimare la diffusione della malattia, sulla base dei casi giunti alla diagnosi e all'intervento (1). Questa nota riferisce sui primi risultati ottenuti nel corso di un'indagine retrospettiva sui casi di Idatidosi operati in Sardegna tra il 1974 e il 1981.

Materiali e Metodi

I dati anagrafici e clinici relativi ai pazienti operati di Idatidosi sono stati raccolti direttamente presso i centri chirurgici della Sardegna. Il nostro ringraziamento va ai Sanitari dei centri stessi, che consentendo la raccolta dei dati hanno reso possibile questo studio. I dati sulla struttura della popolazione sono stati desunti dalle pubblicazioni ISTAT sul censimento generale della popolazione del 1981.

Risultati

I primi risultati dell'indagine evidenziano:

a) Un'incidenza media annua di casi operati di 11.1‰ abitanti, con una leggera prevalenza nei maschi (12.0‰, contro 10.3‰ nelle femmine).

b) Il tasso di incidenza aumenta con l'età, giacchè il periodo pre-patente è in genere piuttosto lungo (2) e le classi più colpite risultano essere quelle adulte, in particolare dai 40 anni (Fig. 1).

c) Nei giovani al di sotto dei 20 anni vi è una prevalenza delle localizzazioni polmonari rispetto alle epatiche (Fig. 1). Negli adulti è invece prevalente la localizzazione epatica che costituisce il 56% dei casi globalmente censiti.

d) Tra le provincie della Sardegna la più colpita è quella di Nuoro (16.8‰), seguita da Sassari (13.3‰), Oristano (9.8‰) e Cagliari (7.3‰). Si conferma che all'interno delle singole provincie il contributo più alto alla malattia è fornito dalle zone rurali e soprattutto da quelle ad economia prevalentemente pastorale.

e) Nella Sardegna nel suo complesso, così come nelle singole provincie è stata osservata una alta diffusione dell'idatidosi in tutte le categorie professionali, ma con una forte prevalenza tra gli addetti all'agricoltura e pastorizia per i quali in provincia di Nuoro si è rilevata un'incidenza di 52.4‰ addetti

f) Analizzando l'andamento nel tempo nelle quattro provincie, utilizzando anche i dati di una precedente indagine riferita agli anni 1969-73 (3), si può osservare un certo calo graduale di incidenza ma la situazione mostra di essere stazionaria nella provincia più colpita (Nuoro).

g) Il calo osservato sembra non interessare le localizzazioni epatiche, mentre è a carico di quelle polmonari e in altri organi (Fig. 2).

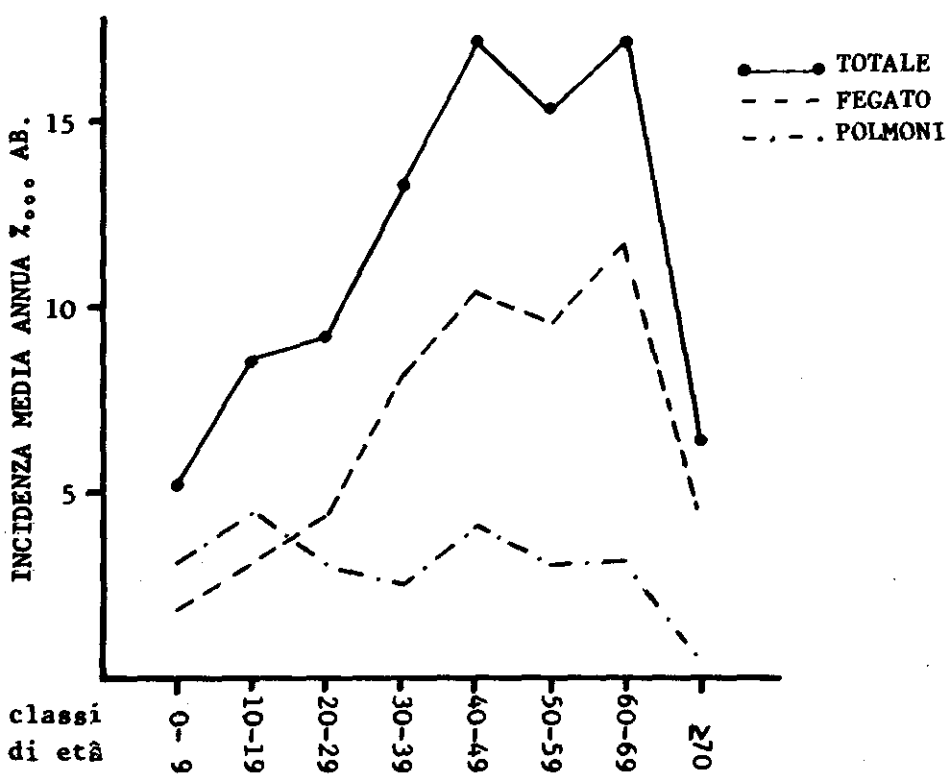


Fig. 1. - Incidenza media annua ‰ ab. per classi di età e localizzazione.

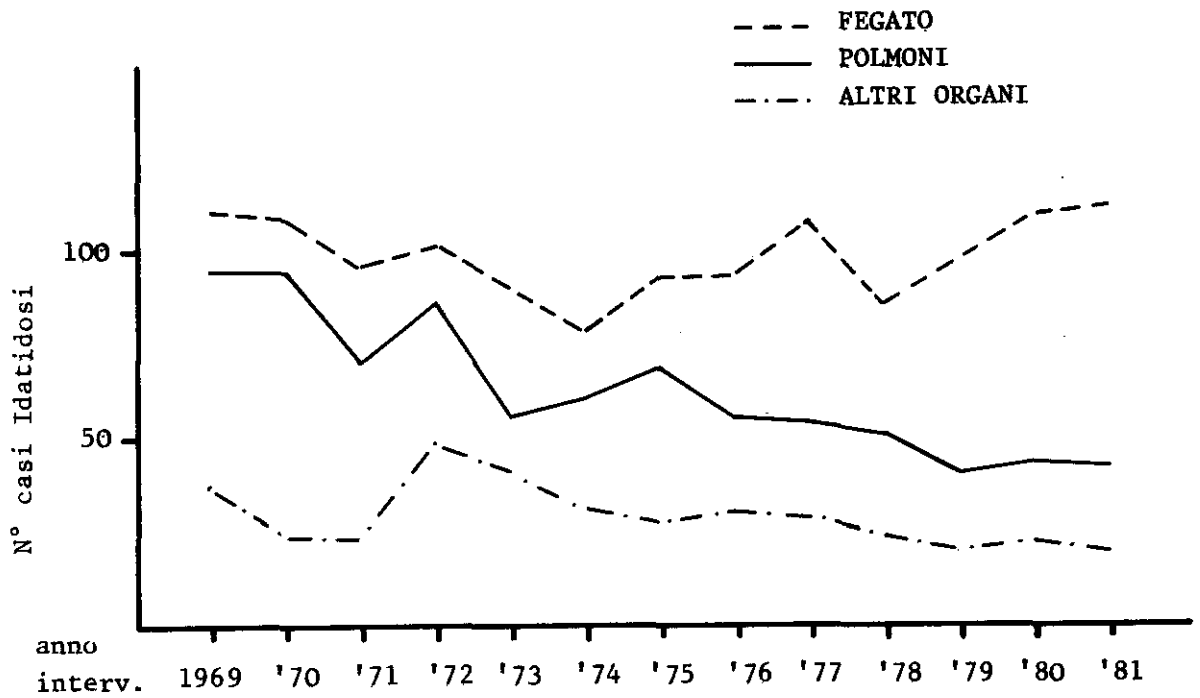


Fig. 2. - Casi di Idatidosi per anno di intervento e localizzazione delle cisti

Discussione

Il tasso rilevato rappresenta solo una sottostima della reale diffusione della parassitosi che si può stimare circa 3-4 volte più alta (4-5). Lo stato di endemicità della malattia, comunque evidenziato ancora una volta, nonostante il lieve calo di incidenza osservato in alcuni zone, conferma la necessità di adottare misure ben pianificate e continue di profilassi e controllo della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. FAO/UNEP/WHO. 1981. Guidelines for surveillance, prevention and control of Echinococcosis/Hydatidosis. WHO, Geneva.
2. BEARD, T.C. 1978. Evidence that a hydatid cyst is seldom "as old as patient". Lancet 1: 30-32.
3. FERRETTI, G., LORI, A., PALOMBA, R. 1977. L'echinococcosi umana in Sardegna nel quinquennio 1969-1973. Epidemiol. e Prevenz. 1: 33-45.
4. BO, G., MAIDA, A, MURA, R., MURESU, E. 1978. Indagine epidemiologica sulla idatidosi umana in provincia di Sassari dal 1964 al 1974. Ig. Mod. 71: 373-425.
5. MURA, I., ROMANO, G., GINANNESCHI, R., PECKMAN, A. 1981. L'idatidosi umana in provincia di Sassari: indagine epidemiologica nel periodo 1975-80. N. Ann. Ig. Microbiol. XXXII: 159-177.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986) pp. 439-442

RISULTATI PRELIMINARI DI UNA INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DELL'ECHINOCOCCOSI/IDATIDOSI NEL NOSTRO PAESE

R. Lorenzini, A. Ruggieri, R. Verticchio

Laboratorio di Medicina Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità - ROMA

Riassunto. - Vengono riportati i risultati di una indagine epidemiologica condotta in Italia dal 1979 al 1983 attraverso la rete informativa dei Macelli Pubblici dei capoluoghi di provincia. I risultati evidenziano la diminuzione della malattia nelle aree a maggior sviluppo zootecnico mentre si osserva una grave incidenza e talora una recrudescenza in alcune regioni del Centro e nelle Isole.

Summary. - First results of an epidemiological survey carried out in one hundred slaughterhouses in Italy from 1979-1983 are reported. Decrease of the disease in some areas has to be related to zoothecnic development rather than other factors.

