TAVOLA ROTONDA

PROBLEMI DI PARASSITOLOGIA IN PARCHI E RISERVE NATURALI

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 93-94

OSSERVAZIONI PARASSITOLOGICHE ED EPIDEMIOLOGICHE SU MACRO E MICROMAMMIFERI DI PARCHI NATURALI O DI ZONE DI PROTEZIONE

T. Balbo (a) & R. Costantini (b)

(a) Cattedra di Malattie Parassitarie, Dipartimento di Patologia Animale (Fac. Med. Vet.), Università di Torino, Torino
(b) Istituto di Parassitologia (Fac. Med. e Chir.), Università "La Sapienza" di Roma, Roma

Riassunto. - Vengono riassunte le osservazioni parassitologiche ed epidemiologiche effettuate nel corso di circa vent'anni dall'Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma e dal settore Malattie Parassitarie del Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Torino sui mammiferi che vivono nell'ambito di parchi naturali o di zone di protezione italiani.

Allo scopo di adeguare tale sintesi allo spirito di questa Tavola Rotonda, i risultati scaturiti da queste osservazioni vengono raggruppati nei seguenti tre capitoli:
1) definizione della diffusione dei parassiti nei mammiferi selvatici dei parchi naturali alpini e subalpini;
2) inquadramento epidemiologico di alcune forme morbose diffusive verificatesi in popolazioni di erbivori selvatici e prove per il primo controllo;
3) definizione delle interrelazioni esistenti tra parassitosi degli animali selvatici e parassitosi degli animali domestici coabitanti nei parchi naturali.

Nel primo capitolo vengono riassunti i risultati di indagini di base. Ad esempio, vengono ricordati i dati scaturiti dallo studio: della diffusione degli elminti parassiti dell'apparato digerente e dell'apparato respiratorio degli stambecchi, dei camosci e dei cervi che vivono in parchi alpini e subalpini italiani; della presenza di sarcosporidi negli stambecchi del Parco Nazionale Gran Paradiso e del loro ciclo evolutivo attraverso i canidi; della diffusione degli ecto ed endoparassiti nella volpe e del comportamento di questa specie animale di fronte agli interventi sul territorio da parte dell'uomo necessari per la vaccinazione antirabbica per via orale; della presenza di alcuni ecto ed endoparassiti in micromammiferi dell'arco alpino; ecc. Tra i parassiti individuati nel corso di queste indagini, esistono specie e sottospecie nuove e specie che non erano state precedentemente segnalate nel nostro Paese o non erano mai state reperite nelle specie ospiti sulle quali sono state trovate da noi. A conclusione del capitolo, pertanto, gli AA. sottolineano la grande importanza che assumono i parchi naturali sia come fonte di materiale scientifico spesso originale, sia come palestra di formazione per i ricercatori.

Nel secondo capitolo vengono illustrate alcune esperienze maturate intorno agli aspetti epidemiologici di forme morbose diffusive verificatesi in popolazioni di erbivori selvatici viventi in parchi naturali o in zone di protezione. Per la loro esemplarità vengono riportati i dettagli dell'evoluzione di un'epi-

zoozia di distomatosi insorta tra i cervi del Parco Regionale La Mandria, della cheratocongiuntivite che ha colpito i camosci dell'arco alpino occidentale e della mixomatosi del coniglio selvatico verificatasi ancora nel Parco Regionale La Mandria . Le esperienze qui maturate consentono agli AA di mettere in evidenza come, il sovraffollamento delle popolazioni animali negli ambienti considerati presentasse strette correlazioni con la morbilità e la mortalità registrate. Pertanto, queste esperienze consentono di affermare che l'istituzione di un parco comporta, soprattutto di fronte a specie animali dotate di un elevato potere riproduttivo, delle problematiche sanitarie che devono essere di volta in volta prese in debita considerazione.

Infine, nel terzo capitolo vengono riportati i risultati di alcune indagini volte a dimostrare come i ruminanti domestici ed i ruminanti selvatici possano giocare il ruolo di reciproci trasmettitori di parassiti, e, quindi, si conclude affermando che la gestione sanitaria sia degli animali selvatici sia degli animali domestici che condividono gli stessi habitat costituisce un'inderogabile necessità ai fini della salvaguardia del patrimonio faunistico dei parchi naturali e del patrimonio zootecnico che ancora vive nell'ambito di queste entità territoriali o nei loro dintorni.

Il testo in extenso della relazione verrà pubblicato sugli Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, vol. XX.

Summary (Parasitological and epidemiological observations on wildlife in natural parks or in protected areas) - The parasitological and epidemiological studies on wildlife from natural parks and protected areas carried out by the Institut of Parasitology of the Rome University and the parasitic diseases section at the Animal Pathology Department of the Torino University are summarized.

The results of these studies can be grouped in three parts:

1) the settlement of the parasites diffusion in wildlife in natural parks;
2) epidemiological data on the spreading of parasitic and infectious diseases among wildlife;
3) the comparison of the parasites diffusion in wild and domestic ruminants sharing the same habitat.

In the first part, the results of base studies are summarized. For example, the AA.s describe the parasites of the steinbock, chamois and red deer gastrointestinal and respiratory systems, the presence of sarcosporidians in steinbock and their life-cicle in Canidae, the behaviour of the fox towards the vaccination against rabies by oral route, the diffusion of many species of fleas on small mammals captured in the italian Alps, etc. Among these parasites, there have been found some new species; other species never seen before in Italy or never found on these hosts, were also identified.

The second part summarizes some epidemiological observations on fascioloidosis in red deer, infectious keratoconjunctivitis in chamois and myxomatosis in wild rabbit. These three outbreaks of disease had a common factor in the high population density in comparison with the carrying capacity of the habitat.

Finally, the third part illustrates how wild and domestic ruminants sharing the same areas can play the role of parasites carrier for each other.

The communication in extenso will appear on the Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino, vol. XX.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 95-102

INTERAZIONE FRA RUMINANTI DOMESTICI E SELVATICI NELLA EPIDEMIOLOGIA DELLE ELMINTIASI

C. Genchi (a), A. Bossi (b) & W. Frigo (c)

(a) Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Cattedra di Parassitologia, Università degli Studi, Milano;
(b) Istituto di Statistica Medica e Biomedica, Università degli Studi, Milano;
(c) Parco Nazionale dello Stelvio, Bormio;

Summary. - Some epidemiological aspects of helminthiasis in wild and domesticated ruminants are discussed. The empirical model of negative binomial distribution of aggregated patterns of parasite number per host and the significance of parameter K are critically reviewed with regard to the role of host (wild or domesticated ruminant) in the diffusion of the worms.

L'epidemiologia delle infestazioni da namatodi parassiti dell'apparato digerente e respiratorio dei ruminanti è condizionata, oltre che dall'habitat esterno, dalle caratteistiche delle due popolazioni interagenti: quella degli ospiti e quella dei parassiti.

Gli indici generalmente impiegati nello studio della malattia sono:

- l'incidenza, che indica il rapporto tra il numero di nuovi casi di infestazione che si manifestano in una popolazione in un dato periodo di tempo e l'intera popolazione esposta, nel medesimo periodo al rischio di infestazione;
- la prevalenza, (p.) che esprime il rapporto tra il numero di soggetti infestati in un istante definito, e l'intera popolazione presente in quell'istante (1,2).

Nelle manifestazioni elmintiche un altro indice fondamentale è

- il numero di parassiti presenti nell'ospite, che può essere definito come grado di infestazione (g.i.).

E' noto d'altronde che la distribuzione del numero di parassiti nella popolazione ospite, varia in relazione alla differente recettività dei soggetti. Anderson (3) formula tre ipotesi di distribuzione caratterizzate da:

- sottodispersione, tutti gli ospiti albergano un numero molto simile di parassiti: varianza <media.
- dispersione casuale dei parassiti negli ospiti: varianza=media.
- sovradispersione o aggregazione: esprime una situazione di eterogeneità: varianza >media.

Il grado di aggregazione dei parassiti negli ospiti è condizionato dalle caratteristiche del ciclo biologico del parassita e dalla resistenza che l'ospite oppone alla invasione parassitaria. In condizioni naturali, dove la popolazione ospite si presenta eterogenea (età, sesso, efficacia della risposta immunitaria), la distribuzione dei metazoi parassiti quali i nematodi gastrointestinali e respiratori dei ruminanti risponde a criteri di sovradispersione (aggregazione), con la maggior parte dei parassiti concentrati in un numero contenuto di ospiti (4-6). Tale situazione è conseguente oltre che alle caratteristiche della popolazione ospite sopraricordate, alla riproduzione del

parassita che si svolge all'interno dell'ospite e alla distribuzione eterogenea degli stadi infestanti dell'ambiente esterno.

La sottodispersione del numero dei parassiti nella popolazione ospite è dipendente dal tasso di mortalità parassitaria, dai fenomeni immunitari e dalla densità della popolazione ospite. In questo caso l'insorgenza di fenomeni patologici è direttamente associata al grado di infestazione.

La definizione della aggregazione rappresenta dunque un aspetto importante della epidemiologia delle infestazioni elmintiche, tenuto conto che essa influisce in modo determinante sull'equilibrio ospite-parassita (7) e che i tre indici: prevalenza, grado di infestazione e grado di aggregazione, sono correlati in modo complesso (4,8).

I tre modelli di distribuzione del numero di parassiti nella popolazione ospite possono essere rappresentati da tre differenti tipi di distribuzioni di probabilità (3):

- Binomiale: situazione di sottodispersione

$$Pr\ (X = x) = \binom{n}{x} P^x\ Q^{n-x} \qquad (a)$$

dove: x = numero di successi
n = numero di prove
P = probabilità di successo
P + Q = 1

- Poissoniana: situazione di distribuzione casuale

$$Pr\ (X = x) = \frac{e^{-\lambda}\ \lambda^x}{x!} \qquad (b)$$

dove: x = numero di successi
λ = media aritmetica

- Bionomiale negativa: situazione di aggregazione o sovradispersione

$$Pr\ (X = h) = \binom{k+h-1}{k-1} (P/Q)^h\ (1-P/Q)^k \qquad (c)$$

dove: k = numero di successi
h = numero di insuccessi prima di ottenere i K successi
P = probabilità di insuccesso/probabilità di successo
Q-P = 1

La distribuzione binomiale negativa rappresenta un efficace modello teorico per descrivere la distribuzione dei parassiti per ospite. (Fig.1) Il parametro K è inversamente proporzionale al grado di aggregazione del parassita nella popolazione ospite.

Secondo Southwood (9):

$k \leq 8$	distribuzione casuale
k molto inferiore a 8	aggregazione

Secondo Anderson (3) $K \leq 0,1$ esprime un elevato grado di aggregazione.

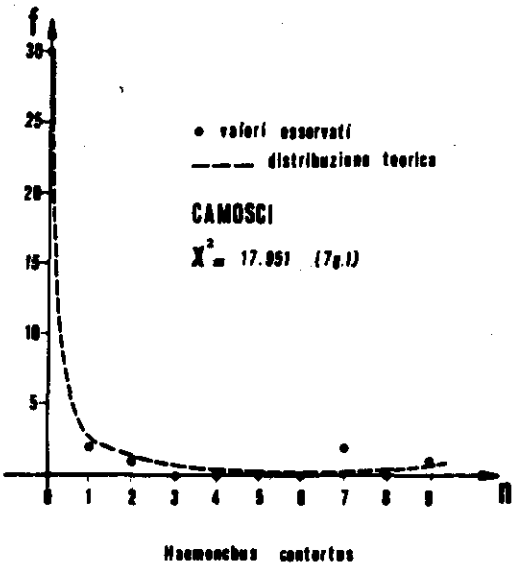


Fig.1. - Distribuzione del numero di esemplari di Haemonchus contortus in Rupicapra rupicapra

Il parametro k può essere stimato con diversi metodi. Southwood in indagini epidemiologiche utilizza la formula suggerita da Katti e Gurland (10).

$$k = \bar{x}^2/(s^2 - x) \qquad \bar{x} \text{ media} \qquad (d)$$

$$s^2 \text{ varianza}$$

Anscombe (11) fornisce anche la formula approssimata per il calcolo della varianza di k.

$$\text{var}(\hat{k}) = 2\hat{k}(\hat{k} + 1)(Q/P)N^{-1} \qquad (e)$$

dove $P = \bar{x}/k$

$Q = 1 - P$

da cui si ricava $K = \bar{x}/P$

e poiché

$$\hat{P} = (S^2/\bar{x}) - 1 \qquad (f)$$

si ottiene la (d)

Si può notare che $\hat{P}$ è negativo quando $s^2 < \bar{x}$; in questo caso infatti la distribuzione binomiale negativa non rappresenta il modello idoneo per la descrizione dei dati.

La relazione tra prevalenza e numero medio di parassiti atteso secondo la distribuzione binomiale negativa è dato da

$$\hat{p} = 1 - (1+\bar{x}/k)^{-k} \qquad (g)$$

Questa equazione permette il calcolo della prevalenza attesa per l'intera popolazione, partendo da un campione che soddisfi ai postulati di omogeneità; cioè soggetti della stessa specie che occupano un punto definito dello spazio e del tempo e che sia ben rappresentato dalla distribuzione ipotizzata.

Queste premesse rivestono particolare interesse per la verifica di alcune

ipotesi formulate nel corso di questi ultimi anni sulla epidemiologia delle infestazioni da nematodi gastrointestinali in habitat frequentati da ruminanti selvatici e da ruminanti domestici, quali i pascoli d'alta montagna, parchi e riserve naturali.

L'aumento del numero di ospiti potenziali e la possibile diffusione di specie parassitarie a ospiti recettivi anche se non usuali, potrebbe comportare gravi turbamenti dell'equilibrio ospite parassita, con evidente aggravamento del danno parassitario subito dalla fauna dei ruminanti domestici e selvatici.

Fin dall'indagine di Bouvier e Horning (12) sulla elmintofauna parassitaria dei ruminanti selvatici, fu osservata la presenza di specie di nematodi considerate caratteristiche dei ruminanti domestici. Tali riscontri sono stati confermati in successive indagini comparative, in differenti biotopi (13-20, 5--6, 21-23).

I riscontri sopra ricordati pongono alcuni requisiti di ordine epidemiologico:

- quale specie ospite è responsabile della diffusione del parassita nell'habitat;
- in quale specie ospite il rapporto ospite-parassita risulta maggiormente compromesso, condizione che esita in un netto aggravamento del danno parassitario;
- come il parassita perpetua la sua presenza nell'habitat. Se consideriamo che il destino del parassita dipende dal mantenimento dello stato di equilibrio con il suo ospite e che tale rapporto è tanto più stabile quanto più elevata risulta l'aggregazione (3), è ragionevole supporre che il parassita perpetui la sua presenza in natura soprattutto tramite gli ospiti e le eventuali varianti morfologiche che gli assicurano un aumento dell'aggregazione.

Sulla base delle premesse fatte, abbiamo esaminato alcune popolazioni di ruminanti selvatici (Camoscio, Rupicapra rupicapra; Capreulus capreulus; Daino, Dama dama); differenziate soprattutto in relazione ai possibili contatti con i ruminanti domestici (Capra, Capra hircus, Pecora, Ovis aries).

I risultati ottenuti indicano:

1) netta prevalenza dei ruminanti domestici nella diffusione delle infestazioni sostenute da nematodi gastro intestinali e bronco polmonari;
2) una aggregazione della popolazione parassitaria in generale più accentuata nei ruminanti domestici che nei selvatici, quando gli ospiti frequentano il medesimo habitat (19,5,6).

La presenza di ruminanti domestici sembra dunque un fattore destabilizzante l'equilibrio ospite-parassita nei ruminanti selvatici. Conferma di questo è fornita dai risultati ottenuti in popolazioni di camosci che vivono in ambienti dove la presenza dei ruminanti domestici è molto scarsa o nulla (Val Zebrù, Parco Nazionale dello Stelvio). In questi animali si osserva un sensibile aumento dell'indice di sovraddispersione (aggregazione), a riprova di un equilibrio favorevole del rapporto tra l'ospite e il parassita (Fig.2).

Il modello teorico della distribuzione binomiale negativa risulta sovente non appropriato a descrivere la distribuzione del numero di parassiti per ospite nella popolazione di ruminanti domestici (pecora e capra): infatti le differenze tra frequenze osservate e frequenze attese sono risultate significative per numerose specie di parassiti. Questo fenomeno è a nostro avviso da attribuire alle tecniche di allevamento e all'impiego anche saltuario di antielmintici, che possono modificare la distribuzione dei parassiti nella popolazione ospite.

Quando i valori di k sono molto elevati, la distribuzione dei parassiti negli ospiti si avvicina ad una situazione di distribuzione casuale e il rapporto di equilibrio tra ospite e parassita è compromesso. La densità della popolazione sembra un fattore determinante, tenuto conto che in popolazioni di daini (Dama dama) in cui la densità è molto alta (38,5 soggetti/ha), il valore dell'indice k è di 98,9. L'elevato indice di mobilità e mortalità osservato in questi animali, sarebbe conseguente alla rottura dell'equilibrio tra ospite e parassita.

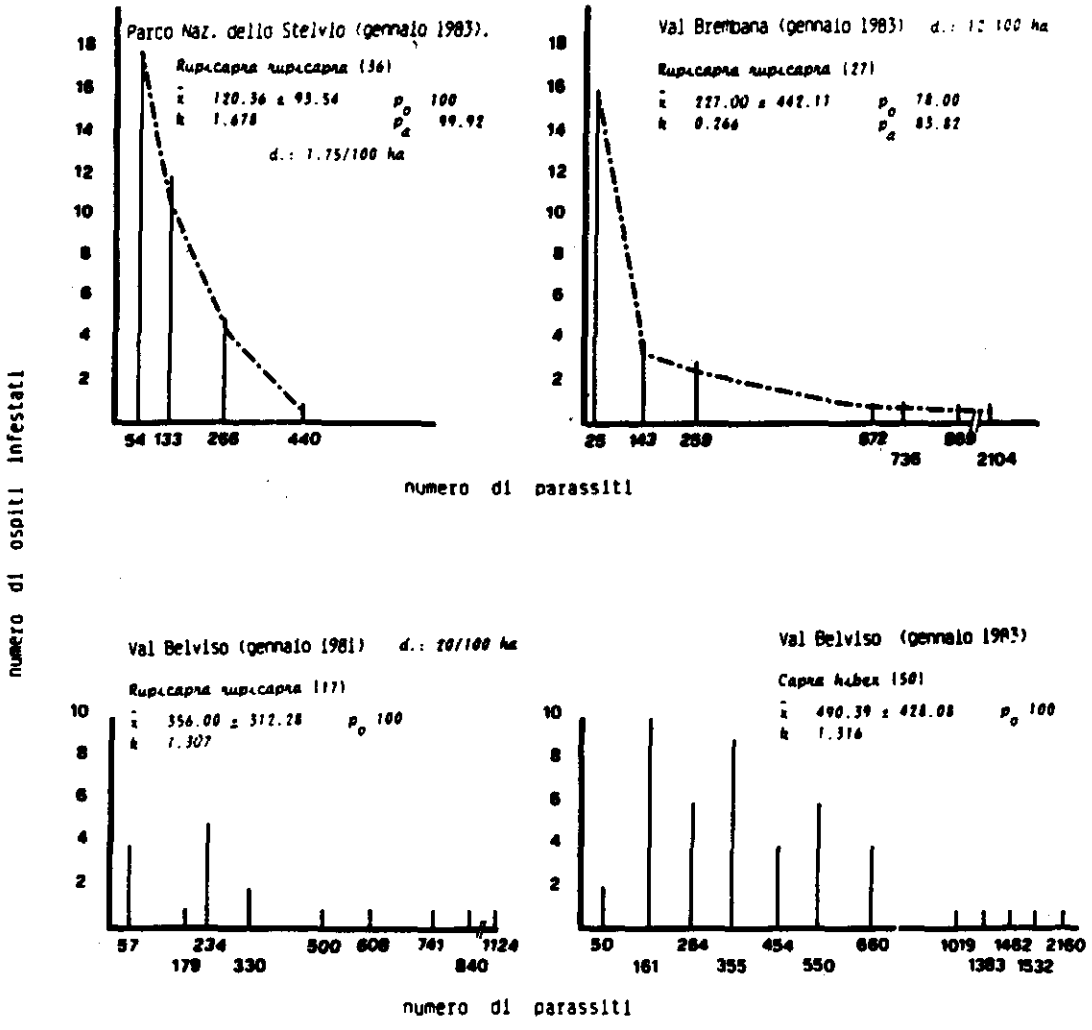


Fig. 2. - Distribuzione del numero totale di parassiti gastrointestinali in popolazioni di ruminanti (domestici e selvatici), in diverse zone dell'Arco Alpino, nell'ipotesi della distribuzione binomiale negativa. Nel caso dei camosci della Val Belviso, la cui densità è molto elevata, e delle capre, il modello non risulta idoneo. Le linee linee verticali rappresentano i valori osservati.

Lo studio del parametro k rappresenta dunque un *importante* elemento nella epidemiologia dei nematodi dei ruminanti, tenuto anche conto che il diverso grado di aggregazione tra popolazione ospite e parassita è uno degli elementi che condizionano la *perennità* del *parassita*.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMITAGE, P. 1975. Statistica Medica. Feltrinelli, Milano.
2. LILIENFELD, A.M. & LILIENFELD, D.E. 1980. Foundations of epidemiology, Oxford University Press. New York.
3. ANDERSON, R.M. 1982. In Modern Parasitology F.E.G. Cox (Ed.). Blacknell Scientific Publications, Oxford.
4. CABARET, J. & MORALES, G. 1983. Strategie comparée des infestations naturelles par Teladorsagia circumcincta et Teladorsagia trifurcata chez les ovins. Parassitologia (in corso di stampa).

5. GENCHI, C., MANFREDI, M.T. & BOSSI, A. 1984. Les infestations par les strongles digestifs sur les pâturages de haute montagne: interaction entre la chèvre et le chamois. Colloq. INRA 28: 501-505.
6. GENCHI, C., MANFREDI, M.T. & SIOLI, C. 1984. Les infestations naturelles des chèvres par les strongles pulmonaires en milieu alpin. Colloq. INRA 28: 347-352.
7. ANDERSON, R.M. 1978. The regulation of host population fronth by parasitic species. Parasitology 76: 119-157.
8. CABARET, J. 1982. L'appréciation de l'infestation des mollusques par les Protostrongylidés: des paramètres utilisés et de leurs interrelation. Am. Parasitol. Hum. Comp. 57: 367-374.
9. SOUTHWOOD, T.R.E. 1978. Ecological methods. Chapman e Hall, London.
10. KATTI, S.K. & GURLAND, J. 1962. Efficiency of certain methods of estimation of the negative binomial aut the Neymantype A distribution. Biometrika 49: 215-226.
11. ANSCOMBE, F.J. 1950. Sampling theory of the negative binomial and logarithmic series distribution. Biometrika 37: 358-382.
12. BOUVIER, G. & HORINING, B. 1963. Parasitologische Untersuchungen am Steinwild der Schweiz, unter besonderer Berücksichtingury der Kolonien am Mont Pleureur und an Piz. Albris. Rév. Suisse Zool. 70: 611-676.
13. BALBO, T. 1973. Indagini sulla situazione parassitologica nei mammiferi del Parco Nazionale del Gran Paradiso. Parassitologia 15: 301-312.
14. BALBO, T., COSTANTINI, R., LANFRANCHI, P. & GALLO, M.G. 1978. Rapporto comparativo della diffusione dei nematodi gastro-intestinali nei ruminanti domestici (Ovis aries e Capra hircus) e nei ruminanti selvatici (Capra ibex e Rupicapra rupicapra) delle Alpi occidentali Parassitologia 20: 131-137.
15. BALBO, T., COSTANTINI, R. & PERACINO, V. 1973. Indagine sulla diffusione di menatodi gastro-intestinali nello stambecco (Capra ibex) e nel camoscio (Rupicapra rupicapra) nel Parco Nazionale del Gran Paradiso. Parassitologia 15: 273-280.
16. BALBO, T., COSTANTINI, R. & PERACINO, V. 1975. Indagine sulla diffusione di nematodi preliminari nello stambecco. Parassitologia 17: 65-68.
17. BARTH, D. & MATZKE, P. 1984. Gastro-intestinal nematodes of fallow deer (Dama dama b) in Germany. Vet. Parasitol. 16: 173-176.
18. BISSET, S.A., KLEINJAN, E.D. & VLASSOFF, A. 1984. Development of Ostertagia leptospicularis in cattle, and the differentiation of prefective larvae and female adults from those of Ostertagia ostertagi. Vet. Parasitol. 16: 17-22.
19. GENCHI, C., BOSSI, A., MANFREDI, M.T. & TRALDI, G. 1985. (in corso di stampa).
20. GENCHI, C., MANFREDI, M.T., RONCAGLIA, R., SIOLI, C. & TRALDI, G. 1982. Contributo alla conoscenza degli elminti gastrointestinali dei ruminanti selvatici: osservazioni sul camoscio (Rupicapra rupicapra L.) nella riserva della Val Belviso. Parassitologia (in corso di stampa).
21. GENCHI, C., MANFREDI, M.T., TOSI, G. & FRIGO, W. 1983. Composizione della popolazione di nematodi gastro-intestinali del camoscio (Rupicapra rupicapra L.) in relazione alle variazioni di ambiente in alcune zone dell'arco alpino centrale. Parassitologia (in corso di stampa).
22. GENCHI, C., TRALDI, G. & RONCAGLIA, R. 1981. Contributo alla conoscenza dei nematodi gastro-intestinali nei ruminanti selvatici: osservazioni sul camoscio (Rupicapra rupicapra) nella riserva della Val Belviso. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 37: 675-676.
23. LANCASTER, M.B. & HONG, C. 1971. The nematode fauna of the chillingham Wild White Cattle. Br. Bet. J. 127: 113-117.
24. DROZTZ, J. 1965. Studies on helminthiases in Ceridae. I. Revision of the subfamily Ostertaginae Sarwar, 1956 and an attempt to explain the phylogebesis of its representatives. Acta Parasitol. Pol. 13: 445-481.

25. DROZTZ, J. 1966. Studies on helminthes and helminthiases in Cervidae. II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. Acta Parasitol. Pol. 14: 1-13.
26. DROZTZ, J. 1967. Studies on helminthes and helminthiases in Cervidae. III. Historicae formation on helminthofauna in Cervidae. Acta Parasitol. Pol. 15: 287-300.
27. DURETTE-DESSET, M.C. 1982. Sur les division génériques des nématodes ostertaginae. Am. Parasitologie 57: 375-381.
28. LANCASTER, M.B., HONG, C. & MICHEL, J.F. 1983. Polymorphism in the Trichostrongylidae in Concepts in nematode by sistematics. A.R. Stone, H.M. Platt & L.F. Khalil (Eds). Academic Press, London, New York.

Il lavoro è stato eseguito con il parziale contributo del M.P.I. (quota 60%).

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 103-110

PROBLEMI DA RODITORI IN AREE SOGGETTE A VINCOLI PROTEZIONISTICI

L. Santini

Istituto di Entomologia agraria dell'Università, Pisa

Riassunto. - Vengono descritti i segni che compaiono sulle piante del bosco, dei parchi e dei viali cittadini, nonché su alcune colture agrarie allorché, nell'ambito di aree soggette a vincoli protezionistici, alcune specie di roditori divengono tanto numerose da costituire una seria minaccia per la salute dei frequentatori. E' considerato il Parco Nazionale di Tombolo-San Rossore-Migliarino-Massaciuccoli (Pisa) nella cui parte forestale sono comparse di recente numerose decorticazioni di Sciurus vulgaris su Quercus ilex, di Glis glis su Populus alba e Alnus glutinosa, di Rattus rattus su Evonymus sp. Nella parte coltivata dello stesso Parco si ripetono, invece, di anno in anno, forti attacchi di Rattus norvegicus alle colture di mais e di girasole. E' infine considerata la possibilità, ove ciò fosse necessario, di impiegare esche tossiche per la lotta contro il Rattus norvegicus e sono date, a tal proposito, precise indicazioni circa l'impiego di esse entro limiti di sufficiente sicurezza per gli altri animali e per l'ambiente.

Summary (Rodents problems in areas subject to protectionist bonds). - Marks appearing on wood's plants, town parks and avenues as well as on a few field cultivations, when some rodents species become, (in those areas subject to protectionist bonds), so numerous to be a serious threat to the health of visitors are described. The Natural Park of Tombolo-San Rossore-Migliarino-Massaciuccoli (Pisa) is herewith considered, in whose forest side have recently appeared several barkings by Sciurus vulgaris on Quercus ilex, by Glis glis on Populus alba and Alnus glutinosa, by Rattus rattus on Evonymus sp. In the cultivated area of the Park itself, year by year are instead repeatedly made strong attacks to the maize and sunflowers cultivations by Rattus norvegicus. The possibility, where necessary, to employ toxic baits for Rattus norvegicus control has been lastly taken into consideration, and, to this purpose, exact indications are given about their use within the limits of sufficient safety for the other animals and the environment.

Introduzione

Quanto mi accingo a riferire deve essere considerato un contributo per la identificazione e la risoluzione tempestiva di problematiche che, per un insieme di motivi diversi, possono insorgere in aree protette, manifestarsi prima a carico della componente vegetale della biocenosi e riflettersi poi, spesso in modo non altrettanto conclamato, anche sullo stato di salute delle persone che in queste aree vivono abitualmente o vi si recano per motivi di lavoro, di studio o di semplice svago. Intendo infatti richiamare l'attenzione sul modo con cui su certe piante del bosco e su alcune di quelle agrarie talvolta compaiono segni inequivocabili della presenza di un numero eccessivo di Roditori, di animali, cioè, che, come è noto, debbono in ogni caso riguardarsi come

potenziali riserve e vettori di diverse malattie patogene anche per l'uomo. Quindi intendo esprimermi su quelle che, a mio avviso, sono le effettive possibilità di compiere, anche in tali ambienti, degli interventi rodenticidi che siano al tempo stesso efficaci e sicuri per le specie non bersaglio.

Poiché ho avuto l'opportunità di lavorarvi a lungo, tanto da conoscerne gli aspetti più reconditi, cito esplicitamente, a mò di esempio, il caso del Parco Naturale di Tombolo-San Rossore-Migliarino-Massaciuccoli, isituito nel 1979 a tutela delle caratteristiche naturali, anbientali e storiche, nonché dell'uso sociale del litorale pisano-lucchese. Esso si estende su una superficie pianeggiante di circa 21.000 ettari, comprendenti tra l'altro il bacino del lago di Massaciuccoli, le vaste aree agricole ad esso circostanti e quelle interposte tra la città di Pisa e la costa tirrenica, le ampie zone boscate a conifere e a latifoglie della Macchia Lucchese, della Macchia di Migliarino, della Tenuta di San Rossore e del Tombolo Pisano-Livornese (2).

Si tratta pertanto di un tipico Parco Naturale "ad uso multiplo" ove, accanto agli aspetti naturalistici-convenzionalisti ed estetico-turistici, deve essere tutelato anche l'aspetto produttivistico che, nel caso, si configura in un'intensa attività agricola.

Nell'ambito di tale composito contesto ambientale è accaduto che la concomitanza del favore di fattori diversi (vedi l'età avanzata della maggior parte del bosco, l'abbondanza di certe sue produzioni stagionali, le barriere naturali che isolano certe sue aree forestali, la persistenza di alcune discariche di rifiuti solidi urbani in stretta adiacenza della zona lacustre e di vaste superfici coltivate estensivamente a cereali ed oleaginose) insieme all'improvvisa, drastica interdizione (con il sopravvento dell'istituzione del Parco) di tutti i tradizionali (seppur discutibili) mezzi di lotta che, all'occasione, venivano in precedenza messi in atto contro le specie definite, a torto o a ragione, "nocive", ha comportato in anni recenti un progressivo preoccupante pullulare di alcune specie di roditori (10,11). Più precisamente sono divenuti numerosi lo Scoiattolo rosso (Sciurus vulgaris), il Ghiro (Glis glis) e il Ratto alessandrino (Rattus rattus), nell'ambito interno e sulle fasce marginali dell'area forestale; il Ratto grigio (Rattus norvegicus), nei limiti della vasta area coltivata, posta a stretto ridosso del bacino lacustre del Massaciuccoli.

Faccio inoltre appena osservare - senza minimamente entrare nel merito, in quanto assolutamente materia non di mia competenza - che parallelamente al vistoso incremento di questi animali e di alcuni grossi ungulati, (quali Daino e Cinghiale) - ormai da alcuni anni, entro questo Parco, nel periodo autunnale, si lamenta una massiccia recrudescenza di trombicule (localmente indicate con il termine di "selvaggiume") che attaccano in modo massiccio la maggior parte delle persone che frequentano il bosco e le aree ad esso strettamente adiacenti.