Introduzione

L'interesse che l'echinococcosi/idatidosi continua a rivestire nei vari campi di studio (epidemiologico, biologico, terapeutico) e l'importanza che la malattia da sempre ha nelle attività di Sanità Pubblica del nostro Paese, ci ha spinto a questo tipo di indagine. Mentre esistono varie, numerose e per certi aspetti molto particolareggiate indagini riguardanti situazioni locali (Autori vari citati da Arru et al., 1983), le uniche ricerche su scala nazionale sono state condotte attraverso la rete informativa del Ministero della Sanità, da Cilli e Pellegrini nel 1955 e da Romboli et al. nel 1980.

Materiali e metodi

Con un questionario, inviato ai mattatoi dei capoluoghi di provincia del nostro Paese è stata condotta una indagine sul reperto di cisti idatidee nella specie bovina, ovi-caprina, suina ed equina dal 1979 al 1983. L'associazione della specie ovina e caprina pur costituendo un limite alla valutazione dei dati nelle singole specie, è stata dettata da esigenze di elaborazione delle informazioni pervenute e dal fatto che, essendo i gruppi costituiti da ovini e caprini, sono soggetti alla stessa influenza eziologica seppur con le differenze già illustrate da Biocca et al. (1958). Pur con i limiti derivanti da tale tipo di informazioni di base che potremmo considerare restrittive rispetto al problema reale, noi consideriamo significativo il confronto di questi dati con i precedenti; inoltre la ricerca costituisce una continuità con l'ultima indagine su scala nazionale relativa al periodo 1968-1978 e ci ha consentito di effettuare una analisi comparativa sull'andamento della malattia negli ultimi 30 anni.

Risultati

Si sono ottenute informazioni adeguate da tutte le Regioni italiane, dato che il 90% dei Macelli interpellati ha risposto al questionario. Le specie più colpite risultano nell'ordine: gli ovini ed i caprini che hanno avuto una incidenza annua max. del 5,45% e min. del 4,57%; i bovini (max. 0,72%, min. 0,54%); i suini (max0,4%, min. 0,2%). Gli equini hanno avuto incidenza inferiore allo 0,3%.

Discussione

In confronto con Pellegrini e Cilli (1955) e Romboli et al. (1980) risulta che, a livello nazionale, negli ultimi 30 anni, la situazione non presenta variazioni per le specie ovina e caprina, mentre per bovini, suini ed equini (questi ultimi non considerati da Cilli e Pellegrini) è possibile ipotizzare una linea di tendenza negativa. E' ovvio che occorre considerare il numero sempre crescente di bovini e suini macellati nelle zone a minor diffusione della malattia; da qui un rapporto inverso tra l'incremento zootecnico nelle aree igienicamente più evolute e la diffusione della malattia. Molto diversa appare la situazione tra il Nord (Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Val d'Aosta, Trentino Alto Adige, Liguria, Emilia Romagna), il Centro (Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo, Molise), il Sud (Campania, Basilicata, Puglia, Calabria) e le Isole (Sicilia, Sardegna). Rispetto al 1955 per i bovini è confermata la diminuzione del fenomeno a livello nazionale (dal 9,15% allo 0,72%) anche se nel Sud (1,7%) e nelle Isole (7,1%) la malattia ha ancora proporzioni molto preoccupanti. Sembra che al Sud ci sia una stabilità e nelle Isole una recrudescenza. Per gli ovi-caprini si osserva un decremento al Nord (6,54% nel 1955 allo 0,3% nel 1983) una stabilità al Centro (4,5%) ed al Sud (5%) ed addirittura un significativo costante aumento nelle Isole (19%).

In suini ed equini la malattia è in costante diminuzione dal 1955 ad oggi al punto tale che la percentuale è apparsa inferiore all'1% anche nelle Isole. In Sardegna in particolare il fenomeno può essere legato alla Profilassi della Peste Suina Africana che ha determinato una riduzione notevole del patrimonio suinicolo.

Il disegno I mostra la diffusione della malattia negli ultimi 30 anni negli ovi-caprini considerati come indicatore di sanità. Nel 1955 le regioni più colpite erano Sardegna, Toscana, Emilia-Romagna, Umbria e Puglia e la diffusione era pressochè simile in tutto il territorio nazionale con l'eccezione della Lombardia e della Liguria che avevano percentuali di infestione minori dell'1%. Da questa situazione si è passati ad un miglioramento continuo e graduale al Nord ed in Toscana, Emilia-Romagna, Umbria, Marche e Campania; purtroppo con il mantenimento della stessa incidenza al Sud e nelle Isole. Più grave è l'attuale inasprimento della malattia in Abruzzo sino a livelli del 46%.

Da questa indagine comparativa negli ultimi 30 anni emerge che:

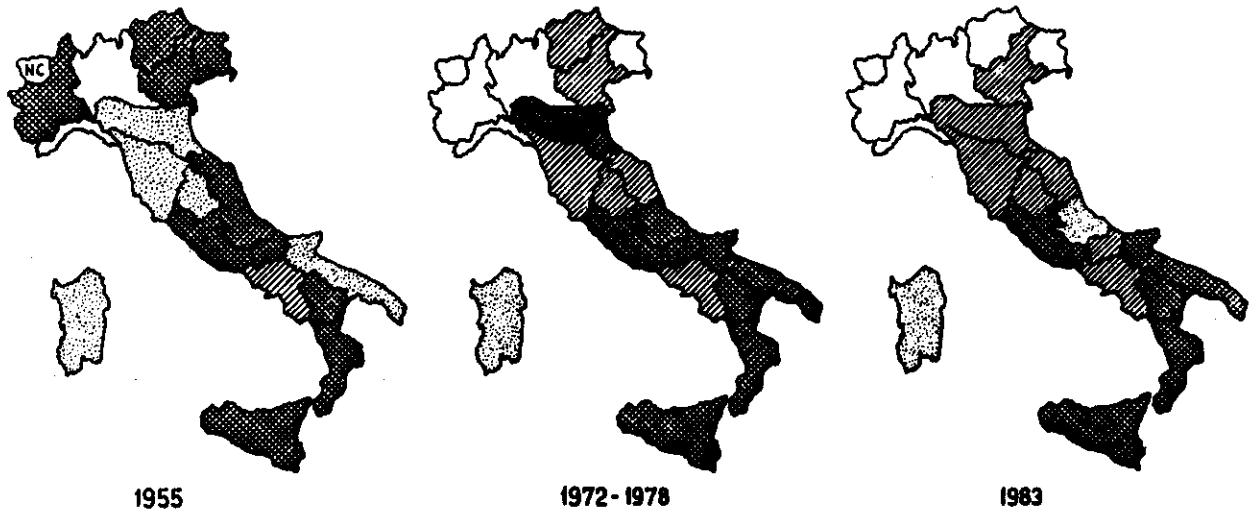
- nelle specie suina ed equina con le mutate condizioni igieniche, zootecniche ed in qualche caso anche ecologiche, si osserva una diminuzione del fenomeno a livelli inferiori all'1% non solo su scala nazionale ma anche parziale;
- nella specie bovina una pericolosa stabilità della diffusione della malattia nelle Isole;
- nelle specie ovina e caprina, mentre al Nord si osserva una diminuzione netta, nelle Isole ed in Abruzzo si osserva un incremento del fenomeno parassitario;
- la malattia è quasi totalmente scomparsa in relazione allo sviluppo zootecnico.

Da ciò si deduce che, laddove non è possibile modificare i criteri dell'allevamento ovino conducendolo entro termini di rigorosità zootecnica, come accaduto per i bovini ed i suini nelle aree del Nord, gli attuali schemi di profilassi sono insufficienti.

DIFFUSIONE DELL'ECHINOCOCCOSI NEGLI OVI-CAPRINI NEL NOSTRO PAESE

Disegno I

Inferiore all'1% dall'1% al 5% dal 5% al 20% oltre il 20%



BIBLIOGRAFIA

1. BIOCCA E., PELLEGRINI B., ROMBOLI B. Lotta contro l'idatidosi. XX Congresso Nazionale d'Igiene, Roma 1958.
2. ARRU E., MANTOVANI A., VICARI G. Echinococcosis/hydatidosis and teniasis/cysticercosis in Italy. Parasitologial Symposium: Some important parasitic infections in bovines considered from economic and social (zoonosis) points of view, 215-233, Lione, Ottobre 1983.
3. PELLEGRINI D., CILLI V., 1955. L'idatidosi in italia. Annali della Sanità Pubblica, 16: 81-103
4. ROMBOLI B., SCHIAVO A., POGLAYEN G., PAPALIA S., DE GIOVANNI F., MARTINI M.. 1981. Rilevazioni statistiche inerenti l'incidenza della echinococcosi/idatidosi in Italia. Atti della Tavola Rotonda, Echinococcosi/idatidosi, Alghero 1980, 13-18.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 443-444

INDAGINE COPROLOGICA A SÃO TOME' E PRINCIPE(AFRICA EQUATORIALE)

S.Pampiglione(a),S.Visconti(b)e G.Pezzino(c)

(a,b)Cattedra di Parassitologia,Istituto di Malattie Infettive Profilassi e Polizia Veterinaria,Università di Bologna
(c)Centro Nazionale di Educazione Sanitaria della Repubblica Democratica di São Tomé e Principe