Lo Scoiattolo, il Ghiro e il Ratto alessandrino nel bosco.

Per quanto riguarda l'area forestale, la presenza di un numero veramente eccezionele di Scoiattoli e di Ghiri sta creando una serie di inconvenienti, alcuni dei quali di scarso rilievo, altri, invece, piuttosto evidenti e con conseguenze negative per le specie arboree che li subiscono.

I problemi maggiori oggi sono quelli dovuti alla decorticazioni che l'una e l'altra specie, in momenti diversi dell'anno, producono sulla parte superiore del fusto di alcune latifoglie. Quelle dovute allo Scoiattolo appaiono distribuite nel complesso forestale San Rossore-Migliarino ed interessano la parte distale del fusto e delle branche di giovani piante di Leccio (Quercus ilex). Esse si manifestano di regola tra febbraio e maggio, in concomitanza dell'avanzata fase riproduttiva della specie. Questo roditore distacca, uno dopo l'altro, lembi paralleli di corteccia, larghi circa un centimetro, dal basso verso l'alto, fino a mettere a nudo il floema. Ne risultano più spesso (Fig.1) delle

lacerazioni subrettangolari, allungate, di varia ampiezza, quasi sempre risolventisi in cercinature anulari che provocano il rapido disseccamento di ampie porzioni della chioma. Il roditore, tuttavia, opera in tal modo non per divorare la corteccia stessa, ma per lambire avidamente la linfa elaborata che sgorga dalla lacerazione, in modo assai simile a quanto descritto dal Sampò (9) per Eliomys quercinus su Larice. In letteratura si trovano diverse citazioni relative a decorticazioni prodotte dallo Scoiattolo rosso del nostro paese (cfr. 1,3,5,8,13). In tali casi, tuttavia, ci si riferisce quasi sempre ad attacchi portati ad essenze resinose, quali Larice, Pino silvestre, Pino laricio, Abete rosso, Abete bianco. Di latifoglie sono ricordate il Faggio, il Carpino bianco, il Pioppo tremulo, la Betulla, la Quercia, il Salice, l'Acero.

In zone molto più ristrette dello stesso comprensorio, proprio quelle che rappresentano veri e propri relitti dell'antico bosco planiziale ed alle quali si attribuisce un notevole valore naturalistico, il Ghiro compie decorticazioni analoghe su giovani piante di Pioppo bianco ed Ontano nero. Tale tipo di danno, già segnalato in passato per la stessa area forestale (4,6) e per i dintorni di Torino (7), si manifesta tra maggio (momento in cui la specie riprende la sua attività dopo la lunga parentesi del letargo invernale) e la fine di luglio. Anche in questo caso l'attacco interessa la parte alta del fusto, al di sopra di 3-4 metri da terra; le lacerazioni possono essere rettangolari (con il lato maggiore parallelo all'asse del fusto), anulari o spiralate. Ne consegue comunque la messa a nudo del floema e l'immediato disseccamento della parte apicale della pianta. Nel successivo autunno-inverno, sotto l'azione degli agenti atmosferici, si avrà poi regolarmente la stroncatura del fusto in corrispondenza della zona incisa.

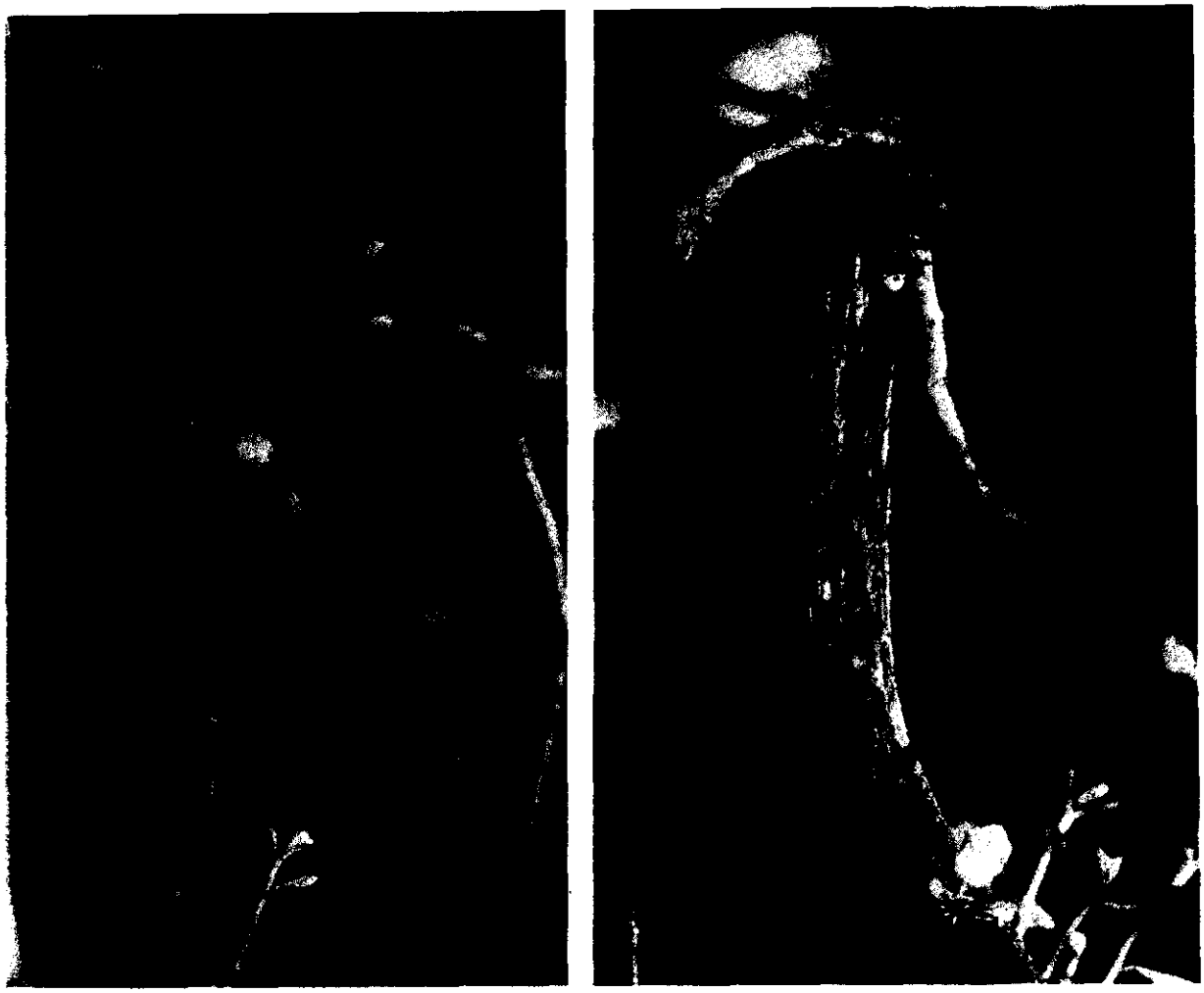


Fig.1. - Sciurus vulgaris L. Decorticazioni a giovani piante di Quercus ilex.

Infine, nei giardini, nei viali e nei parchi pubblici dei centri abitati compresi nel Parco Naturale (tali Viareggio, Torre del Lago, Migliarino Pisano, Marina di Pisa, Calambrone), in particolare ove queste aree verdi confluiscono direttamente nelle attigue pinete a Pino domestico, è il Ratto alessandrino a rendersi responsabile di estese e, come tali, gravi decorticazioni al Pittisforo, una pianta largamente rappresentata in tutto il litorale Pisano-lucchese, ove costituisce siepi ornamentali e spartivento, anche in stretta possibilità della linea di spiaggia. Questo ratto, noto per le sue spiccate abitudini arboricole, compie tali decorticazioni nei mesi invernali e sulle branche più vecchie, all'interno della chioma, con conseguenze spesso evidenti per l'improvviso disseccamento di vaste porzioni della chioma stessa; ciò che costituisce un danno estetico spesso non indifferente. Tale tipo di danno, individuato e descritto per la prima volta dallo Zocchi (13) per il litorale livornese, comporta ugualmente la messa a nudo del floema e la sua intaccatura per ampi tratti subrettangolari.

Il Ratto grigio nei campi coltivati

Decisamente più importanti sono alcuni problemi dovuti a roditori al di fuori del bosco, nelle vaste superfici coltivate, in particolare nell'area di Massaciuccoli. Questi si identificano con massicci attacchi portati in diversi periodi dell'anno dal Ratto grigio alla coltura del mais a quella del girasole, ambedue ivi largamente rappresentate. Questo ratto, infatti, trova nella zona condizioni estremamente favorevoli al suo insediamento nelle sponde erbose di numerosi fossi e canali presenti ed il sostentamento per un costante suo proliferare nell'ambito delle colture ricordate che, in concomitanza di diverse loro fasi fenologiche (12) ed anche per un lungo periodo successivo al raccolto, assicurano cibo abbondante ed appetito per gran parte dell'anno. Le manifestazioni più evidenti riguardano le spighe in maturazione latteo-cerosa che vengono lacerate ed accuratamente private delle cariossidi ancora immature (12). Gli attacchi si ripetono ormai annualmente ed interessano man mano superfici sempre più vaste (Fig.2).

Come intervenire?

In sostanza, in quanto sin qui riferito e illustrato si possono individuare elementi utili per diagnosticare prontamente, in ambienti analoghi a quello citato come esempio, l'eccessivo proliferare di questa o di quella specie di roditore. Ma proprio perché stiamo considerando aree soggette a vincoli protezionistici, e come tali attentamente salvaguardate nella loro integrità da una serie di limitazioni, divieti e regolamenti da tenere in conto, viene fatto di chiedersi con quali mezzi - dandosene l'assoluta necessità per motivi di igiene e di salute pubblica, nonché per salvaguardare la produzione agricola - sia possibile intervenire per ridurre la densità di una popolazione di questo e di quel roditore, garantendo al tempo stesso l'integrità dell'ambiente e delle altre specie animali presenti. In proposito io posso esprimere solo per grandi linee quello che è il mio punto di vista personale.

Poiché attualmente è quantomeno illusorio, anche nel nostro caso specifico, pensare di pianificare e, soprattutto, eseguire una serie di interventi routinari atti a prevenire le infestazioni - ciò che sarebbe l'unica azione ecologica veramente possibile -, quando si dovesse assolutamente ridurre in tempi brevi una infestazione in atto (intendo soprattutto quelle sostenute da ratti), non rimarrebbe purtroppo che ricorrere a mezzi chimici, ciò che oggi vuol dire impiego di esche trattate con sostanze tossiche. Stando così le cose, nell'intento di rendere tale tipo di intervento quanto più possibile innocuo per l'ambiente, ritengo che gli odierni rodenticidi cronici anticoagulanti, per

Fig.2. - Rattus norvegicus BERK. - Particolari dei tipici attacchi portati della specie alle spighe di mais in fase di maturazione latteo-cerosa.

la loro insita, relativa selettività tossicologica, possano essere usati anche in aree aperte, particolarmente delicate, purché se ne ottimizzi l'impiego - in fatto di sicurezza e di efficacia - mediante l'applicazione rigorosa di una serie di norme basilari e di strategie di intervento mirate cui ora farò cenno.

Quanto vengo a dire, se riferito all'esempio da me anzi riportato, può essere valido solo per due specie di ratto, dalle quali, in definitiva, possono provenire i maggiori pericoli per la salute pubblica ed i decurtamenti più gravi per le produzioni agricole. Per quanto riguarda lo Scoiattolo, a parte i comprensibili risvolti etici che assumerebbe una lotta nei suoi riguardi, non vedo quale mezzo, fra quelli oggi disponibili, potrebbe consentire una rapida diminuzione del numero dei suoi individui nell'ambito di un'area forestale. Questa specie, infatti, si distingue per una estrema diffidenza che denota per tutto quanto di innaturale ed artificioso venga introdotto nel suo ambiente, tanto che trappole od esche tossiche - ammesso che tali mezzi risultassero ragionevolmente proponibili - non produrrebbero alcun risultato apprezzabile. Per quanto concerne poi il Ghiro, altro roditore arboricolo per il quale, almeno teoricamente, potrebbero essere validi, con solo alcune varianti tecniche, i materiali e le strategie raccomandate per i ratti, allo stato attuale delle cose non ritengo obiettivamente che sarebbero giustificabili dei provvedimenti drastici nei suoi confronti, senza tenere conto delle gravi incognite

cui si andrebbe incontro impiegando dei mezzi chimici nell'ambito di un ecosistema forestale.

Per quel che riguarda i ratti, invece, sono questi, per sommi capi, i criteri cui, a mio avviso, dovrebbe ispirarsi un trattamento nell'ambito di un'area aperta, tantopiù se soggetta a vincoli protezionistici.

1) Nell'ambito della superficie interessata all'eventuale trattamento, sia essa una zona periferica del bosco (caso del Ratto alessandrino) o un sistema di campi coltivati, è fondamentale procedere ad un accurato sopralluogo preliminare. Con esso si debbono anzitutto precisare gli esatti limiti del territorio infestato, le aree più ristrette, in esso comprese, ove si concentrano gli insediamenti stabili dei roditori, le loro abituali vie di spostamento verso i punti di alimentazione, la qualità, la quantità, e la dislocazione del cibo disponibile sul luogo, i punti precisi ove l'esca dovrà essere distribuita. Con esso ci si deve anche rendere conto di quali siano gli eventuali altri animali vertebrati presenti.

2) Riveste ovviamente un'importanza determinante la scelta del materiale commestibile cui aggiungere la giusta dose di principio attivo e da fare poi assumere ai ratti. Questo materiale, infatti, oltre a rispondere alle naturali preferenze alimentari dei roditori, dovrà competere con altro cibo presente sul luogo e, al tempo stesso, non attrarre mammiferi di mole maggiore (Canidi, Felidi, Mustelidi). Dovrà resistere abbastanza agli agenti meteorici ed i singoli elementi che lo compongono dovranno avere una giusta pezzatura. Per questo particolarissimo impiego, pertanto, io raccomando di ricorrere non ad un'esca pronta del commercio, ma ad una che sia preparata estemporaneamente, nella misura volta a volta necessaria, aggiungendo alla base ritenuta più valida il principio attivo, acquistato sotto forma di concentrato in veicolo oleoso e polverulento, nonché un emetico. Ed a proposito del materiale di base, da quanto ho potuto più volte verificare personalmente sul campo, mi risulta che la cariosside intera di grano tenero risponda ottimamente ai requisiti anzi evocati, in stagioni ed in contesti ambientali diversi.

3) La scelta del principio attivo, già l'ho anticipato, deve esser fatta tra gli anticoagulanti e deve precipuamente tener conto della necessità di ridurre al minimo indispensabile la permanenza del tossico sul terreno, come dire di conseguire un risultato utile nel più breve tempo possibile. Per ottenere questo dovremo orientarci su uno dei prodotti di più recente sintesi (tale il Chlorophacinone, ultimo della prima generazione, o il Bromadiolone e il Difenacoum, fra quelli della seconda generazione). Questi anticoagulanti, seppur relativamente più tossici di quelli che li hanno preceduti, oltre a denotare un maggior grado di "palatabilità" (in particolare il Bromadiolone), consentono in realtà risultati assai più rapidi e completi e io sono dell'avviso che, in condizioni strettamente controllate, essi consentano di operare nel complesso con un maggiore grado di sicurezza. Con essi, infatti, l'abbattimento della massima parte della popolazione può essere conseguito comunque entro un limite massimo di 10 gg. laddove con i vecchi anticoagualnti (Coumaféne, Coumacloro) il trattamento deve protrarsi per almeno 20 giorni e con i risultati spesso non completi.

4) Di norma, nel caso di impiego di un anticoagulante, non si rende necessaria la pratica del "pre-baiting", abitualmente usata con i veleni acuti e che prevede una distribuzione preliminare di esca non trattata, tesa essenzialmente a favorire un più pronto e maggiore consumo della stessa, trattata, distribuita successivamente nei medesimi punti. Nel nostro caso particolare ritengo, invece, che questa tecnica sia decisamente da raccomandare, soprattutto perché può fornirci, in via preliminare, le indicazioni indispensabili per limitare allo stretto necessario la quantità di esca da distribuire ed i punti della sua distribuzione sul terreno. Tale accorgimento favorisce la confidenza dei ratti con il materiale di base impiegato e fornisce - attraverso la misurazione dei consumi - un indice relativo al numero dei ratti presenti; consente inoltre di individuare in anticipo, nell'ambito dell'area interessata al trattamento, le

poste che i ratti saranno disposti a frequentare e che dovranno essere le sole rifornite successivamente con esca tossica.

5) In ciascuna delle poste stabilite con la fase di pre-appastaggio è poi essenziale - sempre ai fini di ridurre al minimo i tempi di intervento - che sia deposta, fin dall'inizio una quantità di esca tossica eccedente il consumo previsto. Ciò ridurrà al minimo la conflittualità che insorge tra gli individui di diverso rango affluiti contemporaneamente ai punti esca e ne favorirà un consumo "ad libitum" nel più breve spazio di tempo possibile. In virtù dell'effetto "a dose singola" che poi è riconosciuto a tutti gli anticoagulanti di seconda generazione, l'impatto del tossico sul complesso della popolazione sarà più ampio ed avverrà in un tempo più breve e, ciò che a noi in definitiva interessa di più, ne potrà essere ridotta alquanto la permanenza sul terreno.

6) Durante l'intera operazione (pre-appastaggio più distibuzione di esca tossica) ciascuna posta dovrà essere rigorosamente protetta, nel senso di impedire, per quanto possibile, ad animali di taglia superiore ad un ratto, di attingere al cibo tossico. Nel caso di lotta al Surmolotto servono bene allo scopo delle semplici cassette da frutta rovesciate a mò di tettoia ed appesantite con una pietra. Per quanto riguarda in particolare il Ratto alessandrino, in considerazione dei suoi consumi prevalentemente arboricoli, il trattamento può risultare più proficuo quando l'esca è disposta al di sopra del livello del suolo. Nel caso, pertanto, sarà opportuno predisporre sugli alberi o in mezzo alle siepi frequentate dai ratti, degli speciali contenitori, provvisti di stretti accessi, in modo che l'esca in essi contenuta non possa essere raggiunta facilmente dagli uccelli.

7) Dal terzo giorno dall'inizio del trattamento e per almeno 10 successivi alla conclusione, quotidianamente, in tutta l'area interessata, si dovranno raccogliere con cura ed eliminare le carogne e gli eventuali ratti sofferenti reperibili sul terreno. Tale situazione, utile anche per una verifica dei risultati conseguiti, si impone soprattutto per ridurre l'occasione di possibili avvelenamenti secondari. Infine, sempre nell'ottica di ridurre al minimo i rischi di intossicazione dirette di animali "non bersaglio" e di inquinamento dell'ambiente, è assolutamente necessario, al termine dell'operazione, procedere immediatamente al recupero accurato di tutta l'esca tossica rimasta nelle poste, compresi i residui che talvolta i ratti spargono nelle immediate adiacenze dei contenitori.

Conclusioni

In conclusione, con il mio intervento ho inteso soprattutto offrire, a persone non avvezze ad un certo tipo di diagnosi indiretta, alcuni nuovi elementi utili ad identificare tempestivamente infestazioni da roditori in ambienti che non siano quelli urbani, sub-urbani o rurali, loro abituali, ma ove ugualmente questi animali, se in numero eccessivo, possono rappresentare una minaccia per la salute pubblica, trattandosi comunque di aree istituzionalmente destinate allo svago ed alla ricreazione. In secondo luogo ho inteso esprimere il personale convincimento che, almeno in certi casi, ove ci si trovi in una situazione di emergenza, fra i mezzi rischiosi ed inquinanti oggi disponibili per intervenire, quello che in realtà sembra riservare pericoli minori per operatori, specie "non bersaglio" ed ambiente sia l'impiego di esche rodenticide a base di superfici anticoagulanti. Questo è tuttavia possibile solo alla inderogabile condizione che si curi con rigore la scelta dei materiali da impiegare, la tecnica di distribuzione di protezione dell'esca tossica, il recupero della medesima inutilizzata e, ove possibile, il recupero e la distribuzione dei corpi dei roditori intossicati.

Ed anche con una applicazione rigorosa, controllata, fatta da persone competenti, sono dell'avviso che sia basilare ridurre quanto più possibile il tempo di esposizione del tossico nell'ambiente. Cosa che, come ho già detto, si può in realtà ottenere adottando materiali, oggi disponibili, che consentono

una risposta più rapida e completa.

BIBLIOGRAFIA

1. ARRU, M. & LAPIETRA, G. 1976. Damage caused by vertebrates to forests of Mediterraneam countries. In: Prooceedings of XIV I.U.F.R.O. World Congress Oslo, June 20-July 2.
2. A.A.V.V. 1985. Dal Galambrone al Burlamacca. Guida della natura del Parco di Migliarino-San Rossore-Massaciuccoli. Nistri-Lischi, Pisa.
3. CALDART, F. 1958. Quando Ghiri e Scoiattoli possono riuscire di danno ai boschi resinosi. Pro Natura 7 (20): 7-9.
4. FASETTA, L. 1959. Dannosità dei Ghiri (Glis glis L.) alle essenze erbose della tenuta di Migliarino (Pisa). Tesi di laurea sostenuta nell'A.A. 1958-59 presso la facoltà di Scienze Forestali dell'Università di Firenze. pp. 113-116.
5. GHIZZALI, F. 1937. I danni prodotti dallo Scoiattolo (Sciurus vulgaris L.) ai nostri boschi di conifere e di latifoglie. L'Alpe 24: 65-71.
6. MAGNANI, G. 1959. Danni prodotti dai roditori su pioppo e ontano (studio sulle cicatrizzazioni e sui tessuti cicatrizzati). Pubblicazioni del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale, Ente Nazionale Cellulosa e Carta. 2: 119-135.
7. PESANTE, A. 1956. Alcune osservazioni su scortecciamenti da Roditori. Boll. Lab. Sper. e Oss. Fitop. Torino 19 (n.s.): 127-134.
8. RIGONI, P. 1974. Rapporti trofici e reti alimentari nella fauna prealpina. Natura e montagna (2-3): 65-75.
9. SAMPO', A. 1971. Lo Eliomys quercinus Linnaeus nella fitopatologia forestale (Rod. Muscardinidae). Publ. n. 159 Centro di Entomologia Alpina e Forestale del CNR, Torino. pp. 25-72.
10. SANTINI, L. 1978. Biology, damage and control of the Edible dormouse (Glis glis L.) in Central Italy. In: Proceedings 8th Vert. Pest. Conf. Sacramento, March (7-9): 78-84.
11. SANTINI, L. 1979. Su alcuni caratteri peculiari della fauna di Tombolo, San Rossore e Migliarino Pisano. In: Atti Conf. su Boschi litoranei della Toscana Settentrionale, Pisa. 27 giugno: 70-79.
12. SANTINI, L. 1983. I Roditori italiani di interesse agrario e forestale. Publ. n. AQ/1/232 CNR, P.F. Promozione della qualità dell'ambiente, Padova. pp. 1-168.
13. ZOCCHI, R. 1957. Scoiattolo, Ghiro e Ratto: tre roditori dannosi alle nostre piante forestali. L'Italia Forestale e Montana 12 (5): 1-14.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 111-116

EMOPARASSITOSI AVIARIE NEL PARCO DEL TICINO ED IN ALTRE ZONE ITALIANE

L. Sacchi & C. Prigioni

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia, P.zza Botta, 9 - 27100 Pavia

Riassunto. - Vengono considerati i risultati di 6 anni (1978-1984) di indagine sulle emoparassitosi degli uccelli. Le ricerche iniziate nel territorio del Parco del Ticino si sono estese successivamente ad altre zone italiane. Complessivamente sono stati esaminati 946 animali appartenenti a 57 specie e a 21 famiglie: 128 uccelli risultavano affetti da Leucocytozoon, 12 da Haemoproteus, 4 presentavano infezione mista e 12 erano infetti da microfilarie. Di diversi emoparassiti non si conoscono precedenti segnalazioni italiane. Particolare enfasi è stata data allo studio di Leucocytozoonosi degli Ardeidi nidificanti nel Parco del Ticino, in relazione alla epidemiologia, alla patologia ed al ciclo vitale.

Summary (Avian Haematozoa from Ticino Park and from other zones of Italy). - During the period 1978-1984 946 wild birds from Ticino Park and from other areas of Italy were examined for hemoparasitosis: 128 birds were found to be infected with Leucocytozoon, 12 with Haemoproteus, 4 birds harboured mixed infections and 12 microfilaria. Some blood parasites are recorded for the first time in Italian birds. A careful analysis, restricted to Leucocytozoon of Ardeidae with particular respect to epidemiology, pathology and life cycle is presented.

Introduzione

La presente ricerca sulla emoparassitosi aviarie riguardanti soprattutto i generi Leucocytozoon ed Haemoproteus (Apicomplexa, Haemosporina) abbraccia un periodo di 6 anni (1978-1984). Le prime osservazioni sono state fatte sulla avifauna nidificante nel Parco del Ticino e successivamente, in particolare per i rapaci, si sono estese anche ad altre zone italiane. Gli emoparassiti in questione sono specifici e, nel caso del Leucocytozoon, esclusivi degli uccelli. Hanno un complesso ciclo vitale la cui fase sporogonica si compie in insetti vettori appartenenti alle famiglie Simuliidae e Ceratopogonidae. Solo in poche specie si conoscono per intero i cicli sporogonico e schizogonico e le manifestazioni di patogene dell'ospite vertebrato.

L'indagine da noi condotta su 946 uccelli appartenenti a 57 specie diverse, ha avuto innanzitutto lo scopo di aggiornare il quadro epidemiologico delle emoparassitosi aviarie italiane. Dati precedenti sull'argomento sono fermi alla prima metà del secolo (4,5), se si escludono i lavori di Corradetti che però riguardano soprattutto il genere Plasmodium.

Nel Parco del Ticino la presenza nei mesi primaverili ed estivi di una delle più cospicue popolazionni di Ardeidi coloniali dell'Italia settentrionale, ha consentito di analizzare in dettaglio diversi aspetti dell'infezione da Leucocytozoon, specialmente nella Nitticora (Nycticorax nycticorax). Pertanto è stato studiato l'andamento epidemiologico nelle diverse aree di nidificazione

(Garzaie) nell'arco di più anni, sono stati valutati gli aspetti patologici e sono state ricostruite alcune fasi del ciclo vitale del parassita.

Materiali e Metodi

Tutte le osservazioni sono state effettuate su strisci ematici e su preparati ottenuti per contatto d'organo (cuore, fegato, rene, milza, polmone). I campioni fissati in metanolo 100% e colorati con il metodo Giemsa, sono stati osservati con un fotomicroscopio Zeiss III. Per il calcolo dei parametri biometrici dei gametociti da utilizzare ai fini sistematici, sono stati seguiti i criteri proposti da Bennet e Campbell (1,2). Le misurazioni sono state eseguite utilizzando un microscopio Visopan Riechert.

Risultati e discussione

La distribuzione degli emoparassiti all'interno delle 21 famiglie esaminate nella Tabella 1, che comprende e riassume dati in parte già comunicati (8). Un dettagliato esame della distribuzione degli emoparassiti all'interno di ciascuna specie ospite viene tralasciato in questa sede. Va comunque rilevato che l'esame sistematico dei 144 animali infetti, ha consentito sia di segnalare

Tabella 1. - Distribuzione degli emoparassiti in uccelli esaminati negli anni 1978-1984.

Famiglia	N°Specie	N°Campioni	H.	L.	H+L	Microfilarie
ARDEIDAE	6	268	-	66	-	-
CICONIIDAE	1	1	-	-	-	-
ANATIDAE	3	53	-	-	-	1
PANDIONIDAE	1	2	-	-	-	-
ACCIPITRIDAE	10	131	2	25	-	-
FALCONIDAE	2	25	7	1	-	-
PHASIANIDAE	4	113	-	10	-	-
RALLIDAE	4	54	1	-	-	-
CHARADRIDAE	1	8	-	-	-	-
SCOLOPACIDAE	1	10	-	-	-	-
LARIDAE	3	37	-	-	-	-
COLUMBIDAE	1	1	-	-	-	-
TYTONIDAE	1	7	-	-	-	-
STRIGIDAE	5	33	2	3	4	-
APODIDAE	1	1	-	-	-	-
PARIDAE	1	2	-	-	-	-
CERTHIDAE	1	1	-	-	-	-
PLOCEIDAE	2	43	-	-	-	-
STURNIDAE	1	16	-	-	-	1
TURDIDAE	3	6	-	-	-	-
CORVIDAE	5	134	-	23	-	10
Totale	57	946	12	128	4	12

per la prima volta in Italia la presenza di emoparassiti in almeno 16 specie ospiti (Tab.2), sia di ridescrivere alcuni parassiti come Leucocytozoon macleani e Haemoproteus gallinulae. Un confronto anche se superficiale (non si tiene conto delle differenze tra le varie specie ospiti), può essere fatto per il territorio nazionale, con i dati ricavati dall'esame di 1.646 uccelli campionati dal 1890 al 1978 (7). Dal confronto emerge una chiara tendenza dalla diminuzione delle emoparassitosi negli ultimi dieci anni. Infatti la percentuale di animali infetti da noi osservata è stata pari al 15,2% contro il 25,8% dei dati precedenti. Se si considera invece la diversa incidenza delle singole parassitosi sul totale degli animali infetti, emerge una evidente tendenza all'aumento delle infezioni da Leucocytozoon (si passa dal 19,5% all'88,9% da noi rilevato) ed alla diminuzione delle infezioni da Haemoproteus che dal precedente 39,0% passa all'8,3%.

Per quanto riguarda il gruppo sistematico da noi maggiormente studiato, cioè la famiglia Ardeidae, disponiamo di dati di 268 animali appartenenti a 6 specie diverse. La presenza di Leucocytozoon nel Tarabuso (Botaurus stellaris) e nell'Airone cenerino (Ardea cinerea) non era stata segnalata in precedenza in Italia. Per la Nitticora (Nycticorax nycticorax) e la Garzetta (Egretta garzetta), è stato possibile individuare focolai endemici di infezione all'interno di alcune aree di nidificazione presenti nel Parco del Ticino. In una Garzaia l'infezione è stata riscontrata per almeno 5 anni consecutivi. La persistenza delle infezioni da Leucocytozoon in alcune zone si può spiegare ipotizzando che negli adulti, già infetti, si manifestano ricadute dovute allo stress del volo migratorio e all'inizio dell'attività riproduttiva. Gli adulti rappresenterebbero quindi il serbatoio di infezione per gli insetti vettori, che successivamente trasmetterebbero la parassitosi alla nuova generazione. La tendenza alla cronicità delle infezioni da Leucocytozoon in Nitticora, è stata del resto da noi verificata in animali seguiti per più anni in laboratorio. Probabili vettori dell'infezione sono i Simulidi: Simulium angustitarse e Simulium latigonium sono stati da noi reperiti in diverse aree endemiche, tuttavia non è stato possibile né osservare vettori infetti, né utilizzare gli

Tabella 2.- Specie in cui viene segnalata per la prima volta in Italia la presenza di emoparassiti

Specie	N° Campioni	Leucocytozoon	Haemoproteus
Tarabuso (Botaurus stellaris)	2	1	-
Garzetta (Egretta garzetta)	31	18	-
Airone cenerino (Ardea cinerea)	8	3	-
Nibbio bruno (Milvus migrans)	3	-	1
Poiana (Buteo buteo)	74	16	-
Albanella reale (Circus cyaneus)	5	1	-
Albanella minore (Circus pygargus)	2	1	-
Lodolaio (Falco subbuteo)	2	-	1
Gheppio (Falco tinnunculus)	23	1	-
Fagiano (Phasianus colchicus)	74	10	-
Gallinella d'acqua (Gallinella chloropus)	51	-	1
Gufo comune (Asio otus)	8	1	1
Gufo di palude (Asio flammeus)	2	1	-
Allocco (Strix aluco)	16	2	-
Gazza (Pica pica)	4	2	-
Cornacchia grigia (Corvus corone cornix)	112	22	-

stessi per la trasmissione dell'infezione.

Seguendo in laboratorio il decorso dell'infezione in più Nitticore, abbiamo osservato che i gametociti (Fig.1) compaiono nel sangue dopo un periodo di latenza di 5-10 gg. La fase schizogonica si compie nel fegato, dove sono stati osservati schizonti maturi (Fig.2) e probabilmente anche nel rene. La parassitemia mostra un primo picco tra il 3° ed il 4° giorno di positività ed un secondo picco tra il 9° ed il 12° giorno (Fig.3) e si mantiene quasi sempre al di sotto dello 0.5%. Eccezionalmente sono stati osservati animali con gametocitemia superiore al 4%. Dopo un periodo variabile di 9-12 giorni la parassitemia scende rapidamente sino a livelli difficili da valutare al microscopio. L'infezione successivamente mostra un andamento cronico: in un animale abbiamo osservato gametociti nel sangue in vari controlli condotti per 2 anni e 5 mesi. I gametociti vanno incontro ad un rapido processo di maturazione: abbiamo osservato che il processo di extraflagellazione e la formazione del macrogamete si completano in vitro, in meno di tre minuti (Fig. 4 a,b). La formazione dell'oocinete (Fig. 5 a,b) è stata eseguita sia in vitro sia in un ceppo di laboratorio di Aedes queenslandensis e richiede circa due ore.