Riassunto - Gli Autori hanno svolto nel 1983 un'indagine coprologica nella Repubblica Democratica di São Tomé e Principe, analizzando 1050 campioni di feci, raccolti tra la popolazione apparentemente sana su soggetti scelti a caso e in numero proporzionale alla distribuzione della popolazione sul territorio nazionale(circa l'1% della popolazione recensita). I soggetti esaminati sono stati suddivisi in 3 gruppi di età (0-3 anni,4-12 anni e al di sopra di 12 anni) in modo da avere gruppi più omogenei,in rapporto principalmente alle modalità di vita e al tipo di nutrizione. 488 soggetti erano maschi e 562 femmine. L'indagine é stata preceduta da una sensibilizzazione della popolazione al problema delle parassitosi intestinali e da due indagini conoscitive sul numero di latrine esistenti e utilizzate e sulle credenze ed atteggiamenti della gente in relazione alle elmintiasi.
Gli esami fecali sono stati eseguiti seguendo il metodo Ritchie modificato, su campioni fecali fissati in formalina al 10%. I risultati sono stati i seguenti:
a) Protozoi - Entamoeba coli,43%; Iodamoeba butschlii,9%; Giardia intestinalis,8,8%; Endolimax nana,7%; E.histolytica,5,5%; E.hartmanni,2,5%; Chilomastix mesnili2,3%; Trichomonas intestinalis,0,2%; Balantidium coli,0,1% .
b) Elminti - Trichuris trichiura,87,7%; Ascaris lumbricoides,64,3%;Ancylostomatidae,40,5%; Strongyloides stercoralis,6,8%; Hymenolepis diminuta,0,3%; Schistosoma haematobium,0,2% . Nel 28,2% dei campioni, con punte massime che superano il 50% dei soggetti in alcuni villaggi, sono state messe in evidenza uova di un Heterophyidae molto simile a Metagonimus yokogawai ma non ancora da noi identificato, con le seguenti caratteristiche morfologiche:forma ellissoidale, dimensioni medie µm 25x18,5, parete spessa con opercolo difficile a vedersi, non debordante dal profilo della parete ma che si distingue fochettando per una diversa rifrangenza, presenza di appendice polare puntiforme, colore leggermente bruno. Controlli più approfonditi si rendono necessari per identificare

la specie di trematode in causa e capire se si tratti di un vero parassita umano o di uno pseudoparassita.
L'insieme dei risultati dimostra l'esistenza di una polluzione fecale ambientale intensa e diffusa su tutto il territorio della R. D. di Sao Tomé e Principe, espressione di condizioni di vita antigieniche e pericolose per la salute umana e suggerisce la necessità di intraprendere urgenti misure di risanamento ambientale, se si desidera realmente raggiungere l'obiettivo della "Salute per tutti nell'anno 2000".

Summary - (A coprological survey in São Tomé and Principe, Equatorial Africa) - In 1983 the authors carried out a survey in the Democratic Republic of São Tomé and Principe, analysing 1050 specimens of stools, collected among the population from apparently healthy subjects chosen at random and in a preportional number to the distribution of the population in the regions of the country (about 1% of the population was examined). The examined subjects were divided into 3 age groups (0-3, 4-12, more than 12 years old), to have homogeneous groups in relation principally to modalities of life and nutritional patterns. 488 subjects were male, 562 female. The survey was preceded by a sensitization of the people to the problem of intestinal parasites and by two preliminary surveys about the number of existing latrines and about people's believes and attitudes in relation to helmintiasis.
The tests were made according to the modified Ritchie technic on fecal specimens preserved with 10% formol solution.
The following results were found:
a) Protozoa - Entamoeba coli, 43,0%; Jodamoeba butschlii, 9,0%; Giardia intestinalis, 8,8%; Endolimax nana, 7,0%; E.histolytica, 5,5%; E.hartmanni, 2,5%; Chilomastix mesnili, 2,3%; Trichomonas intestinalis, 0,2%; Balantidium coli, 0,1%.
b) Helmints- Trichuris trichiura, 87,7%; Ascaris lumbricoides, 64,3%; Ancylostomatidae, 40,5%; Strongyloides stercoralis, 6,8%; Hymenolepis diminuta, 0,3%; H.nana, 0,2%; Schistosoma haematobium, 0,2%. In 28,2% of the specimens (with more than 50% of subjects in some villages), eggs of Heterophyidae were found, very similar to Metagonimus yokogawai, but not yet identified by us, with the following characteristics: elliptical shape, average size 25 µ (22,2-27,7) X 18,5 µ (17-21), thick wall, operculum difficult to see, not sticking out from the outline, but visible by focusing being in a different refractiveness, presence of a small polar knob, colour slightly brownish; asymmetric miracidium.
Further investigations are necessary to identify the species of this trematode and to understand if it is a true human parasite or a pseudoparasite.
The general results shows the existence of a heavy fecal pollution all over the territory of the D.R. of São Tomé and Principe, connected with unhygienic life conditions, dangerous for health. This suggests to start urgently a sanitation program.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 445-446

INCHIESTA SULLE CONDIZIONI E L'USO DELLE LATRINE NELLA REPUBBLICA DEMOCRATICA DI SÃO TOME' E PRINCIPE

M. Pirazzi (a) & G. Pezzino (b)

(a) Sociologa, Centro Nazionale Educazione Sanitaria, São Tomé;
(b) Medico, Centro Nazionale Educazione Sanitaria, São Tomé

Riassunto. - Nell'ambito di un programma di educazione sanitaria rivolto alla lotta contro le parassitosi intestinali nella Repubblica Democratica di São Tomé e Principe, gli autori hanno effettuato, in collaborazione con la Direzione di Sanità Pubblica del Ministero della Sanità, una inchiesta sulle condizioni e sull'utilizzazione delle latrine, seguendo una metodologia tendente a valorizzare la partecipazione attiva dei tecnici sanitari nazionali e della popolazione. Sono state visitate tutte la latrine esistenti nel paese e ne sono state registrate le condizioni di manutenzione. Con i proprietari delle latrine, sono stati discussi i difetti tecnici che questi presentavano e si è indagato sui livelli di conoscenza che la popolazione ha dell'importanza igienico-sanitaria nell'uso di latrine, nonché sugli ostacoli alla loro accettazione. Dalla ricerca è emessa l'importanza, nei paesi in via di sviluppo, di associare alle campagne di costruzione di latrine un'attiva opera di educazione sanitaria ed il ruolo essenziale svolto in tali campagne dagli agenti di salute di base.

Summary (Research about conditions and use of latrines in the Democratic Republic of São Tomé and Principe). - Working on a health education programme devoted to eliminate intestinal parasitoses in the Democratic Republic of São Tomé and Principe, the authors carried aut an inquiry about conditions and use of latrines in collaboration with the Departement of Public Health of the Health Ministry. They followed a methodology bound to bring out the active participation of the people and of the local health technicians. They visited all the latrines in the country and collected data about maintenance conditions. They discussed the defects of the latrines with their owners and inquired into population knowledge of hygienic importance in using latrines, as well as the obstacles to their acceptance. The research puts in evidence the importance, in the developing countries of combining a sound activity of health education with building latrines campaigns and the essential role of communitary health agents in those ones.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 447-448

INDAGINE SUGLI ASPETTI CULTURALI RELATIVI ALLE ELMINTIASI INTESTINALI NELLA REPUBBLICA DEMOCRATICA DI SÃO TOME' E PRINCIPE (AFRICA EQUATORIALE)

M. Pirazzi (a) & S. Pampiglione (b)

(a) Centro Nazionale di Educazione Sanitaria della Repubblica Democratica di São Tomé e Principe
(b) Cattedra di Parassitologia, Università degli Studi, Bologna

Riassunto. - Nell'ambito di un programma di educazione sanitaria nella Repubblica Democratica di São Tomé e Principe, gli autori hanno condotto un'indagine sulle credenze della popolazione circa le elmintiasi intestinali, gli atteggiamenti di fronte alla presenza dei parassiti, l'origine degli stessi e la terapia con rimedi empirici tradizionali. La ricerca ha messo in luce la somiglianza delle convinzioni espresse dai santomensi con quelle rilevate da diversi autori in ambienti rurali italiani e con opinioni di alcuni illustri medici di secoli passati. I risultati dell'indagine hanno confermato l'importanza del fattore culturale in campagne di educazione sanitaria contro le elmintiasi intestinali.

Summary (Research about cultural aspects related with intestinal parasites in the Democratic of São Tomé and Principe, Equatorial Africa). - Working in a health education programme in the Democratic Republic of São Tomé and Principe, the authors carried out a research work about the popular believes concerning the intestinal helminthiases, the attitudes associated with the parasites' presence, their origin and the treatment based on empirical healing tradition. The research pointed out the similarity between some believes belonging to the local population and those collected by some authors in italian rural areas and with the opinions of many physicians living in the past centuries. It also confirmed the importance of evaluating the cultural factors in health education campaigns against intestinal helminthiases.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 449-452

RICERCHE SULLA DIFFUSIONE DELLE FILARIOSI CANINE IN ALCUNE PROVINCE DELLA PIANURA PADANA

G. Canestri-Trotti (a), S. Pampiglione (b) & S. Visconti (a)

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

Riassunto.- Si riferiscono dati relativi alla prevalenza delle filariosi canine nelle province di Ferrara,Piacenza,Rovigo,Vicenza e nel comune di Venezia.

Summary (Research on canine filariasis in some provinces of Po Valley).- The authors studied the prevalence of canine filariasis in the Ferrara,Piacenza,Rovigo,Vicenza provinces and in Venice, urban and suburban areas.

Introduzione

Le scarse conoscenze sulla distribuzione geografica delle filariosi canine nel nostro Paese ed i casi di dirofilariosi umana giunti di recente alla nostra osservazione (1,2,3) per la maggior parte dalla Pianura Padana,ci hanno indotto a verificarne la presenza nei cani di questa area.

Materiali e Metodi

Sono stati esaminati 773 cani di oltre un anno,scelti a caso e così ripartiti: 149 della provincia di Ferrara,215 della provincia di Piacenza,169 della provincia di Rovigo,145 del comune di Venezia e 90 della provincia di Vicenza.L'indagine é stata effettuata mediante ricerca delle microfilarie,secondo la tecnica di Knott modificata (4),identificate in base alle caratteristiche riportate dalla maggior parte degli autori italiani che si sono occupati dell'argomento (5,6,7,8) e alla nostra esperienza. Sono state,inoltre,eseguite complessivamente 73 necroscopie per la ricerca dei nematodi adulti.

Risultati

In provincia di Ferrara 44 cani (29,5%) sono risultati positivi: 43 (28,9%) per microfilarie riferibili a Dirofilaria immitis ,3 (2,0%) a D. repens e 2 (1,3%) ad entrambe le specie. Si é eseguita la necroscopia di 44 cani, 41 con microfilaremia e 3 negativi : in tutti i 41 positivi era stata rilevata la presenza di microfilarie riferibili a D. immitis ed in 2 anche a D. repens. Le necroscopie hanno confermato queste diagnosi,rivelando però in altri 2 cani la presenza di adul-

ti di D. repens; nei 3 soggetti apparsi precedentemente negativi,si sono ritrovati adulti di D. immitis.