A differenza di alcune specie di Leucocytozoon che si dimostrano fortemente patogene per l'ospite (3), quella presente in Nitticora non sembra provocare danni rilevanti. Infatti studiando in almeno 5 aree di nidificazione e per più anni, la riuscita della riproduzione (numero di pullus per nido), si hanno valori medi (2,4) che non sembrano essere influenzati dalla presenza di focolai di infezione e che sono del tutto simili a quelli considerati da Hafner (6) normali per la specie (2,5). E' infine stato osservato ponendo a confronto, durante il primo mese di vita, le curve di crescita di animali parassitati e sani, (peso corpo, lunghezza del tarso e del becco), che non vi è alcuna differenza tra i due campioni. Si può quindi escludere che la presenza del parassita provochi danni di rilievo, che altrimenti sarebbero facilmente evidenziabili in una fase di sviluppo particolarmente delicata.

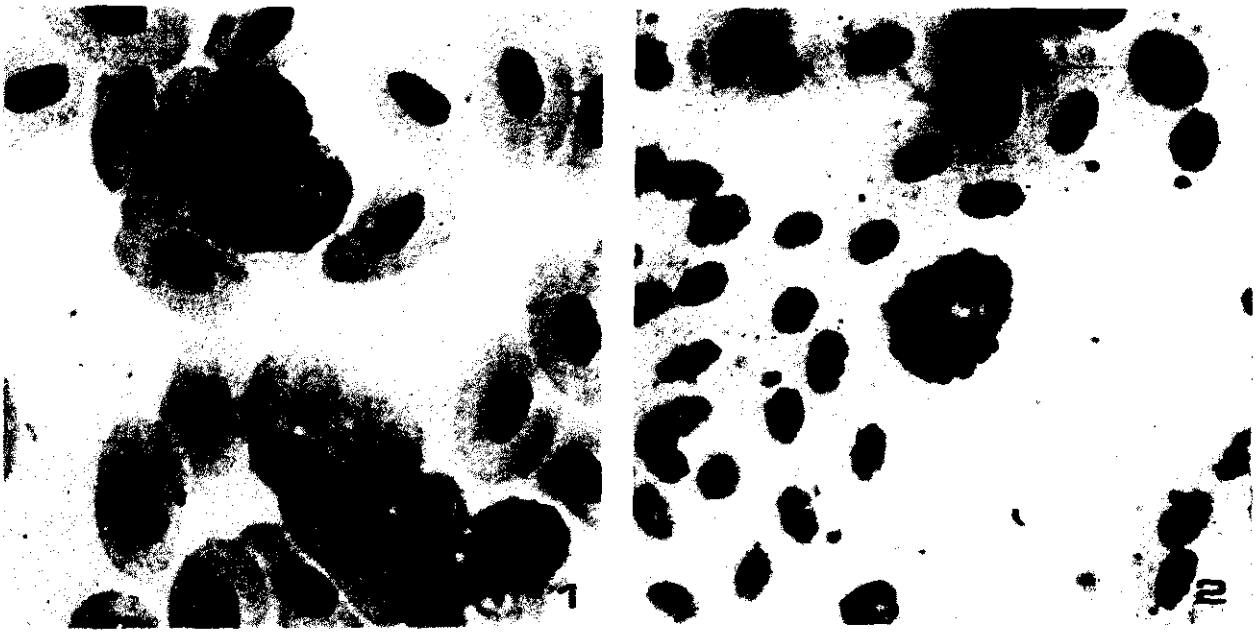


Fig. 1-2. - Leucocytozoon di Nitticora. 1. Macrogametocita (sopra) e microgametocita (sotto). 2. Schizonte maturo nel fegato. (1250 x)

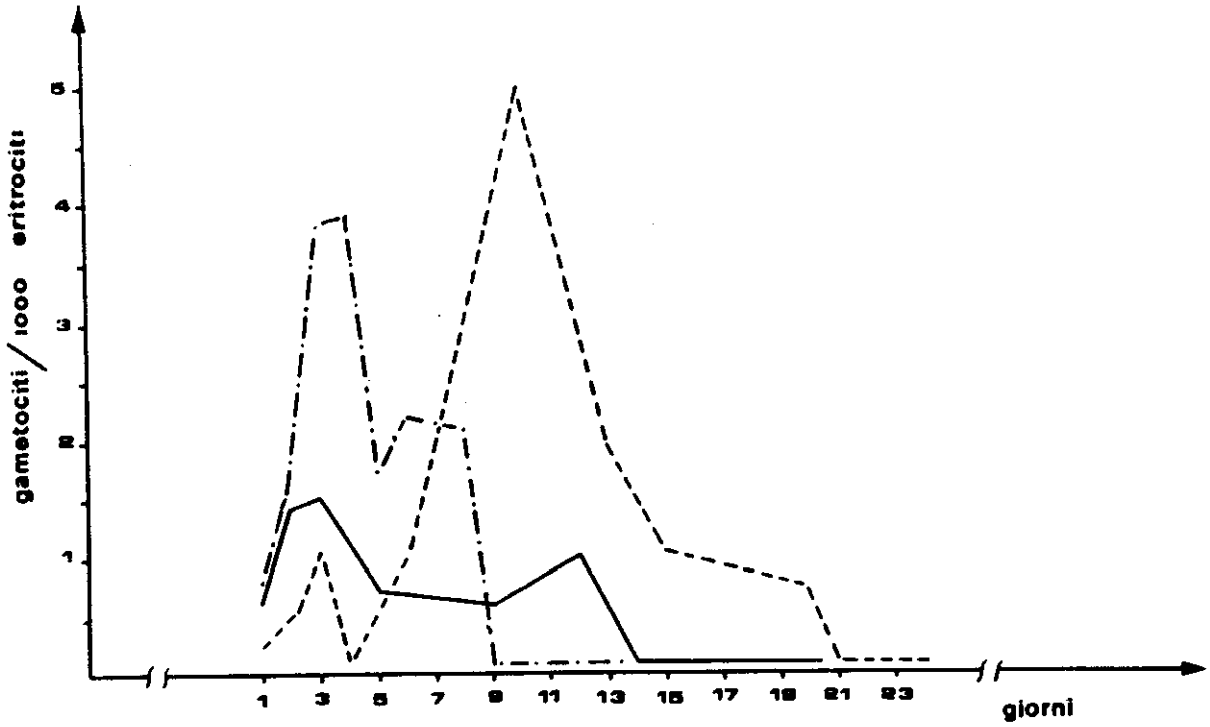


Fig.3. - Andamento della gametocitemia in 3 esemplari di Nitticora infetti da Leucocytozoon. Le due interruzioni sull'ascissa indicano rispettivamente in periodo di incubazione (7-9 gg) e il periodo di cronicità (min. 2 mesi; max. 2 anni e 5 mesi).

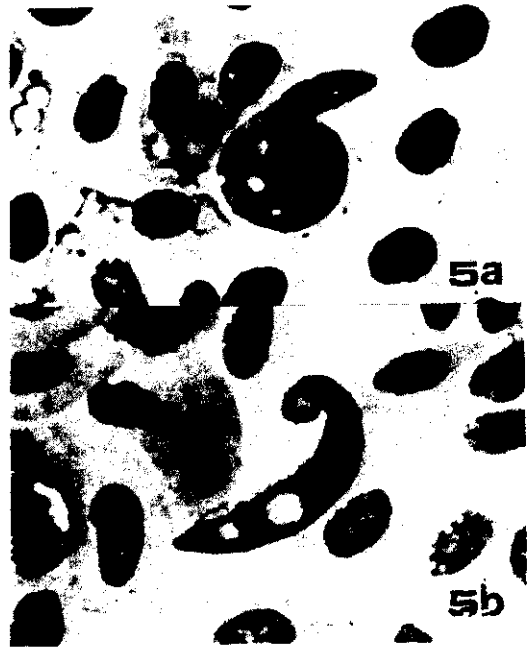


Fig. 4-5. - Leucocytozoon di Nitticora. 4a. Extraflagellazione. 4b. Macrogamete e microgamete (freccia). 5a. Formazione dell'oocinete. 5b. Oocinete (1250x)

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano i Dottori F. MELLEY e G. MEZZATESTA della L.I.P.U. di Parma e il DoTT. F. FRANCESCHINI del centro recupero rapaci di Vicenza, per la preziosa collaborazione offerta nel campionamento dei rapaci.

BIBLIOGRAFIA

1. BENNET, G.F. & CAMPBELL, A.G. 1972. Avian Haemoproteidae. I. Description of Haemoproteus fallisi n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. Can. J. Zool. 50: 1269-1275.
2. BENNET, G.F. & CAMPBELL, A.G. 1975. Avian Leucocytozoidae. I. Morphometric variation in three species of Leucocytozoon and some taxonomic implications. Can. J. Zool. 53: 800-812.
3. FALLIS, A.M., DESSER, S.S. & KHAN, R.A. 1974. On species of Leucocytozoon. Adv. Parasitol. 12: 1-67.
4. FRANCHINI, G. 1923. Hématozoaires de quelques oiseaux d'Italie. Bull. Soc. Pathol. Exot. 16: 120-123.
5. FRANCHINI, G. 1924. Observation sur les Hématozoaires des oiseaux d'Italie Ann. Instit. Pasteur 38: 493-497.
6. HAFNER, H. 1978. Le succès de reproduction de quatre espèces d'Ardéides Egretta g. garzetta L., Ardeola r. ralloides Scop., Ardeola i. ibis L., Nicticorax n. nycticorax L. en Camargue. Terre Vie 32: 279-289.
7. PEIRCE, M.A. 1981. Distribution and host-parasite check-list of the haematozoa of birds in Western Europe. Journal of Natural History 5: 419-458.
8. PRIGIONI, C. & SACCHI, L. 1984. Blood parasites recorded in italian birds. Avocetta 8: 11-17.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 117-120

INDAGINE SUI PARASSITI PRESENTI IN VOLPI (VULPES VULPES) DELLA PROVINCIA DI FORLI'

G. Poglayen, V. Guberti & B. Leoni

Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria, Università di Bologna.

Riassunto. - Nel periodo marzo 1983-1984 è stata condotta un'indagine parassitologica su 103 volpi abbattute in provincia di Forlì. I parassiti identificati sono stati: Toxocara canis (60%); Ucinaria stenocephala (20%); Dipylidium caninum (8%); Mesocestoides lineatus (27%); Taenia crassiceps (8%); Trichuris vulpis (4%). I risultati dell'esame autoptico sono stati correlati a quelli dell'esame coprologico per saggiarne l'attendibilità.

Summary. - In the period March 1983-1984 a parasitological survey was carried out on 103 foxes schooted in the Forlì province (Italy). The parasites identified were: Toxocara canis (60%); Uncinaria stenocephala (20%); Dipylidium caninum (8%); Mesocestoides lineatus (27%); Taenia crassiceps (8%); Trichuris vulpis (4%). The autopsies' results were compared with coprological ones to asses their reliability.

Introduzione

Lo studio dei parassiti della volpe risponde, a nostro giudizio, ad una serie di finalità ben precise:
- la volpe è uno degli animali più comuni in Italia;
- molti parassiti della volpe colpiscono anche il cane;
- lo stadio larvale di alcuni cestodi della volpe riconosce come ospiti intermedi erbivori domestici;
- alcuni parassiti che colpiscono la volpe rappresentano importanti zoonosi;
- anche in Italia si sta diffondendo l'allevamento della volpe.

Materiali e Metodi

Nel periodo marzo 1983 - 1984 abbiamo esaminato 103 volpi in provincia di Forlì nell'ambito del piano di intervento di equilibrio biologico a norma della Legge Regionale 17 agosto 1978 N. 33, articolo n. 6.

Per ogni volpe, desunta l'età del consumo dei denti (1), è stata esguita l'autopsia tesa ad evidenziare macroscopicamente e microscopicamente la presenza dei parassiti: 1) nelle fosse nasali e nei seni frontali; 2) nella trachea e nei bronchi; 3) nel cuore e nei grossi vasi; 4) nel tubo digerente; 5) nello stomaco dove abbiamo inoltre osservato ed annotato il contenuto gastrico per evidenziarne le eventuali relazioni con il parassitismo. Per ogni soggetto è stato prelevato dal retto un campione di feci per l'esame microscopico. I risultati sono stati confrontati con quelli dell'autopsia per verificarne l'attendibilità; 6) piccole porzioni di diaframma e del muscolo tibiale anteriore sono state sottoposte ad esame trichinoscopico.

Risultati

Nelle nostre ricerche abbiamo reperito parassiti esclusivamente nel tratto digerente. Delle 103 volpi esaminate 78, pari al 75,7%, erano positive per parassiti. In particolare:

Toxocara canis	47 pari al 60%		
Uncinaria stenocephala	15 pari al 20,5%		
		Dipylidium caninum	3 (8%)
		Mesocestoides lineatus	10 (27%)
Cestodi	37 pari al 47,5%	Taenia crassiceps	3 (8%)
		Taenia spp.	20 (54%)
		Cestodi non identific.	1 (2,7%)
Trichuris vulpis	3 pari al 4%		
Eimeria sp.	1 pari al 1,3%		
Infestazioni multiple	20 pari al 19,5%		
Negative	25 pari al 24,3%		

La maggior parte di questi parassiti non presentavano caratteristiche diverse da quelle descritte dagli autori consultati. Per quanto concerne i cestodi reperiti in 7 campioni, lo stato di conservazione non ottimale ci ha permesso la sola determinazione del genere: Taenia sp. I cestodi reperiti in altri 13 campioni sembrerebbero appartenere, per dimensioni, numero di uncini e principali pecuniarità anatomiche, ad un'unica specie con caratteristiche simili a Taenia hydatigena: tuttavia la lunghezza media totale è di circa 1/10 rispetto a quella segnalata per questa specie (200 cm contro 20). Anche in questo caso ci limitiamo ad una indicazione di genere, rimandando però la determinazione della specie ad ulteriori approfondimenti. Inoltre un soggetto presentava un unico frammento di cestode dal quale non è stato possibile risalire neppure alla famiglia.

I coccidi, da noi reperiti in un solo campione di feci, appartenevano al genere Eimeria. Le caratteristiche morfologiche, studiate dopo la sporulazione, non corrispondono a nessuna delle specie descritte nella volpe e di conseguenza la denominiamo Eimeria sp.

I risultati dell'esame copromicroscopico sono stati confermati dal reperto autoptico di parassiti in 58 animali (56,3%), ma detto numero si eleva a 89 (86,4%) escludendo i cestodi; infatti per questi ultimi solo in 4 campioni su 37 positivi (10,8%) si sono trovate uova nelle feci.

Discussione

Alla luce dei dati ottenuti si può notare come sia elevato il numero dei soggetti parassitati (75,7%); tale situazione è stata riscontrata anche nelle altre due ricerche svolte precedentemente in Italia (2,3) e da quelle, più numerose, condotte nie paesi dell'Europa centrale ed anglosassoni (4-7).

Sempre dal punto di vista generale, diversamente da Soldati e coll. (3), ma in analogia con Rossi e coll. (2), sottolineiamo l'assenza di Toxascaris leonina.

Per quanto riguarda i cestodi, T. crassiceps è già stata segnalata in Italia da Rossi e coll. (2), M. lineatus da Soldati e coll. (3), mentre D. caninum non è stato segnalato in volpi dalle recenti ricerche italiane.

Riteniamo con la presente indagine di aver contribuito alla conoscenza dei parassiti di questo importante animale selvatico e di aver fornito spunti per ulteriori approfondimenti sia squisitamente parassitologici, nei confronti di quei parassiti che non è stato possibile identificare, sia nei confronti del ruolo della volpe quale serbatoio di tali parassiti.

BIBLIOGRAFIA

1. TOSCHI, A. 1965. Fauna d'Italia. Vol. 4 Mammalia. Ed. Calderini, Bologna.
2. ROSSI, L., IORI, A. & CANCRINI, G. 1983. Osservazioni sulla fauna parassitaria della popolazione di volpi presente nel Parco Regionale "La Mandria". Parassitologia 25: 340-343.
3. SOLDATI, G., PAVESI, M., CANESTRI-TROTTI, G., COCCHI, M.G., GAIARDI, S., MORGANTI, L., PROSPERI, S., SANGIUNETTI, V. & STANZANI, F. 1976. Research on infectious and parasitic agent in foxes of the Modenese Appennines. Riv. Parassitol. 37 (2-3): 329-332.
4. GRANDCHAMP, F. 1980. Etude des parasites du renard roux (Vulpes vulpes) dans le Canton de Vaud durant l'année 1978. Schweiz. Arch. Tierheilk. 122: 351-356.
5. HACKETT, F. & WALTERS, T.M.H. 1980. Helminths of the red fox in the Mid-Wales. Vet. Parasitol. 7: 181-182.
6. PETAVY, A.F. & DEBLOCK, S. 1980. Helmintes du Renard commun (Vulpes vulpes L.) dans la région du Massif Central (France). Ann. Parasit. Hum. Comp. 55: 379-391.
7. WILLIAMS, B.M. 1976. The intestinal parasites of the red foxes in South Wales. Brit. Vet. J. 132 (3): 309-312.

Il lavoro per esteso verrà pubblicato su altra rivista.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 121-126

ARTROPODI EMATOFAGI DEL PARCO NATURALE DI"MIGLIARINO-S.ROSSORE-MASSACIUCCOLI"

L. Rivosecchi, C. Khoury e E. Stella

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto.- Vengono fornite brevi note su alcuni Artropodi ematofagi(Ixodidae, Tabanidae,Culicidae)raccolti nel parco regionale di"Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli(Pisa).Per alcune specie di maggiore importanza viene data notizia sulla distribuzione stagionale,habitat e preferenze alimentari.I problemi posti dalla presenza di questi Artropodi in un'area protetta sono discussi.

Summary.- A brief record is given on some blood-sucking Arthropoda(Ixodidae, Tabanidae,Culicidae)collected in the regional Park"Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli(Pisa).Seasonal distribution,habitat and host-preference were noted for some important species.Problems given by these Arthropoda in a protected area are discussed.

Introduzione

Scopo del presente lavoro è essenzialmente quello di portare a conoscenza delle autorità preposte alla amministrazione di un"parco ad uso multiplo",taluni problemi determinati dalla presenza di artropodi ematofagi,fornendo al tempo stesso un criterio di base per la valutazione del rischio-beneficio conseguente alla destinazione di certi areali del Parco a determinati usi.

Il Parco ha una grande estensione,includendo una fascia litoranea della profondità media di 5 Km. compresa tra Viareggio e Livorno.

Tuttavia vi sono incluse aree adibite ad uso agricolo(preparco)ed aree interessanti la silvicoltura(pinete)che hanno minore interesse rispetto alle problematiche suddette.Sono invece di grande interesse alcune aree umide-naturali(paludi o foreste mesoigrofile(2))che abbiamo perciò studiato in modo più dettagliato(Tabella 1).

Materiali e Metodi

Il materiale include circa 35 specie(Tabelle 2-5).Le metodiche di raccolta sono quelle già esposte in precedenti lavori(4,5).Abbiamo invece usato per la prima volta con ottimi risultati una trappola Malaise.Le raccolte dirette sugli animali si riferiscono solo a conigli e daini uccisi di fresco.

Tabella 1.- Presenza(+)in varie località del Parco di alcune famiglie di Artropodi ematofagi e ospiti Vertebrati attaccati(+)in loco.

Località	Nome delle famiglie						Ospiti		
	Afanitteri	Ixodidi	Culicidi	Culicoides	Tabanidi	Ippoboscidi	uomo	an.selvatici	an.domestici
1) Massaciuccoli(il porto)	-	-	+	+	-	-	+	-	-
2) Migliarino(Bufalina)	-	-	+	-	-	-	+	-	-
3) Migliarino(foce del Serchio)	-	-	+	-	+	-	+	+	-
4) S.Rossore(ingresso)	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5) S.Rossore(f.Morto vecchio)	-	+	-	-	+	+	-	+	-
6) S.Rossore(oasi)	-	+	+	+	+	+	-	+	-
7) Tombolo(co.olivo)	-	+	+	-	+	-	+	-	+

Risultati

Si riferiscono alla distribuzione stagionale,alle località di provenienza all'habitat larvale e agli ospiti preferenziali delle varie specie(Tabelle 2-5).

Gli Ixodidi sono presenti in tutti i mesi dell'anno con due picchi stagionali in primavera(Aprile-Maggio)e autunno (Settembre-Ottobre).I Tabanidi attaccano animali selvatici,domestici e l'uomo da Giugno ad Ottobre,i Culicidi iniziano l'attacco all'uomo qualche mese prima,terminando circa nello stesso periodo,proprio quando inizia la molestia delle Trombicule che dura circa sino a Dicembre.Nell'area del Parco mancano Simulidi e Flebotomi e sembrano poco importanti i Culicoides,salvo nella limitata area del lago di Massaciuccoli. Sicchè in definitiva i più interessanti risultati della nostra ricerca si riferiscono a Ixodidi,Tabanidi e Culicidi sui quali riferiamo più in dettaglio quanto segue:

Ixodidi.Il reperto più interessante riguarda la presenza di Rhipicephalus pusillus(3)specie che normalmente si trova in Nord-Africa o in qualche isola dell'arcipelago siciliano(Ustica).La presenza di una specie così termofila in un'area caratterizzata da una flora ed una fauna per la maggior parte di origine centro-europeo-settentrionale,si spiega solo con la stretta associazione al coniglio selvatico.D'altra parte è largamente diffusa in S.Rossore anche una zecca tipica della fauna centro-europea,cioè Ixodes ricinus,specie che nelle foreste latifolie(2)e sul daino(3)trova condizioni molto favorevoli per la sua sopravvivenza e diffusione.

Nel Parco quindi due specie con opposto significato biogeografico sono proprio le due dominanti(Tabella 2)ed entrambe rappresentano due potenziali vettori di temibili malattie cioè la meningo-encefalite centro-europea e la febbre bottonosa del Mediterraneo.Per quest'ultima tuttavia è da verificare quanto ci sia di vero nell'ipotesi di Camicas(1)che il coniglio selvatico sia il reservoir di virus nel ciclo endemico.Inoltre non è in alcun modo accertato che valore abbia in tal senso R.pusillus.

Per il momento ci limitiamo a segnalare la pericolosità della situazione esistente all'ingresso di S.Rossore in un vasto prato costellato di tane di conigli selvatici ove il pubblico ha libero accesso nei giorni festivi.Il prato è contraddistinto da 3 zone(due dunali e una interdunale)nelle quali per le diverse condizioni microclimatiche predominano I.ricinus e R.pusillus nei vari mesi dell'anno(Tabella 3).

Tabella 2.- Esemplari della fam.Ixodidae raccolti nel parco durante l'anno 1984

Nome della specie	N.	reperti nei mesi dell'anno I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I.ricinus	200			10	89	70	2		26	3	
H.punctata	45				4	1			31	9	
D.marginatus	5			1			1	1		2	
R.pusillus	825			96	165	421	66	26	7	44	

Tabella 3.- Distribuzione dunale e interdunale di I.ricinus(I.r.)e R.pusillus (R.p.)in un'area con tane di conigli selvatici.

Mesi dell'anno	Duna scoperta R.p.	Duna scoperta I.r.	Interduna R.p.	Interduna I.r.	Duna boschiva R.p.	Duna boschiva I.r.
III			96	3		7
IV	20		127	14	18	75
V	59	4	205	13	53	157
VI			51	1	15	1
VII	1		11		14	
VIII	1		2		26	5
IX			35	1	9	3

Tabanidi.Sono più abbondanti dove sono più numerosi gli animali domestici e selvatici e dove è più umido il sottobosco(5).

Nel Parco sono particolarmente favoriti dal passaggio di cavalli in transito tra la scuderia e l'ippodromo attraverso la zona umida del "fosso Cuccia" all'ingresso di S.Rossore.Qui i cavalli sono attaccati particolarmente da Haematopota grandis e Tabanus bovinus.

Culicidi. In relazione alle particolari condizioni idrogeologiche(2)del Parco

(prevalenza di acque temporanee)si nota una certa scarsità di Anofelini ed al contrario una straordinaria abbondanza di Aedes,esclusi però quelli arboricoli la cui diffusione sembra alquanto contrastata dalla rigorosa applicazione di certe regole di silvicoltura(asportazione radicale delle ceppaie).Il più importante problema pratico è posto dagli attacchi di A.caspius(cfr.discussione).

Discussione

La nostra indagine sugli artropodi ematofagi ha messo a fuoco una serie di problemi di entomologia medica che si inseriscono nel contesto più generale di quelli dei"parchi ad uso multiplo".Taluni di questi derivano proprio dal discreto stato di conservazione dell'ambiente naturale mentre altri all'opposto dal degrado del medesimo.

Nel Parco da noi studiato abbiamo visto come l'attacco di Tabanidi e Culicidi sia particolarmente intenso in quelle zone(Tabelle 4-5)dove esistono ambienti umidi naturali;mentre al mancato smaltimento dei rifiuti nella pineta di Tombolo e all'inquinamento del canale emissario del lago di Massaciuccoli corrisponde rispettivamente l'abbondanza di mosche sinantrope e di Culex pipiens.

Tabella 4.- Tabanidi raccolti nel Parco e loro presenza(+)nelle località(1-7) già indicate a Tab.1

Nome delle specie	Località della Tab.1						
	1	2	3	4	5	6	7
C.viduatus	-	-	+	-	-	-	-
C.flavipes	-	-	+	+	-	+	-
Hy.ciureai	-	-	+	-	+	+	-
Hy.bimaculata	-	-	-	-	+	+	-
Th.gigas	-	-	-	+	-	+	-
Ta.nemoralis	-	+	+	-	+	+	-
Ta.autumnalis	-	-	+	+	+	+	-
Ta.bovinus	-	-	+	+	-	+	-
Ta.tinctus	-	-	-	+	-	+	-
Ta.eggeri	-	-	+	+	+	+	-
Hae.italica	+	+	+	+	+	+	+
Hae.grandis	-	-	-	-	+	+	+
Hae.belligera	-	-	-	-	-	-	+
Hae.bigoti	-	-	-	-	-	+	+
Hae.pandazinski	-	+	+	+	+	+	+
Da.anthracinus	-	-	-	-	-	+	-
Da.ater	-	-	-	-	-	+	-

Nelle aree di interesse naturalistico frequentato dall'uomo occorre anzitutto distinguere i problemi posti dagli artropodi molesti rispetto a quelli dovuti ai vettori propriamente detti.Nel Parco da noi studiato,almeno apparentemente si direbbe che l'importanza maggiore sia da attribuire ai molesti(Tabelle 4-5)ma non bisogna dimenticare che Ixodidi e Culicidi sono potenziali vettori di virus.Ad esempio:le morie di conigli per la mixomatosi sono probabilmente legate ai numerosi Culex che trovano rifugio nelle tane.

Situazioni di conflittualità non facilmente superabili tra interessi di tipo naturalistico-conservazionistico e interessi di tipo estetico-turistico o economico-produttivistico si verificano spesso in parchi ad uso multiplo proprio in relazione alla presenza di ematofagi.Nel Parco in questione abbiamo potuto fornire due esempi classici di tali contrasti proprio all'ingresso del

Tabella 5.- Culicidi del Parco e loro presenza(+)nelle località(1-7)della Tab.1

Nome delle specie	Focolai larvali							Adulti sull'uomo				
	1	2	3	4	5	6	7	2	3	4	6	7
An.maculipennis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
An.claviger	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ae.geniculatus	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Ae.detritus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Ae.vexans	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ae.caspius	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Ae.rusticus	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Cx.pipiens	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca.subochrea	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ca.annulata	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ca.longiareolata	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca.litorea	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
U.unguiculata	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

S.Rossore.Ci riferiamo in particolare al libero ingresso del pubblico in un vasto prato frequentato da conigli e nel bosco adiacente frequentato da daini che permette al pubblico di godere un bel paesaggio ma lo mette in contatto con numerose zecche possibili vettrici di malattie.Interessante è anche il contrasto esistente tra gli interessi economici legati ai cavalli da corsa e quelli naturalistici che non potranno mai acconsentire all'assurda pretesa di trattamenti massivi con insetticidi.

Riteniamo comunque che una buona conoscenza della localizzazione degli ematofagi all'interno del Parco e dei loro cicli di sviluppo consenta il più delle volte di evitare situazioni di conflittualità.Ad esempio,non si vede il motivo di portare in gita nel mese di Ottobre delle scolaresche in talune zone umide(contrada dell'Olivo-Tabella 5)ove si sa benissimo che verranno ferocemente attaccate da Aedes caspius.Al contrario una felice situazione abbiamo notato nell'oasi della Colmata(foce dell'Arno)ove è possibile osservare lo spettacolo dei daini al pascolo in una vasta prateria in cui è vietato l'accesso all'uomo e con il vantaggio di non essere attaccati dai tabanidi che ovviamente preferiscono i daini.

Sono assolutamente da evitare le concentrazioni di animali selvatici e domestici,specie in vicinanza di luoghi umidi,perchè ciò si accompagna alla diffusione di Ixodidi e Tabanidi.Quando ciò è inevitabile bisognerebbe poter proibire l'accesso a certe zone almeno in certi mesi dell'anno corrispondenti ai picchi stagionali di specie moleste o vettrici.

In definitiva ci sembra chiaro che una precisa conoscenza tassonomica e biologica di tutti gli artropodi ematofagi di un parco è una condizione indispensabile per garantire un buon controllo della situazione sanitaria relativa sia all'uomo che agli animali domestici o selvatici.

Ringraziamenti

Ringraziamenti sono dovuti alla Direzione del Parco di "Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli"per la fiducia accordata al nostro gruppo di ricerca secondo accordi presi con l'Istituto Superiore di Sanità. Un ringraziamento particolare va alla Dott.Sabatini per aver riveduto e corretto le nostre diagnosi sui Culicidi ed ai tecnici G.Dell'Uomo e C.Lezzerini per la loro solerte collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

1. CAMICAS,J.L. 1978. Conception actuelles sur l'épidemiologie de fièvre boutonneuse dans la Région Ethiopienne et la Sous-Région Européenne Méditerranéenn. Cah.O.R.S.T.O.M. Sér.Ent.méd.Parassitol.,Paris,13:229-232.
2. CORTI,R. 1955. Ricerche sulla vegetazione in Etruria.X.Aspetti geobotanici della selva costiera,la selva pisana in S.Rossore. Nuovo gior.bot.ital. 62:75-262.
3. KHOURY,C. & STELLA,E. 1984. Sulla presenza di Rhipicephalus pusillus nella Tenuta di S.Rossore. Riv.di Parassitol. 45 in corso di stampa.
4. RIVOSECCHI,L.,KHOURY,C.,CAVALLINI,C. & STELLA,E. 1979. Artropodi ematofagi delle aree naturali da proteggere.III.Lipoptena cervi(Dipt.Hippoboscidae)ed altri artropodi(Ixodidae)associati a daini e caprioli nella Tenuta di Castel Porziano. In:Atti VIII Simposio nazionale sulla conservazione della Natura.Bari,26-28 Aprile 1979.Cacucci (Ed.).Bari.
5. RIVOSECCHI,L. & STELLA,E. 1980. Contributo alla conoscenza dei Tabanidi di Castel Porziano. In:Atti XII Congresso nazionale di Entomologia.Roma, 5-9 Novembre 1980. Tip.Sticca (Ed.).Roma.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 127-128

LOTTA CONTRO GLI ARTROPODI E SALVAGUARDIA DELL'AMBIENTE

G. Saccà

E' lecito parlare di disinfestazione nelle aree protettive? In verità, questo problema non si dovrebbe nemmeno porre , particolarmente in certi casi (riserve naturali, integrali, ecc.). E' anche vero che non tutti i parchi e le riserve naturali sono fatte allo scopo unico di conservare la natura: alcuni sono fatti, per così dire, "ad uso e consumo" dell'uomo e questo concetto, purtroppo, è in molti casi esasperato. Ad esempio, non è difficile assistere, in qualche parco regionale ad episodi come imponenti manifestazioni di abusivismo edilizio, cospicui depositi di immondizie, disinfestazioni "selvagge", libera caccia, ecc.

Ci si chiede: è lecito e ammissibile pensare ad una disinfestazione chimica? La risposta è, in linea di massima, negativa, dato che anche gli artropodi ematofagi fanno parte della biocenosi e quindi andrebbero rispettati. Tuttavia, si potranno ammettere delle eccezioni, a seconda del tipo di riserva o di "zona protetta" di cui trattasi e anche del tipo di intervento suggerito.