In provincia di Piacenza 73 cani (33,9%) sono risultati positivi: 42 (19,5%) per microfilarie riferibili a D. immitis, 30 (14,0%) a D. repens e 1 (0,5%) a Dipetalonema reconditum. Si é eseguita la necroscopia di 2 cani: 1 considerato positivo per D. repens e 1 per D. reconditum.Solo nel primo caso la necroscopia ha confermato la diagnosi microscopica.

In provincia di Rovigo 76 cani(45,0%) sono risultati positivi: tutti per microfilarie riferibili a D.immitis e di questi 5(2,9%) anche per microfilarie riferibili a D.repens. Si è eseguita la necroscopia di 24 cani considerati positivi per D.immitis, 2 dei quali anche per D.repens . In tutti i casi la necroscopia ha confermato la diagnosi microscopica.

Nel comune di Venezia 20 cani(13,8%) sono risultati positivi: 7(4,8%) per microfilarie riferibili a D.immitis, 12(8,3%) a D.repens e 1(0,7%) a D.reconditum. Si è eseguita la necroscopia di 3 cani, 1 positivo per D.immitis, 1 per D. repens e 1 per D.reconditum. La conferma necroscopica si è avuta solo nei primi 2 cani.

Nella provincia di Vicenza 11 cani(11,6%) sono risultati positivi; 10(10,5%) per microfilarie riferibili a D.immitis, 2(2,1%) a D.repens e 3(3,2%) a D.reconditum . Sono state riscontrate insieme,in 2 cani,microfilarie riferibili a D.immitis e D. repens ed in altri 2 cani D. immitis e D. reconditum. In questa provincia non si sono potuti effettuare esami necroscopici.

Discussione

Le necroscopie ,anche se limitatesi a circa il 10% dei soggetti considerati, ci hanno permesso di verificare la corrispondenza fra il risultato degli esami microscopici e necroscopici in 67 su 73 cani e fornito ulteriori elementi di conferma circa la validità dei criteri adottati per la differenziazione delle microfilarie,dandoci quindi la possibilità di trarre alcune considerazioni di ordine epidemiologico.

Le filariosi canine nelle zone considerate ,anche senza raggiungere globalmente i livelli di frequenza osservati nelle province di Vercelli (5) e Pavia (7), sono risultate assai diffuse,come era del resto lecito attendersi per la presenza nelle aree considerate di ambienti adatti alla proliferazione dei vettori.

L'aspetto più rilevante messo in luce dalla ricerca é però l'elevata diffusione di D. immitis, risultata la specie più frequente in tutta l'area considerata,tranne che nel territorio del comune di Venezia,raggiungendo punte anche superiori a quelle già osservate in provincia di Vercelli (5) per questa specie.

Anche D. repens é risultata piuttosto frequente, soprattutto in provincia di Piacenza,dove ha raggiunto la più elevata diffusione (14%),subito seguita da quella osservata nel territorio del comune di Venezia (8,3%). In entrambe queste province sono stati segnalati casi di dirofilariosi sottocutanea umana (1,2).

Il reperto di D. reconditum é apparso invece relativamente raro, a differenza di quanto osservato in Piemonte (5),in provincia di Pavia (7) ed in Sardegna (6).

BIBLIOGRAFIA

1. PAMPIGLIONE,S. FRANCO,F. & CANESTRI-TROTTI,G. 1982. Human subcutaneous diro-

filariasis. 1) Two new cases in Venice. Identification of the casual agent as Dirofilaria repens Raillet and Henry,1911. Parassitologia 24: 155-165.

2. PAMPIGLIONE,S. CANESTRI-TROTTI,G. & SQUADRINI,F. 1982. Human subcutaneous dirofilariasis. 2) A report of 5 new cases of Dirofilaria repens in Central and Northern Italy and of a sixth case with uncertain parasitological diagnosis. Parassitologia 24: 167-176.
3. PAMPIGLIONE,S. RIVASI,F. & CANESTRI-TROTTI,G. 1984. Human pulmonary dirofilariasis in Italy. Lancet 2: 333.
4. HIRTH,R.S. HINZINGA,H.W. & NIELSEN,S.W. 1966. Dirofilariasis in Connecticut dogs. J.Am.vet.med.Ass. 148: 1508-1516.
5. BALBO,T. & PANICHI,M. 1968. La filariosi del cane.Epizoologia e diagnosi di laboratorio.Nuova Vet. 44: 18-32.
6. ARRU,E. NUVOLE,A. & MANN,P. 1969. La filariasi del cane in Sardegna. Riv. Parassit. 30: 49-58.
7. LOCATELLI,A. 1971. Sulle filariasi animali in provincia di Pavia.Parassitologia 13: 197-202.
8. MARCONCINI,A. MACCHIONI,G. CARDINI,G. & BRACA,G. 1976. Indagine epidemiologica sulla filariasi del cane in Toscana. Atti Soc.ital.Sci.vet. 30: 607-609.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 453-456

TRICHINELLA SPIRALIS: EVIDENZA DI UNA RITENZIONE POLMONARE DELLE LARVE "NEW-BORN"

F. Bruschi (a), S. Solfanelli (b), F. Ambrogi (c), C. Giuntini (b) & R.A. Binaghi (d)

(a) Istituto di Patologia Generale, Policlinico Monteluce, Perugia;
(b) Istituto Fisiologia Clinica del C.N.R., Pisa;
(c) Clinica Medica I, Pisa;
(d) Centre d'Immunologie et de Physiologie Cellulaires, Hôpital St. Antoine, Paris, France

Riassunto. - Viene analizzata la distribuzione delle larve "new-born" di Trichinella spiralis (NBL), marcate con ^{131}I, mediante una tecnica scintigrafica, nel ratto normale. In questa maniera è stata evidenziata una ritenzione polmonare delle NBL iniettate per via endovenosa.

Summary (Trichinella spiralis: evidence for pulmonary retention of "new-born" larvae). - We have studied the distribution of T. spiralis ^{131}I - labeled NBL by a scintigraphic method, in normal rat. In this way we have showed a pulmonary retention of NBL injected intravenously.

Introduzione

Il destino delle larve migranti di T. spiralis, una volta che queste sono state liberate nel lume intestinale, è piuttosto controverso e non è ancora chiaro che cosa succeda prima che le larve si incistino nei muscoli striati (1). Ancora meno noto è il tempo che intercorre dall'attraversamento della mucosa intestinale al raggiungimento del muscolo. Ciò assume particolare rilevanza alla luce di recenti risultati che dimostrano un aumento delle resistenza in vivo delle NBL, durante le prime 20 ore di vita (2). Per capire meglio questo aspetto del ciclo della T. spiralis abbiamo cercato di studiare il destino di NBL marcate con radioisotopo, iniettate per via endovenosa nel ratto normale. Abbiamo preferito, per i nostri scopi, un tecnica scintigrafica rispetto ad altre metodiche in precedenza usate da alcuni di noi (3), al fine di poter studiare in maniera dinamica il fenomeno.

Materiali e Metodi

Abbiamo impiegato ratti Sprague-Dawley maschi, di peso 200 g; questi sono stati anestetizzati con un cocktail di anestetici (droperidolo: 1,25 mg/kg; fentanil base: 0,025 mg/kg; ketamina: 25 mg/kg di peso corporeo); in questa maniera gli animali potevano essere seguiti per almeno un'ora, senza che si modificassero le geometrie delle aree analizzate.

Le NBL sono state ottenute in vitro secondo le metodiche comunemente impiegate (4) e sono state marcate con ^{131}I con il metodo della cloramina T che in precedenza si è rivelato ininfluente sull'infettività delle larve stesse (3).

Dalle 7.000 alle 10.000 NBL marcate (^{131}I NBL), con un'attività variabile dai 10 ai 17μ Ci a seconda degli esperimenti, sono state iniettate e.v. agli animali di esperimento; per controllo della diffusione dello ^{131}I libero, dopo circa un'ora dall'iniezione delle larve, agli stessi animali è stato iniettato l'isotopo non legato endovena. Per confrontare le immagini ottenute con le larve, ad altri ratti sono state iniettate e.v. microsfere di albumina umana marcate con ^{99}Tc (HAM-^{99}Tc), utilizzate comunemente per gli studi di perfusione nell'uomo (5). L'attività delle diverse aree esaminate è stata seguita con una γ - Camera Toshiba GCA-402 e i dati ottenuti sono stati analizzati da un elaboratore elettronico. Sono state registrate attività nell'arco di 300 sec, ad intervalli variabili dall'iniezione fino ad un massimo di un'ora da questa. E' stato inoltre calcolato il tempo medio di transito ($\bar{t}$) delle larve nell'organo che presentava la più alta attività.

Risultati

L'iniezione di HAM-^{99}Tc nel ratto ha permesso di visualizzare le aree polmonari in maniera nitida, senza evidenziazione delle altre parti del corpo (vedi Fig. 1/A). Immagini analoghe sono state ottenute con l'iniezione di ^{131}I NBL che hanno determinato una concentrazione dell'attività nei campi polmonari (Fig. 1/B). I risultati dei conti registrati su aree diverse in due ratti sono illustrati in Tabella 1; la differenza dei conti tra il primo animale ed il secondo è dovuta alla diversa quantità di attività iniettata (rispettivamente 10 e 17μ Ci).

Fig. 1. - Immagini scintigrafiche ottenute con l'iniezione e.v. di HAM-^{99}Tc (A) e di ^{131}I NBL (B). In (B) è evidenziato in basso il punto dell'iniezione avvenuto nella vena del pene dell'animale.

Il $\bar{t}$ di transito delle NBL nei polmoni dei due ratti è risultato rispettivamente di 9,72 ore e 10,30 ore.

Discussione

Dai nostri risultati si può concludere che le larve iniettate e.v. nel ratto vengono ritenute nel polmone al contrario del ^{131}I libero che si diffonde immediatamente a tutto il corpo; in questo organo le NBL sembrano rimanere per un tempo variabile ma significativo è il fatto che dopo un'ora la stragrande maggioranza sia ancora nel polmone. La diminuzione dell'attività polmonare durante i primi 60 minuti potrebbe essere dovuta all'uscita di un certo

Tabella 1. - Attività registrata su aree polmonari e addominali in due ratti.