Ricordiamo che la classificazione delle "riserve naturali" è abbastanza complessa, come si può dedurre da un recente lavoro di Mario Pavan (1). Si va dalle riserve integrali dove tutto deve essere conservato com'è e dove financo i visitatori non sono ammessi, ai parchi nazionali, dove lo scopo preminente è la conservazione della natura, ma è ammesso l'ingresso del pubblico per ragioni educative e, infine, ai così detti parchi regionali con preminente funzione educativo ricreativa e dove la conservazione dell'ambiente rimane ma ... in via secondaria.

Da non dimenticare poi, quanto ci ha detto oggi Rivosecchi nella sua relazione sul Parco Nazionale di Migliarino, a proposito di conflittualità tra interessi di vario tipo quali:

a) interessi di tipo naturalistico-conservazionistico;
b) interessi di tipo turistico-economico-produttivo.

Comunque se si dovrà, per ragioni che vedremo, prendere in considerazione un intervento di qualsiasi tipo, bisognerà fare molte accurate considerazioni prima di stabilire il modo di agire e decidere come, quando e in qual caso intervenire.

Anzitutto, bisogna considerare il tipo di "danno" ricevuto dall'uomo e da parte degli artropodi in questione. Questo "danno" si può limitare alla molestia saltuaria, giungere alla molestia grave e può terminare con il pericolo di trasmissione di malattie. Ricordiamo che gli artropodi in questione sono per lo più ditteri volatori (Culicidi, Simulidi, Ceratopogonidi, Psicodidi, Muscidi, Tabanidi, Ippoboscidi, ecc.) o Acari (Ixodidi, Trombicule, ecc.) e altri ancora.

Vi sono casi in cui la sola molestia assume un aspetto grave, come nell'attacco di certe zanzare (Aedes caspius, Ae. vexans), che al tramonto assalgono l'uomo a miriadi con migliaia di punture, per cui si può giungere a stati febbrili e a reazioni anafilattiche.

In determinati casi, non possiamo sottovalutare il rischio di trasmissione di arbovirus, febbre bottonosa, malaria (?) ecc.

Prima di giungere all'impiego di qualunque tipo di aggressione nei confron-

ti dell'artropoda, specie se il danno si riduce alla sola molestia, è opportuno considerare la possibilità di ricorrere alla protezione meccanica (maschera o velo da apicoltore, stivali, guanti, ecc.).

Una discreta protezione può essere fornita anche dai repellenti. L'uso di questi prodotti, pur non costituendo un vero e proprio metodo di lotta, riduce la possibilità di contatto uomo/insetto minimizzando sia la molestia che il rischio di trasmissione. Chimicamente sono Ammidi, Immidi, Esteri, Lattoni, Alcoli; si usano direttamente sulla cute, su apposite giacche di rete, su reti sospese "a barriera" o, infine, nebulizzati nello spazio. Per maggiori dettagli, rimandiamo alla recente rivista sintetica di Fossati, Maroli, e Guandalini (2). Non dimentichiamo che anche le piretrine hanno un potere repellente spiccatissimo, impiegate come "zampironi", "spiralette" o mediante appositi erogatori, e non lasciano residui.

La lotta chimica, nei casi in cui potrà essere ammissibile, dovrà essere fatta con insetticidi a bassa tossicità, meglio se dotati di una certa selettività; comunque, è indispensabile che selettiva sia soproattutto la tecnica seguita , che deve tener conto della biologia delle specie da combattere. Ad esempio, nella lotta antilarvale contro le zanzare, trattare solo le raccolte di acqua risultate positive. Ricordiamo anche che, nei casi di emergenza, contro gli insetti volatori, si può usare il metodo dell'areosol a U.L.V. (ultrabasso volume), che non lascia residui tossici; si possono risparmiare buona parte degli insetti volatori erogandolo al tramonto, quando sono attive solamente le zanzare da distruggere.

Alcuni prodotti recenti permettono interventi altamente specifici. Si tratta di bacilli sporigeni (es. Bacillus thuringiensis) patogeni per le larve di certi gruppi, o di sostanze che agiscono con un meccanismo di tipo ormonale, inibendo lo sviluppo delle larve (metoprene, diflubenzuron, ecc.); essi si possono usare con molta tranquillità, essendo praticamente atossici (3).

Per concludere sono necessarie alcune considerazioni:

a) le misure suggerite e le relative precauzioni sarebbero consigliabili in tutti i casi di disinfestazione nell'uso civile e non solo nelle aree protette;

b) tutto ciò, purtroppo, non è facilmente realizzabile in Italia, dove il livello medio di molti disinfestatori è molto modesto e, per di più, c'è una grave carenza normativa.

BIBLIOGRAFIA

1. PAVAN, M. 1973. Riserve naturali italiane: situazioni e proposte di tutela dei poteri pubblici. Roma, Ministero dell'Agricoltura e Foreste. (Collana Verde, 31) pp. 1-76.
2. FOSSATI, F.P., MAROLI, M. & GUANDALINI, E. 1985. Repellenti contro gli insetti ematofagi: metodi per la valutazione dell'efficacia e del tempo di protezione. Rapporti ISTISAN 85/9: ISSN - 0391-1675.
3. MAJORI, G. 1983. Evoluzione dei mezzi e dei metodi per le disinfestazioni sanitarie. In: La disinfestazione negli ambienti di vita e di lavoro. Rapporto ISTISAN 83/62.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 129-136

IL PROBLEMA DEI CHIRONOMIDI (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) IN LAGUNA DI VENEZIA

U. Ferrarese & G. Ceretti

Comune di Venezia, Assessorato all'Ambiente

Riassunto. - Dal maggio 1983 il Comune di Venezia sta conducendo una ricerca per stabilire la composizione specifica e la distribuzione dei chironomidi nei bacini settentrionale e centrale della Laguna Veneta, dove essi sono causa di molestia per la popolazione.

Nel corso della fase di indagine generale (maggio-ottobre 1983) soltanto larve di Chironomus salinarius Kieffer vennero trovate nei campioni di benthos raccolti su tutta la superficie dei due bacini. Le densità larvali calcolate permisero di localizzare due focolai principali, che vennero campionati periodicamente secondo un nuovo reticolo di 34 stazioni. In questa seconda fase della ricerca, che è tuttora in corso, vennero osservate variazioni delle densità nello spazio e nel tempo.

Vengono avanzate e discusse alcune ipotesi sulle cause dell'abnorme crescita numerica di Chironomus salinarius in laguna di Venezia negli ultimi anni.

Summary (The problem of chironomids in the Lagoon of Venice). - Since May 1983 Venice City Council has been carrying out a research to determine the species composition and the distribution of chironomids in the northern and central basin of the Venice Lagoon, where they cause annoyance to the population.

During the first survey (May-October 1983) only Chironomus salinarius Kieffer occurred in the benthic larval samples collected all over the two basins. The larval densities assessed allowed to locate two main problem areas, which were sampled periodically following a new 34-station net. In this second stage of the research, which is still on, spatial and temporal variations of the densities were observed inside the two areas.

Hypotheses on the causes of the remarkable increase of C.salinarius population in the Venice Lagoon during the last years are put forward and discussed.

Introduzione

Gli interventi antropici avvenuti in laguna di Venezia negli ultimi 700 anni hanno agito modificando i rapporti tra i fattori generatori e trasformando i processi evolutivi naturali della laguna stessa. Schematizzando al massimo si può dire che in questo periodo sono stati ridotti gli apporti solidi e

liquidi delle acque continentali attraverso la diversione a mare dei fiumi più importanti e si è incrementata l'azione erosiva del mare attraverso l'approfondimento delle bocche di porto lungo la striscia litoranea, l'escavo di canali artificiali e numerosi lavori di interramento, arginamento e bonifica. In tal modo si è interrotta la naturale tendenza della laguna ad evolvere in senso continentale e si è andata via via favorendo una evoluzione in senso marino di questo ambiente (Fig. 1).

A fronte degli importanti risultati economici che gli interventi sopra ricordati hanno permesso di ottenere, si sono prodotti, soprattutto in questo secolo, alcuni effetti indesiderati, i più gravi dei quali sono rappresentati dall'aumento dell'ampiezza di marea con i connessi fenomeni di acqua alta nel centro storico e dai fenomeni di inquinamento imputabili allo sviluppo delle attività industriali insediate su aree sottratte alla laguna con lavori di interramento, al conseguente inurbamento delle aree circostanti, allo sviluppo del turismo ed all'uso dei fertilizzanti e pesticidi in agricoltura.

Nella direzione del ripristino e della "preservazione dell'unità ecologica e fisica della laguna" si muovono le indicazioni della legge speciale per Venezia (N. 171 del 16 aprile 1973) e gli "Indirizzi per il Piano Comprensoriale" (Consiglio dei Ministri, 27 marzo 1975) che prevedono tra l'altro la costituzione in laguna di un grande parco pubblico naturale, che tenda alla conservazione dell'ecosistema lagunare nel suo aspetto fisico e floro-faunistico non escludendo le tradizionali attività di pesca.

Nel contesto di una migliore fruibilità dell'ambiente lagunare si inserisce la risoluzione dei problemi delle abnormi fioriture algali di questi ultimi anni, col loro corollario di morie di pesci, e di quello delle molestie causate alla popolazione dai chironomidi, che costituisce l'argomento del presente lavoro.

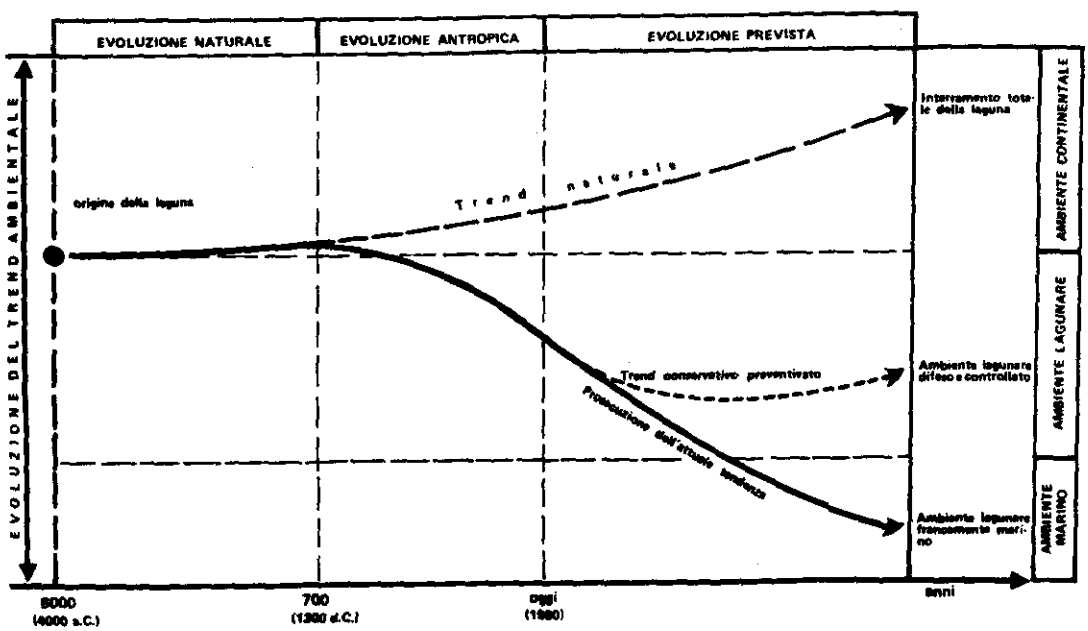


Fig. 1. - Origine ed evoluzione della laguna di Venezia, da (1).

Le larve acquatiche di alcune specie di questi ditteri sono note in letteratura perchè sono in grado di tollerare concentrazioni di ossigeno molto basse. Quando queste ultime sono così proibitive da non consentire la sopravvivenza di predatori e competitori, queste larve possono svilupparsi in numeri così straordinari da creare gravi molestie una volta diventati insetti adulti.

E' quanto si è verificato nella laguna di Venezia a cominciare dall'estate 1982. I problemi per la popolazione andavano da quelli della pulizia delle case invase da questi moscerini a quelli arrecati al sistema dei trasporti (molestie ai passeggeri, disturbi alla navigazione notturna dei natanti da parte dei chironomidi che, attratti dalla luce dei fanali, vi si posavano sopra oscurandoli, analoghi disturbi causati ai mezzi terrestri lungo il ponte che unisce Venezia alla terraferma da parte dei chironomidi che andavano a schiacciarsi contro i fanali ed i parabrezza o da quelli che si posavano sopra strade o rotaie, rendendole particolarmente scivolose, fastidi al personale delle ferrovie e dello aeroporto, oltre che ai passeggeri in attesa) , a quelli arrecati alle varie attività produttive presenti in laguna, soprattutto a quelle che si svolgono all'aperto (pesca, edilizia) ed a quelle connesse con il turismo ed il tempo libero (escursioni, campeggi ecc.).

E' da ricordare inoltre che oltre ai problemi del tipo sopra accennato la massiccia presenza di chironomidi ne può creare alcuni di tipo sanitario.

Questi insetti possono essere infatti vettori meccanici di agenti patogeni od una via di fuga dall'ambiente acquatico e da quello subaereo per sostanze pericolose. Inoltre l'esposizione continua alle larve (come succede per esempio ai produttori od utilizzatori di mangimi per pesci a base di queste ultime) o agli adulti (come succede a che vive in ambienti fortemente interessati da sciamature di questi insetti) può dar luogo nell'uomo allo sviluppo di una sensibilizzazione con sintomatologia allergica caratterizzata da asma, bronchiti, riniti od ipersensibilità congiuntivale e cutanea. Recenti ricerche hanno indicato nelle emoglobine delle larve di chironomidi importanti allergeni per l'uomo ed hanno mostrato che nell'insetto adulto sono presenti gli stessi determinanti antigenici che vi sono nelle larve, in grado di provocare gli stessi sintomi clinici (2,3,4).

Per individuare le cause dell'abnorme proliferazione dei chironomidi in laguna e per avviare in modo corretto la lotta contro di essi, il Comune di Venezia, con la collaborazione delle ULSS del comune, promosse una ricerca preliminare svoltasi nel periodo maggio-ottobre 1983. Queste ricerca aveva lo scopo di determinare la composizione specifica e la distribuzione di questi ditteri nei bacini settentrionale e centrale della laguna e di localizzare le aree a maggiore densità larvale. Sulla base dei risultati di questa prima fase della indagine è stata impostata una seconda fase costituita da campionamenti periodici limitati ai focolai larvali con lo scopo di seguirne l'evoluzione nel corso dell'anno.