RATTO 1				RATTO 2			
t (m)	area polm. (conti)	area addom. (conti)	polm./addom.	t (m)	area polm. (conti)	area addom. (conti)	polm./ad.
5	1.310	230	5,70	5	5.752	479	12,00
13	1.202	210	5,72	11	5.692	444	12,67
23	1.098	218	5,03	20	5.531	478	11,57
33	1.083	188	5,76	30	5.367	468	11,47
49	1.077	220	4,90	41	5.296	503	10,52
63	1.026	235	4,37	52	5.231	553	9,46
Dopo iniezione di I:				60	4.988	611	8,16
69	1.694	1.174	1,44	Dopo iniezione di I:			
82	1.556	1.336	1,16	70	5.036	1.452	3,46

quantitativo di larve dal polmone come pure alla distribuzione di una parte di esse, con solubilizzazione delle proteine marcate. Già Perrudet-Badoux e Coll. (3) hanno osservato una caduta della radioattività di polmoni prelevati da topi iniettati per via e.v. con ^{131}I NBL, dopo alcune ore e questa caduta si è dimostrata più rapida se venivano impiegati, anziché topi normali, topi precedentemente infettati con T. spiralis, facendo supporre che alla base di essa vi sia un meccanismo immunitario, responsabile dell'attacco delle NBL. E' ipotizzabile che a livello del polmone avvenga una distribuzione delle NBL che giungono al torrente circolatorio. La recente osservazione che macrofagi alveolari provenienti da ratti infettati con Nippostrongylus brasiliensis sono in grado di determinare la mortalità in vivo di larve dello stadio L_3 di questo parassita (6), rafforza tale ipotesi. Anche nella T. spiralis potrebbe entrare in gioco un analogo meccanismo.

Riteniamo comunque opportuno approfondire lo studio del comportamento delle NBL iniettate in animali che vengono seguiti per tempi più lunghi, anche per capire meglio il loro destino, una volta che sono uscite dal polmone.

BIBLIOGRAFIA

1. HARLEY, J.P. & GALLICCHIO, V. 1971. Trichinella spiralis: Migration of Larvae in the Rat. Exptl. Parasitoly 30: 11-21.
2. BINAGHI, R.A., VENTURIELLO, S.M. & BRUSCHI, F. 1985. Increased infectivity and resistance to cytotoxicity during maturation of migrant Trichinella spiralis larvae. In: Trichinellosis VI (in corso di stampa).
3. PERRUDET-BADOUX, A., BINAGHI, R.A. & BOUSSAC-ARON, Y. 1981. Mechanisms of immune defence against Trichinella spiralis newborn larvae. In: Trichinellosis V. C.W. Kim, E.J. Ruitenberg & J.S. Teppena (Eds).Reedboks, Chertsey.
4. DENNIS, D.T., DESPOMMIER, D.D. & DAVIS, N. 1970. Infectivity of the new-born larva of Trichinella spiralis in the rat. J. Parasitol. 56: 974-977.
5. SORIN BIOMEDICA. 1984. Human albumin microsphere kit. Manuale d'istruzioni.
6. EGWANG, T.G., GAULDIE, J. & BEFUS, D. 1984. Complement-dependent killing of Nippostrongylus brasiliensis infective larvae by rat alveolar macrophages. Clin. Exp. Immunol. 55: 149-156.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 457-460

POSSIBILITA' DI VARIAZIONE ANTIGENICA NELLE LARVE "NEW-BORN" DI TRICHINELLA SPIRALIS

R.A. Binaghi (a), S.M. Venturiello (a) & F. Bruschi (b)

(a) Centre de Physiologie et Immunologie Cellulaires, Hôpital St. Antoine, Paris, France;
(b) Istituto di Patologia Generale dell'Università, Policlinico Monteluce, 06100 Perugia

Riassunto. - In questo studio abbiamo analizzato le modificazioni di resistenza alla citotossicità cellulare anticorpo mediata (ADCC) in vitro e di infettività in vivo di larve neonate di Trichinella spiralis (NBL), durante la loro maturazione. I risultati mostrano che le NBL di due ore sono meno resistenti e meno infettive di quelle di 20 ore.

Summary (A possible antigenic variation in Trichinella spiralis "new-born" larvae). - We have studied the modification of resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in vitro and of infectivity in vivo of Trichinella spiralis "new-born" larvae during their maturation. The results show that two hours "new-born" larvae are less resistant and infective than 20 hours larvae.

Introduzione

La variazione antigenica è uno dei tanti meccanismi che i parassiti mettono in atto per evadere la risposta immune. Questo meccanismo è stato particolarmente studiato nel Tripanosoma africano che è in grado di presentare alla superficie un numero notevole di antigeni differenti in momenti diversi (1). Meno studiati sono fenomeni analoghi in parassiti come gli Schistosomi e soprattutto le Trichinelle. Del tutto recentemente Jungery e Coll. (2) hanno dimostrato una composizione proteica diversa delle NBL a seconda della età con differenze importanti tra quelle fino a 6 ore di vita e le larve di 18 ore.

In questo studio noi abbiamo valutato se vi siano delle differenze della infettività in vivo e della resistenza in vitro all'azione citotossica delle cellule effettrici dell'immunità tra NBL di età diverse al fine di verificare se le differenze di composizione proteica della superficie delle larve possano avere un qualche significato nei rapporti ospite-Trichinella spiralis.

Materiali e Metodi

Sono stati usati ratti Wistar infettati con 7.000 larve muscolari di Trichinella spiralis per l'ottenimento delle larve "new-born".

Per gli esperimenti in vitro sono state utilizzate cellule di essudato peritoneale di topi di ceppo Low antibody Producer (LP) di Biozzi. Per gli esperimenti in vivo sono stati impiegati topi di ceppo Swiss, BALB/c, LP e

High antibody Producer (HP) di Biozzi. Le NBL sono state ottenute in vitro mediante le consuete metodiche (3). Le larve adulte ottenute da ratti al 6° giorno di infezione da Trichinella spiralis venivano incubate da MEM-Eagle con 5% di siero di vitello fetale e quindi filtrate per l'ottenimento delle NBL. Queste venivano utilizzate subito dopo (NBL di due ore) oppure lasciate incubare per altre 18 ore (NBL di 20 ore). Per i test di ADCC sono state utilizzate cellule di essudato peritoneale di topi normali di ceppo LP di Biozzi. Dopo alcuni lavaggi con MEM-Eagle venivano incubate con NBL di due ore e di 20 ore in vita precedentemente opsonizzate con la stessa quantità di antisiero. Questo è stato ottenuto da topi Swiss e HP di Biozzi infettati con Trichinella spiralis da 40-50 giorni. Per aumentare l'efficienza del sistema è stato aggiunto siero fresco di topi normali come fonte di Complemento. La vitalità delle NBL è stata valutata sulla base della loro motilità, all'osservazione alla microscopia ottica, a 24/48 ore dall'incubazione delle cellule. L'infettività in vivo è stata valutata nella maniera seguente: 1.000 NBL di due ore o di 20 ore di vita sono state iniettate per via endovenosa a topi dei vari ceppi. Dopo circa un mese gli animali sono stati sacrificati e le loro carcasse sono state digerite con 10 ml di HCl/litro H_2O e 10 g di pepsina/litro H_2O per l'ottenimento delle larve muscolari. Queste sono state contate per la valutazione dell'infezione, espressa come percentuale di larve muscolari rispetto alle NBL iniettate.

Risultati

Nei test di ADCC dopo due ore dall'incubazione con le cellule sia le NBL di due ore che quelle di 20 ore presentavano cellule aderenti. Dopo 24 ore di incubazione le NBL di due ore avevano una percentuale variabile in mortalità tra il 50 ed il 100%; viceversa le NBL di 20 ore di vita non presentavano una mortalità neppure dopo 48 ore di incubazione con le cellule. Sia le NBL incubate da sole o con cellule in assenza di antisiero, non presentavano alcuna mortalità.

I risultati delle esperienze in vivo sono illustrate in Fig.1.

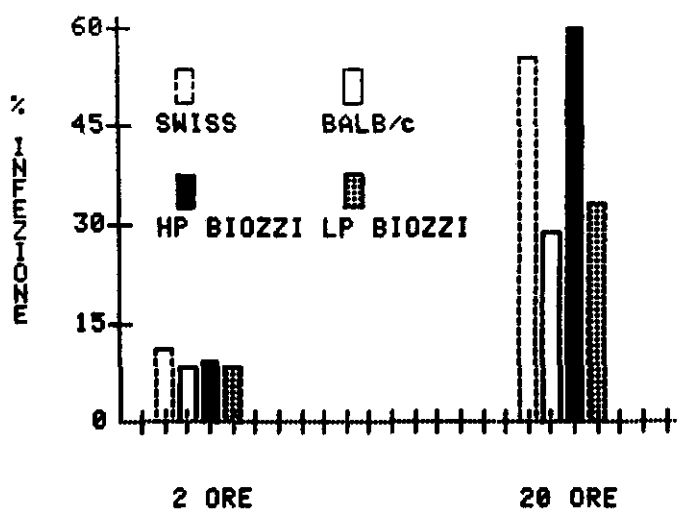


Fig.1. - Infettività di NBL di due ore e di 20 ore di vita in topi di diversi ceppi.

Discussione

Dai risultati ottenuti possiamo concludere che esiste una differente resistenza in vitro e infettività in vivo delle NBL di due ore e di 20 ore nel senso che le prime sono più attaccabili delle seconde dai meccanismi di difesa dell'ospite. Si potrebbe ipotizzare che sono le NBL che riescono a sopravvivere fino a 20 ore quelle che in maggioranza si installeranno nei muscoli. In studi di microscopia elettronica compiuti parallelamente a questi (4) è stato visto che le cellule che aderiscono, dopo due ore di incubazione, alle NBL di due ore di vita sono esclusivamente degli eosinofili, mentre quelle che aderiscono alle NBL di 20 ore, incubate con una identica popolazione cellulare, sono esclusivamente macrofagi. Questo potrebbe spiegare i differenti risultati delle mortalità in vitro e fornire un'ulteriore prova del ruolo di rilievo che gli eosinofili svolgono nei meccanismi di citotossicità delle NBL. Per quanto riguarda gli esperimenti in vivo i topi BALB/c e gli LP di Biozzi sono risultati più resistenti dei Swiss e degli HP di Biozzi; questo viene ad avvalorare precedenti esperimenti in vitro che dimostravano una capacità citotossica di cellule di essudato peritoneale di topi LP nei confronti delle NBL in presenza di anticorpo, che non era invece presente in cellule provenienti nei topi HP di Biozzi (5).

Alla luce dei risultati di Jungery e Coll. non possiamo parlare di variazione antigenica vera e propria in quanto non si ha una sostituzione di proteine sulla superficie delle NBL di età diverse, ma ad una proteina presente da sola a due ore se ne associano delle altre nelle ore successive. Tuttavia dai nostri risultati si può concludere che le NBL durante la loro maturazione subiscono delle modificazioni che le rendono meno attaccabili dal sistema immune; in definitiva siamo di fronte ad un tentativo da parte del parassita di evadere la risposta immune.

BIBLIOGRAFIA

1. GRAY, A.R. 1969. Antigenic variation in Trypanosomes. Bull. World Health Organization 41: 805.
2. JUNGERY, M., CLARK, N.W.T. & PARKHOUSE, R.M. 1983. A major change in superface antigens during the maturation of newborn larvae of Trichinella spiralis. Mol. Biochem. Parasitol. 7: 101-109.
3. DENNIS, D.T., DESPOMMIER, D. & DAVIS, N. 1970. Infectivity of the newborn larva of Trichinella spiralis in the rat. J. Parasitol. 56: 974-977.
4. GANSMÜLLER, A., ANTEUNIS, A., VENTURIELLO, S.M., BRUSCHI, F. & BINAGHI, R.A. 1985. Nature of the cells involved in the in vitro immune cytotoxicity of migrant Trichinella spiralis larvae. Trichinellosis VI (in corso di stampa).
5. PERRUDET-BADOUX, A., BOUSSAC ARON, Y. & BINAGHI, R.A. 1981. Anti Trichinella defence in genetically selected mice: in vitro studies. In: Trichinellosis V. C.W. Kim, E.J. Ruitenberg & J.S. Teppena (Eds). Reedbooks, Chertsey. pp. 115-118.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 461-464

INFEZIONE SPERIMENTALE DEL SUINO CON UN CEPPO ITALIANO DI TRICHINELLA SP. E RESISTENZA DELLE LARVE IN ALCUNI PRODOTTI SALUMIERI

E.Pozio (a), M.Gramiccia (a), Al. Mantovani (b), O.Massi (c) & A.Mantovani (a)

(a) Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Servizio Stabulario, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(c) Centro Carni, Roma

Dal 1900 ad oggi vi sono alcune segnalazioni in Italia di infezioni del suino con Trichinella sp., infezioni quasi sempre riconducibili ad animali allevati allo stato semibrado e quindi in possibile contatto con il ciclo silvestre del parassita (1). In seguito all'identificazione di ceppi italiani come T.nelsoni (2)(o secondo altri autori T.spiralis nelsoni [T.s.n.]), abbiamo voluto studiare la capacità infettante di questi ceppi nei confronti del suino e la sopravvivenza delle larve in prodotti tipici della salumeria italiana, per ottenere informazioni utilizzabili per l'igiene degli alimenti e per evidenziare eventuali differenze da ceppi di T.spiralis spiralis, già studiata da numerosi autori (3)(4).

È stato utilizzato un ceppo isolato dalla volpe (Vulpes vulpes L.) in provincia di Teramo (42°40'N, 13°40'E), mantenuto con passaggi seriali in topi swiss, e secondo Britov (5) appartenente alla specie T.nelsoni. Con questo ceppo sono stati infettati due gruppi di suini: al primo gruppo (due esemplari) sono state somministrate con il mangime 5.000 e 2.000 larve rispettivamente; al secondo gruppo (sei esemplari) sono state somministrate, tramite sonda gastrica, 25.000, 10.000 e 1.000 larve ogni due esemplari. Gli animali sono stati soppressi a tempi diversi come riportato in tabella. A tutti gli esemplari sono stati effettuati ogni 15 giorni prelievi di sangue per seguire l'andamento anticorpale con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta (FAT). Alla macellazione la ricerca e la conta delle larve é stata effettuata tramite digestione artificiale dei vari muscoli o gruppi di muscoli. È stata effettuata la prova biologica per controllare l'infettività delle larve. Con i muscoli di un esemplare infettato con 25.000 larve, sono stati preparati artigianalmente salsiccia, salame e prosciutto crudo. Con i muscoli di numerosi topi infettati con lo stesso ceppo é stata preparata una mortadella (la cottura é stata effettuata in stufa a 70°C per 23h). I prodotti crudi sono stati fatti stagionare in un ambiente secco, ben areato a una temperatura media di 10°C. L'infettività delle larve é stata controllata tramite prova biologica a 5, 10, 15, 20, 25 giorni dalla preparazione per salsicce e salame, dopo 4 mesi per il prosciutto crudo e dopo la cottura per la mortadella.

L'esemplare infettato con 2.000 larve e sacrificato dopo 512 giorni, presentava tutte le larve calcificate, per cui non é stato possibile eseguire la conta

Tabella - Distribuzione delle larve di un ceppo italiano di Trichinella sp. nei muscoli o in gruppi muscolari di suini infettati sperimentalmente.

Dose infettante (N° larve)	25.000		10.000		1.000		5.000
Età alla macellazione (*mesi*)	7,5	11	8	9,5	9	11	9,5
Peso alla macellazione Kg	69	105	73	98	103	87	96
Suino N°	1	2	3	4	5	6	7
Muscoli	N larve/g		N larve/g		N larve/g		N larve/g
Inferiori laterali del collo	125	53	21	17	neg.	neg.	1,3
Filetto	77	29	11	8	neg.	neg.	0,2
Girello	120	58	4	4	neg.	0,04	1,8
Brachiocefalico, Sopraspinoso	216	84	7	9	0,12	0,09	2,9
Lombata	56	22	5	4	neg.	neg.	0,2
Bicipite brachiale	187	58	3	3	neg.	0,05	3,5
Diaframma	248	115	18	17	0,75	0,50	3,5
Lingua	156	61	4	23	0,70	0,50	1
Massetere	181	73	16	16	0,08	0,08	0,1
Intercostali	193	78	6	8	0,28	0,18	0,4
Pancetta	317	122	9	8	0,12	0,12	1,2
Glutei	238	92	7	8	neg.	neg.	2,2
Gastrocnemio mediano e laterale	206	80	2	2	neg.	neg.	0,6
Dorsali del collo	101	39	9	8	0,28	0,20	0,4
Tibiale anteriore e posteriore	60	23	1	1	neg.	neg.	0,9
Spalla	170	66	9	6	0,04	0,02	1,2
Quadrato e quadricipite femorale	303	111	7	6	neg.	neg.	1,5

dei parassiti; in tabella é riportata la distribuzione delle larve nei muscoli dei sei suini del secondo gruppo e nell'esemplare infettato con 5.000 larve. I sieri all'FAT hanno mostrato una risposta anticorpale omogenea per tutti gli esemplari esaminati, anche se si riscontrano delle differenze dovute al diverso grado di infezione. I primi anticorpi sono svelabili dopo 20 giorni dalla somministrazione delle larve (titolo 1:40); verso i 60-100 giorni si raggiunge la

massima concentrazione (titolo 1:160; 1:320). Dal 170°-200° giorno il titolo anticorpale decresce. L'esemplare infettato con 2.000 larve al 385° giorno aveva un titolo di 1:20, al 512° giorno il siero é risultato negativo. Le larve presenti in tutti gli esemplari soppressi tra i 90 e i 196 giorni dall'infezione, sono risultate vitali alla prova biologica; per l'esemplare soppresso dopo 512 giorni la prova biologica é risultata negativa. Le larve presenti nelle salsicce e nel salame sono risultate infettanti fino al 15° giorno; al 20° sono risultate incapaci ad infettare il topo. Le larve presenti nel prosciutto dopo 4 mesi non hanno infettato il topo; anche per la mortadella, la prova biologica effettuata dopo la cottura, é risultata negativa.

I suini risultano suscettibili ai ceppi italiani di Trichinella. Le differenze riscontrate, specialmente tra i due esemplari infettati con 25.000 larve, nel numero e nella distribuzione dei parassiti nei muscoli, sono molto probabilmente legate sia al periodo trascorso tra l'infezione e l'abbattimento che é stato di 3 e 6,5 mesi rispettivamente, e quindi ad un notevole aumento di peso del secondo animale, sia, come già supposto per T.spiralis, ad una differente resistenza al parassita da parte dei due esemplari (3). L'esame sierologico mostra una buona risposta anticorpale da parte di tutti gli esemplari esaminati, risposta che dura circa un anno dall'ingestione delle larve. La concordanza tra vitalità delle larve e positività sierologica (per 7 esemplari su 7) così come tra larve calcificate e negatività sierologica (per 1 esemplare), sembra avvalorare l'importanza dell'FAT nella diagnosi della trichinellosi del suino. Sarà comunque necessario verificare questi risultati con un numero maggiore di esemplari. La morte delle larve nei prodotti crudi é molto probabilmente legata al progressivo essiccamento che porta ad un aumento della concentrazione salina, come già supposto da alcuni autori (6) per T.spiralis; questi autori riportano che ad una concentrazione salina del 3,3% alla preparazione, le larve sono rimaste infettanti fino al 25° giorno; nel nostro caso ad una concentrazione salina del 2,6% le larve sono risultate infettanti solo fino al 15° giorno e dal 20° sono risultate non infettanti. Solo le salsicce fresche e il salame fresco (ciauscolo) possono rappresentare un pericolo per il consumatore. Il mantenimento dei prodotti in locali secchi e ben aerati é quindi un ottimo mezzo di profilassi.

BIBLIOGRAFIA

1. MANTOVANI, A., FILIPPINI I. & BERGOMI, S. 1980. Indagini su un'epidemia di trichinellosi umana verificatasi in Italia. Parassitologia 22: 107-134.
2. CANESTRI TROTTI, G. & GRAMENZI, F. 1982. Trichinosi. Boll.Epid.Naz. 82/83:1-3
3. OLSEN, B.S., VILELLE, J.R. & GOULD, S.E. 1964. Distribution of Trichinella spiralis in Muscles of Experimentally Infected Swine. J.Parasit. 50: 489-495.
4. ZIMMERMANN, W.J. & SCHWARTE, L.H. 1961. Distribution of Trichinella spiralis Larvae in Tissues of Swine. Proc.Iowa Acad.Sci. 68: 553-557.
5. BRITOV, V.A. 1974. Intraspecific variations of Trichinella. Proc.3rd Intern. Congr.Parasit. München, 25-31 agosto, Section B-14(5).
6. ALLEN, R.W. & GOLDBERG A. 1962. The effect of various salt concentrations on encysted Trichinella spiralis larvae. Am.J.Vet.Res. 23: 580-586.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 465-468

INTERAZIONE IN VITRO TRA CELLULE IMMUNOCOMPETENTI E LARVE L2 DI TOXOCARA CANIS: ASPETTI IMMUNOLOGICI

S. Lombardi (a), F. Esposito (b), P. Orecchia (a) e L. Paggi (a)

(a) Istituto di Parassitologia, Università "La Sapienza", Roma
(b) Dipartimento di Biologia Cellulare, Università di Camerino

Riassunto. - E' stata studiata in vitro l'adesione di cellule immunocompetenti a larve L2 di Toxocara canis, stabilendo quale sia il ruolo rivestito da complemento e/o anticorpi in tale interazione.

Summary (In vitro interaction between immunocompetent cells and L2 larvae of Toxocara canis: immunological aspects). - The in vitro adhesion of immunocompetent cells to the surface of L2 larvae of the nematode Toxocara canis has been studied. The relative roles of antibodies and/or complement in such interaction has been evaluated.

Introduzione

Il fenomeno di aderenza da parte di cellule del sistema immunitario sulla superficie di diversi elminti é noto da tempo, tuttavia i parametri che influenzano tale interazione ed il suo significato sulla sopravvivenza del verme sono stati studiati solo di recente. L'aderenza di cellule immunocompetenti ad elminti in vitro é stata studiata intensamente in diversi modelli parassitologici: il trematode Schistosoma mansoni (1), le larve newborn del nematode Trichinella spiralis (2), le microfilarie dei nematodi Dipetalonema viteae e Litosomoides carinii (3), le larve infestanti del nematode Nippostrongylus brasiliensis (4).

In questo studio é stata valutata l'aderenza di macrofagi (MF) normali, MF attivati, polimorfonucleati (PMN) neutrofili e PMN eosinofili a larve L2 di Toxocara canis. Per ciascuna popolazione di cellule immunocompetenti é stata valutata l'influenza sul fenomeno di aderenza di parametri quali presenza o meno di complemento e/o anticorpi anti Toxocara.

Materiali e Metodi

Larve L2 di T. canis, ottenute secondo il metodo di de Savigny (5), sono state mantenute in coltura in RPMI 1640, addizionato di antibiotici ed antimicotici, a 37 C in un'atmosfera arricchita al 5% in CO_2. La vitalitá delle larve é risultata come minimo del 90% per almeno 10 settimane, senza alcuna apparente perdita di infettivitá.

Come fonte di siero immune, contenente cioé anticorpi anti-Toxocara, sono stati utilizzati topi Balb/c inoculati per tre volte

intraperitoneo (i.p.) con 500, 250 e 250 larve ai tempi 0, + 15 gg, + 21 gg rispettivamente. Quattro giorni dopo l'ultimo inoculo i topi sono stati sacrificati, é stato prelevato il sangue da cui si é ottenuto ilsiero. Parte del siero é stato quindi deprivato del complemento con un trattamento di 30' a 56 C. Come fonte di siero non immune sono stati utilizzati topi Balb/c non trattati. Come fonte di complemento é stato usato siero non immune non inattivato.

I MF normali sono stati ottenuti prelevando il liquido peritoneale (l.p.) di 5 topi Balb/c non trattati. Le cellule, messe in pool, sono state diluite in terreno RPMI in modo da dispensare nei pozzetti di una piastra microtiter circa 600.000 cellule/pozzetto. Dopo un'incubazione di 1 ora a 37 C le cellule aderenti sono state rimosse con 3 successivi lavaggi. Con questa procedura si ottenevano circa 250.000 cellule mononucleate (MF normali) aderenti al fondo del pozzetto.

I MF attivati sono stati ottenuti prelevando il l.p. di 5 topi Balb/c inoculati i.p. 5 giorni prima con 0.5 ml di brodo tioglicollato. La popolazione cellulare peritoneale risultava in tal modo arricchita all'80% di MF. Nei pozzetti venivano dispensate pertanto circa 300.000 cellule in modo da ottenere, dopo incubazione di 1 ora a 37 C e successivi lavaggi, 250.000 cellule (MF attivati) aderenti al fondo del pozzetto.

Popolazioni cellulari arricchite al 70-80% in PMN neutrofili sono state ottenute prelevando il l.p. di 5 topi Balb/c inoculati i.p. 24 ore prima con 0.5 ml di brodo tioglicollato.

Popolazioni cellulari arricchite in PMN eosinofili venivano ottenute prelevando il l.p. di 5 topi Balb/c inoculati 21, 15 e 7 giorni prima rispettivamente con 500, 250 e 250 larve L2 di T.canis La popolazione peritoneale risultante conteneva circa il 60% di PMN rappresentati interamente da eosinofili. PMN neutrofili ed eosinofili venivano dispensati nei pozzetti di una piastra microtiter alla diluizione di circa 250.000 cellule/pozzetto.

Nei pozzetti contenenti le varie popolazioni immunocompetenti venivano aggiunte circa 30 larve di T. canis. A seconda del parametro che si voleva valutare venivano aggiunti nei pozzetti siero immune, siero non immune, complemento; tutti questi componenti venivano dispensati nei pozzetti in modo da ottenere una diluizione finale di 1:4 per ciascuno di essi. Il fenomeno di aderenza delle cellule immunocompetenti (c.i.) alla larva veniva osservato al microscopio rovesciato ad intervalli di tempo regolari dall'inizio dell'incubazione che avveniva a 37 C in atmosfera umidificata ed arricchita al 5% in CO_2.

I risultati venivano espressi sulla base di una scala arbitraria in cui + significa almeno 10 c.i. adese a ciascuna larva, ++ significa almeno ½ della superficie della larva ricoperta da c.i., +++ significa quasi tutta la superficie larvale ricoperta da c.i., ++++ significa la completa copertura della superficie larvale da parte delle c.i.

Risultati

L'aderenza di MF normali ed attivati alla superficie della larva seguiva un andamento temporale simile. La massima aderenza si osservava con entrambe le popolazioni dopo 24 ore di incubazione. Tuttavia i parametri che influenzavano l'interazione c.i. - larva risultavano diversi nei due casi. Come si puó osservare in Tabella 1, l'aderenza di MF normali é complemento-dipendente, mentre non

sembra che gli anticorpi anti-Toxocara, la cui presenza nel siero era valutata con la tecnica di Esposito & al. (6), giuochino un ruolo rilevante. Nel caso dei MF attivati l'interazione c.i.-larva é mediata sia dal complemento che dal siero immune. Come si puó osservare sempre in Tab. 1, tali fattori sono in grado di promuovere il fenomeno di aderenza anche indipendentemente uno dall'altro.

Tabella 1.- Valutazione in vitro dell'aderenza di MF normali ed attivati alle larve L2 di T. canis dopo 24 ore di incubazione.

	Siero non immune privo di complemento	Siero non immune con complemento	Siero immune privo di complemento	Siero immune con complemento
MF normali	-	+++	-	++++
MF attivati	-	++++	++++	++++

L'aderenza alle larve da parte di PMN neutrofili ed eosinofili raggiungeva il suo picco di intensitá dopo 3 ore di incubazione. Anche in questo caso i parametri che influenzavano l'interazione risultavano diversi secondo il tipo di c.i. considerate. Come si vede in Tab. 2, i neutrofili aderivano alle larve solo in seguito all'azione combinata di siero immune e complemento. Gli eosinofili viceversa mostravano capacitá di adesione anche in assenza di tali fattori. La capacitá "spontanea" di adesione degli eosinofili, rinforzata dalla presenza di solo complemento o di solo siero immune raggiungeva il massimo grado di intensitá in presenza di entrambi i fattori simultaneamente.

Tabella 2.- Valutazione in vitro dell'aderenza di PMN neutrofili ed eosinofili a larve L2 di T. canis dopo 3 ore di incubazione.

	Siero non immune privo di complemento	Siero non immune con complemento	Siero immune privo di complemento	Siero immune con complemento
Neutrofili	-	-	-	+++
Eosinofili	+	+++	++	++++

Discussione

Popolazioni di cellule immunocompetenti interagiscono in vitro con larve L2 di T. canis aderendo tenacemente alla superficie larvale. Tale interazione é variamente mediata da fattori solubili quali complemento ed anticorpi anti-Toxocara. I MF normali richiedono per l'adesione il complemento, mentre i MF attivati possono aderire anche soltanto in presenza di anticorpi. I PMN neutrofili aderiscono alle larve soltanto se presenti contemporaneamente anticorpi anti-Toxocara e complemento, mentre gli eosinofili aderiscono

spontaneamente. La presenza di anticorpi e complemento rende tale adesione quantitativamente più importante.

Nonostante i fenomeni, talora imponenti, di aderenza qui descritti , le larve L2 di T. canis non presentano evidenti alterazioni della vitalità. Ulteriori studi sono in corso allo scopo di chiarire in che modo le larve riescano ad evadere questa prima manifestazione dei meccanismi di immunosorveglianza.

BIBLIOGRAFIA

1. BUTTERWORTH, A.E, TAYLOR, D.W., VEITH, M.C., VADAS, M.A., DESSEIN, A., STURROCK, R.F. & WELLS, E. 1982. Studies on the mechanisms of immunity in human schistosomiasis. Immunological Rewiews 61: 5-39.
2. KAZURA, J.W. & AIKAWA, M. 1980. Host defense mechanisms against Trichinella spiralis infection in the mouse: eosinophil-mediated destruction of newborn larvae in vitro. J. Immunol. 124: 355-361.
3. MACKENZIE, C.D., JUNGERY, M., TAYLOR, P.M. & OGILVIE, B.M. 1980. Activation of complement, the induction of antibodies to the surface of nematodes and the effect of these factors and cells on worm survival in vitro. Eur. J. Immunol. 10: 594-601.
4. BLUNDELL-HASSELL, S.K. 1974. Cellular immunity to Nippostrongylus brasiliensis in the rat. I. In vitro production of a migration inhibitory factor. Int. Arch. Allergy 47: 87-94.
5. SAVIGNY DE, D.H. 1975. In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara ES/antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J. Parasit. 61: 781-782.
6. ESPOSITO, F., LOMBARDI, S., BANCHIERI, L., ORECCHIA, P. & PAGGI, L. 1983. Hemoimmuno-adherence test (HIAT) for the detection of antibodies anti-Toxocara canis L2 larvae. Parassitologia 25: 57-66.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 469-472

LA LARVA L_2 DI TOXOCARA CANIS COME AGENTE IMMUNOMODULATORE

T. Lari (a), L. Banchieri (a), S. Lombardi (b) & F. Esposito (c)

(a) Ospedale di Pietrasanta, Regione Toscana, U.S.L. Versilia
(b) Istituto di Parassitologia, Universitá La Sapienza, Roma
(c) Dipartimento di Biologia Cellulare, Universitá di Camerino (MC)

Riassunto. - E' stata studiata la capacitá di larve L_2 di Toxocara canis di modulare la risposta anticorpale verso antigeni non correlati quali i globuli rossi di montone (SRBC). Basse dosi di larve provocano una immunostimolazione che dipende dall'intervallo fra l'inoculazione delle larve e quella di SRBC, mentre alte dosi di larve non alterano la risposta immunitaria.

Summary. - The ability of L_2 larvae of Toxocara canis to modulate the antibody response to unrelated antigens, as sheep red blood cells (SRBC) has been studied. Low doses of larvae produce an immunostimulation depending on the time interval between larvae injection and SRBC administration. High doses of larvae do not modify the immune response.

Introduzione

E' noto che gli antigeni microbici possono modulare la risposta immune verso antigeni non correlati e che la immunomodulazione puó esprimersi sia come immunosoppressione che come immunostimolazione (1, 2, 3). A questo riguardo le conoscenze piú ampie si riferiscono ad antigeni batterici come la proteina A dello stafilococco, il lipopolisaccaride dei gram negativi e gli antigeni dei micobatteri.

Per quanto concerne i modelli parassitologici énoto che l'infezione malarica provoca una attivazione policlonale (4, 5, 6), mentre nelle schistosomiasi si ha un'immunodepressione (7, 8).

E' stata valutata la capacitá delle larve L_2 di modulare la risposta immune verso SRBC nel topo Balb/c, utilizzando la tecnica di Jerne e Nordin (9) per la determinazione di cellule formanti placche di emolisi (PFC).

Materiali e Metodi

Sono stati utilizzati topi Balb/C, di entrambi i sessi e di etá compresa fra otto e dodici settimane, che sono stati assegnati casualmente ai diversi gruppi sperimentali.

Larve L_2 di T. canis, ottenute secondo il metodo di de Savigny (10), sono state mantenute in coltura in RPMI, addizionato di an-

tibiotici, a 37 C in atmosfera con il 5% di CO_2. La vitalitá delle larve é risultata del 90% per almeno otto settimane senza alcuna apparente perdita di infettivitá.

I vari gruppi di topi venivano infettati, mediante inoculazione endovenosa (i.v.), con due diverse dosi di larve (50 e 1000) sospese in 0,2 ml di soluzione fisiologica. I topi erano quindi immunizzati, per iniezione i.v., con 10^8 SRBC, prelavati due volte in soluzione di Alsever e sospesi in 0,2 ml di soluzione fisiologica. L'immunizzazione era effettuata quattro o otto giorni dopo l'infestazione con le larve L_2 di T. canis.

La risposta immunitaria primaria verso SRBC era valutata in topi di controllo immunizzati solo con una somministrazione endovenosa di 10^8 SRBC. Il numero di PFC anti-SRBC "spontanee" era valutato in topi che avevano ricevuto i.v. le larve ma non gli SRBC. Tale numero non ha mai superato le 400 PFC/milza.

Quattro giorni dopo l'immunizzazione con i globuli rossi i topi trattati ed i controlli venivano sacrificati per ottenere le milze. Gli splenociti erano sospesi in RPMI, lavati due volte ed infine sospesi in 5 ml dello stesso terreno. Dopo averne determinato la vitalitá, gli splenociti venivano piastrati in agar + SRBC + complemento per contare le cellule formanti anticorpi anti-SRBC utilizzando il saggio di Jerne e Nordin (9).

Risultati

I risultati ottenuti indicano che la risposta anticorpale verso gli SRBC dipende sia dalla dose di larve inoculate che dall'intervallo di tempo che intercorre fra l'inoculazione delle larve e quella degli SRBC. Come é illustrato nella tabella 1, dove sono riportati idati relativi ad un esperimento a titolo di esempio, gli animali inoculati con 50 larve quattro giorni prima della immunizzazione con SRBC presentano un significativo aumento delle PFC per milza (P 0,05). Gli animali inoculati con 50 larve otto giorni prima della somministrazione dell'antigene mostrano un aumrnto altamente significativo (P 0,01) del numero di placche di emolisi per milza.

Tabella 1. - Effetto di due diverse dosi di larve L_2 di T. canis inoculate 4 o 8 giorni prima dell'immunizzazione con SRBC sulla formazione di PFC anti-SRBC.

	N di larve	PFC/milza	P
4 Giorni	Nessuna	53600	
	50	97700	0,05
	1000	45900	non signif.
8 Giorni	Nessuna	53600	
	50	117500	0,01
	1000	55800	non signif.

La somministrazione di 1000 larve non influenza il numero di PFC per milza, sia che venga effettuata quattro o otto giorni prima della immunizzazione con SRBC.

Discussione

I risultati di questi esperimenti indicano che basse dosi di larve provocano una immunostimolazione e che l'effetto é tanto piú evidente quanto maggiore é il tempo di pretrattamento. Alte dosi di larve non influenzano il numero di PFC per milza.

La modulazione della risposta immune indotta da alcuni microrganismi o prodotti microbici é ben conosciuta. In particolare é stata sottolineata l'importanza che dose e via di somministrazione hanno nell'evocare effetti modulatori da parte di tali antigeni(11) Piú recentemente é stato riportato che dosi diverse di antigeni microbici inoculate a vari tempi prima dell'immunizzazione con SRBC causano alternativamente una stimolazione o una soppressione della risposta anticorpale nel topo (12). Tuttavia i meccanismi che stanno alla base di tali alterazioni della risposta, di segno alternativamente positivo o negativo, non sono ancora definiti nei dettagli. E' probabile che in questi processi vengano coinvolte sottopopolazioni diverse di cellule regolatrici (helpers e/o suppressors) e che tali sottopopolazioni vengano stimolate selettivamente da dosi diverse di antigeni microbici durante il processo di sensibilizzazione.

L'immunostimolazione prodotta dalla bassa dose di larve di T. canis potrebbe quindi essere il risultato della attivazione di particolari sottopopolazioni, mentre alte dosi di larve sarebbero in grado di stimolarne anche altre, bilanciando cosí la risposta anticorpale verso gli SRBC.

BIBLIOGRAFIA

1. KIND, P. & JOHNSON, A. G. 1958. Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. I. Time limitation of enhancing effect and restoration of antbody formation in x irradiated rabbits. J. Immunol. 82: 415-427.
2. FRANZL, R. E. &MCMASTER, P. D. 1968. The primary immune response in mice. I. The enhancement and suppression of hemolisin production by a bacterial endotoxin. J. Exp. Med. 127:1087-1107
3. SCHWAB, J. H. 1975. Suppression of the immune response by microorganisms. Bacteriol. Rev. 39: 121-143.
4. COHEN, S., MCGREGOR, I. A. & CARRINGTON, S. C. 1961. Gammaglobulin and acquired immunity to human malaria. Nature.192:733
5. WHYLER, D. J. & OPPENHEIM, J. J. 1974. Lymphocite transformation in human Plasmodium falciparum malaria. J. Immunol. 113: 449.
6. GREENWOOD, B. M. & VICK, R. M. 1975. Evidence for a malaria mitogen in human malaria. Nature. 257: 592.
7. PELLEY, R. P., RUFFIER, J. J. & WARREN, K.S. 1976. Suppressive effect of a chronic helmintic infection, schistosomiasis mansoni, on the in vitro responses of spleen and lymphonode cells to the T cells mitogens phitohaemoagglutinin and concanavalin A Infect. Immun. 13: 1176
8. OTTENSEN, E. A. 1979. Modulation of the host response in human schistosomiasis. I. Adherent suppressor cells that inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. J. Immunol. 123: 1639.
9. JERNE, N. K. & NORDIN, A. A. 1963. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. Science 140: 405.

10. SAVIGNY DE, D. H. 1975. In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara ES/ antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans J. Parasit. 61: 781-782.
11. BEHLING, U. H., and NOWOTNY, A. 1977. Immune adjuvancy of lipopolysaccharide and a non toxic hydrolytic product demonstrating oscillating effects with time. J. Immunol. 118: 1905-1907.
12. GARZELLI, C., COLIZZI, V., CAMPA, M., BOZZI, L. & FALCONE, G. 1979. Depression of the antibody response in Pseudomonas aeruginosa-infected mice. Infect. Immun.24: 32-38.