Materiali e metodi

La ricerca dei focolai larvali si è svolta mediante prelievi di benthos in 33 siti di campionamento compresi nei bacini settentrionale e centrale della laguna (Fig. 2). Si tratta di una zona a forma di pentagono con una superficie di circa 100 Km^2. Lungo il suo lato occidentale si stende la zona industriale

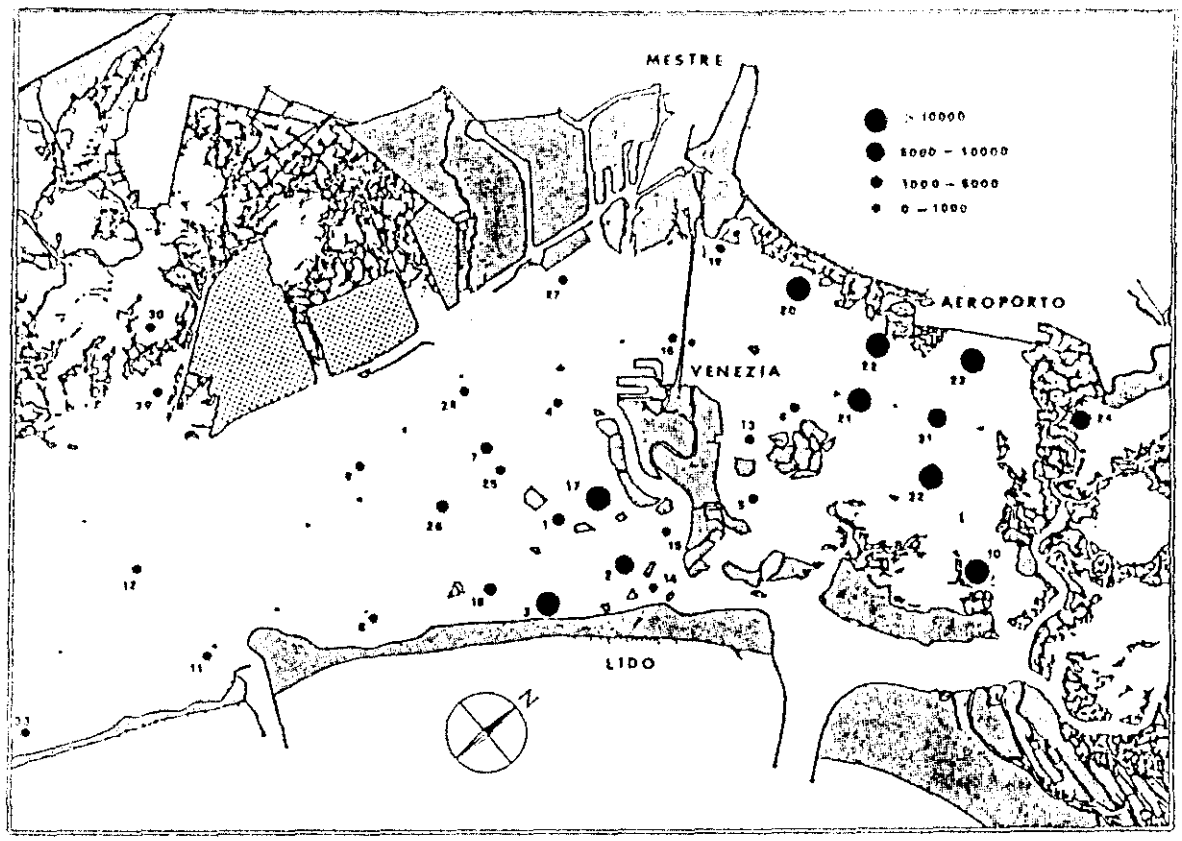


Fig. 2. - Densità larvali (3°+4° età) osservate nella prima fase dell'indagine.

di Marghera. Una parte del lato nord-occidentale è occupato dall'aeroporto. Sul lato nord-orientale si trovano le isole di Burano e Torcello, mentre il lato sud-orientale è rappresentato dal Lido.

Per la raccolta delle larve dei chironomidi venne usata una draga Van Veen con un'apertura rettangolare di 279 cm^2. Il materiale raccolto veniva filtrato attraverso un retino di 21 maglie/cm e fissato in formalina al 10%. Le larve raccolte venivano successivamente separate per età larvali e contate in laboratorio. Per il calcolo delle densità si è tenuto conto solo delle larve di terza e quarta età, in conformità con ricerche di altri Autori ed in considerazione del fatto che il retino usato ha maglie troppo larghe per consentire una completa stima delle larve di prima e seconda età.

Risultati

Sulla base dei caratteri morfologici sia delle larve che degli adulti, solo una specie, Chironomus salinarius Kieffer è risultata presente nella zona investigata. Ciò non deve sorprendere, perchè, come riportato in letteratura (5), C. salinarius può rimanere pressochè la sola specie nelle acque salmastre a più alta salinità. Questo dato sarà ripreso e approfondito nella discussione.

Durante la prima fase della ricerca i valori delle densità larvali di questa specie variavano anche notevolmente nelle diverse stazioni. Esse risultavano in almeno una occasione superiori a 1000 individui/m^2 in 16 delle 33 stazi-

ni esaminate e precisamente in almeno una occasione maggiori di 10000 larve/m^2 nelle stazioni 3, 17, 10, 20, 21, 22, 23 e 32, comprese tra 5000 e 10000 larve/m^2 nelle stazioni 2, 24 e 31 e comprese tra 1000 e 5000 larve/m^2 nelle stazioni 1, 4, 18 e 26 (Fig. 2). Questi risultati permisero di localizzare due aree a più forte densità larvale: una a sud-ovest della città, estendentesi da quest'ultima fino al litorale del Lido con una superficie di circa 11 km^2 e una a nord-est, estendentesi tra l'isola di Burano e l'aeroporto con una superficie di circa 21 km^2. Nelle altre parti delle zone investigate i chironomidi risultavano assenti o presenti in quantità trascurabile.

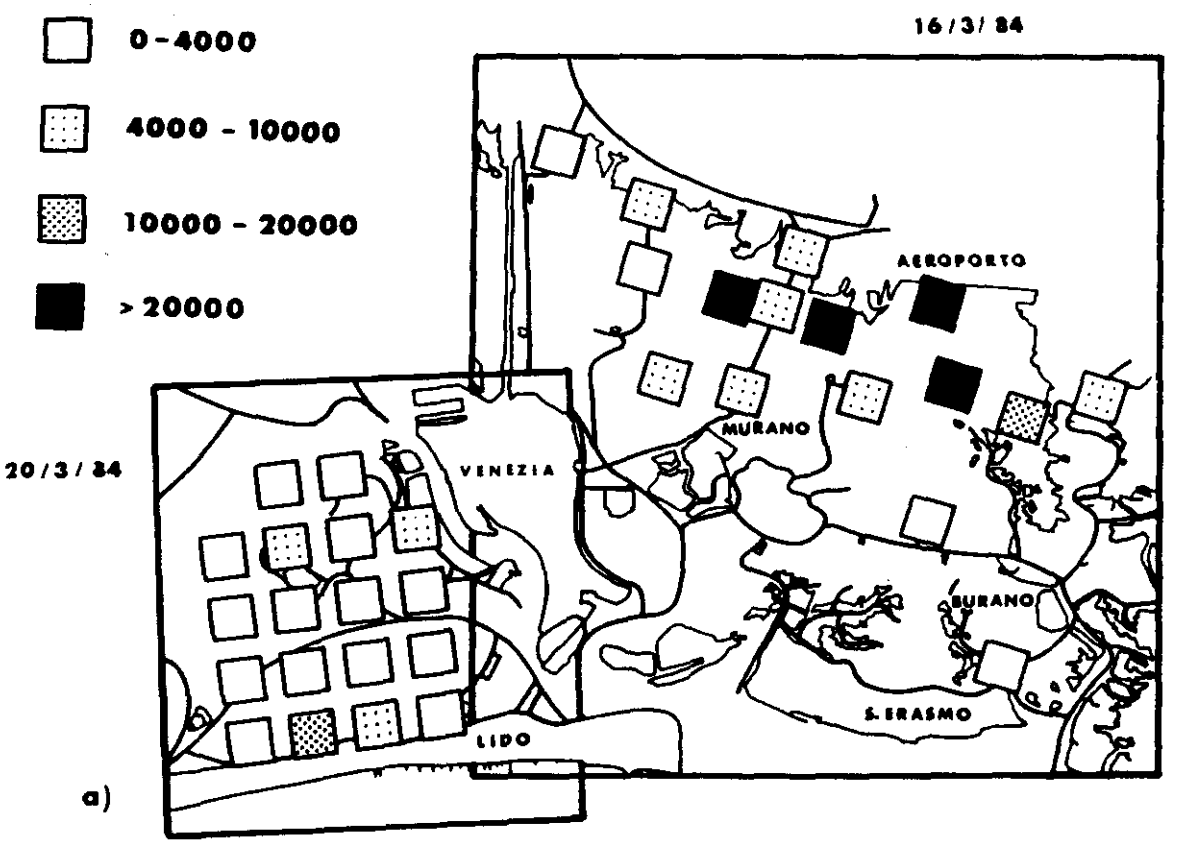
Come detto sopra, sulle due zone così individuate venne stabilito un reticolo di 34 stazioni su cui, a partire da novembre 1983, vennero effettuati i campionamenti periodici (Fig. 3).

I risultati di questa fase della ricerca sono rappresentati sommariamente in Fig. 3. In essa si possono osservare le densità larvali rilevate a metà marzo, alla fine di luglio ed all'inizio di settembre 1984. In particolare sono degni di nota tre fatti:

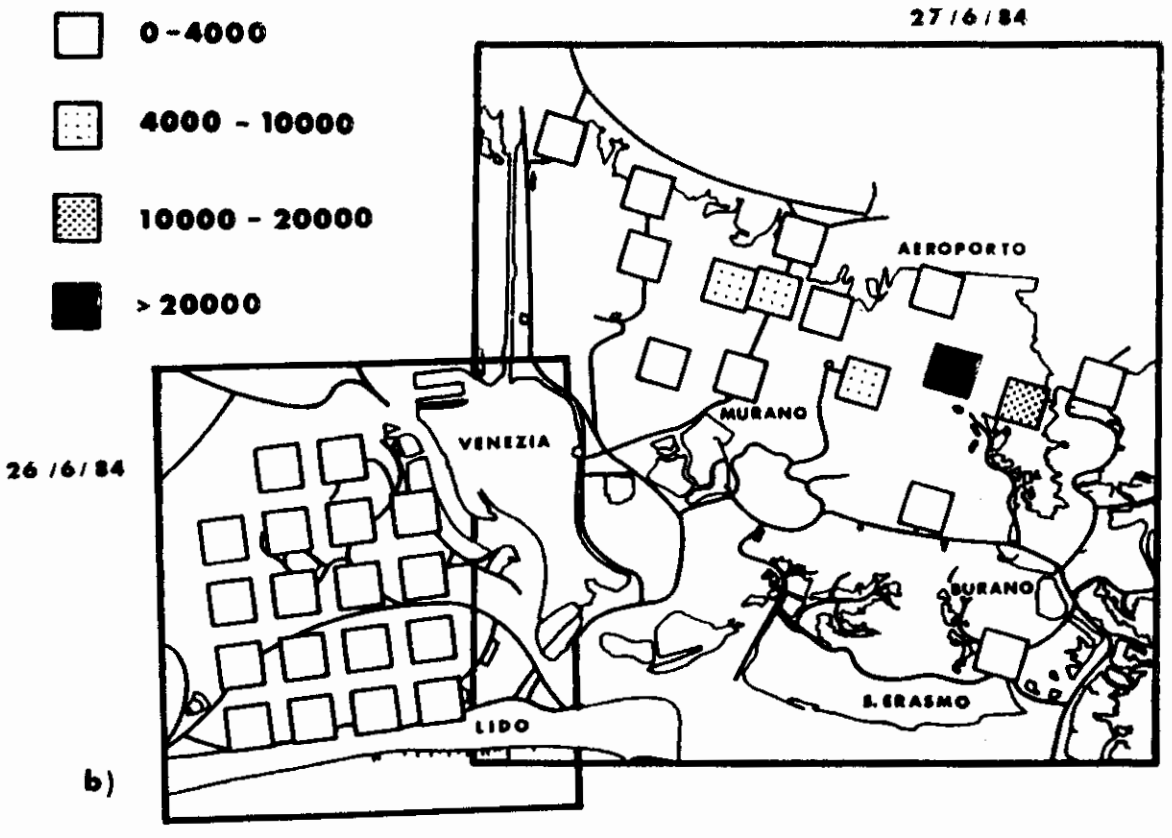
1) esistono all'interno dei due focolai delle zone con densità larvali decisamente superiori al resto delle stazioni;

2) si assiste ad una diminuizione generalizzata delle densità larvali, che raggiungono un minimo nel periodo centrale dell'estate, seguita da un recupero nel periodo successivo;

3) si notano degli " spostamenti" dei punti a maggiore densità larvale.



a)



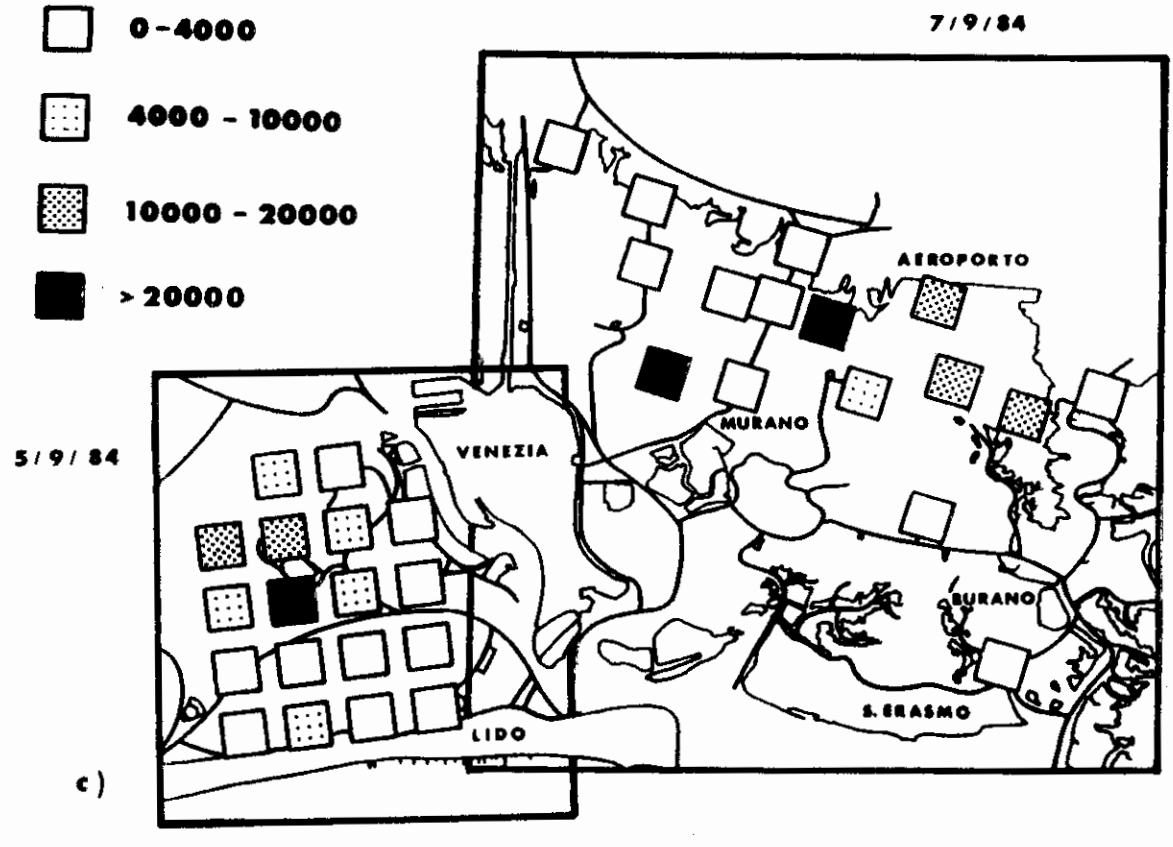


Fig. 3. - Distribuzione delle densità larvali rilevate nei mesi di marzo (a), giugno (b) e settembre (c).

Discussione

L'esclusiva presenza sul fondo della parte di laguna investigata delle larve di Chironomus salinarius potrebbe trovare spiegazione nel trend evolutivo della laguna verso un ambiente di tipo marino come accennato nell'introduzione, data la preferenza di questo chironomide per le acque con alto contenuto salino. Tale interpretazione non è però del tutto soddisfacente se si pensa che le massime densità larvali di questa specie sono state osservate nella fascia lagunare antistante l'aeroporto e le strisce barenicole ai lati di questo dove la salinità media annuale è tra le più basse che si registrano in laguna (16°/$_{\infty}$).

In tali condizioni di salinità è normale la presenza di più specie di chironomidi (5): ciò è quanto si verifica anche in zone della laguna settentrionale esterne ai due focolai dove, accanto a C. salinarius, si possono trovare due specie del genere Halocladius, H. variabilis ed H. sp.. L'abnorme pullulazione della prima specie sembra più verosimilmente attribuibile alle eccezionali capacità di resistere in condizioni di ipossia ed anossia che caratterizza i rappresentanti del genere Chironomus. La maggior densità larvale della specie in questione si verifica infatti in due zone su cui grava un notevole carico di apporti organici, provenienti dagli scarichi urbani di Mestre, veicolati dal Canale dell'Osellino (area a Nord-Est della città, antistante l'aeroporto) o della stessa città di Venezia (area compresa tra l'isola della Giudecca ed il Lido, caratterizzata da uno scarso ricambio idrico). E' da notare inoltre come proprio nelle aree a maggiore densità larvale di chironomidi si verificano con una certa frequenza abnormi fioriture algali seguite da morie di pesci.

L'esistenza di una relazione di causa-effetto tra inquinamento organico e crescita della popolazione di C. salinarius dovrà comunque essere verificata nel prosieguo della ricerca mediante la determinazione di appositi parametri chimici.

Per quanto riguarda il punto 2 dei risultati, la diminuizione primaverile-estiva delle densità larvali si può interpretare come un effetto dell'intensificarsi degli sfarfallmenti in questo periodo in seguito all'aumento della temperatura che comporta una riduzione della durata del ciclo vitale dell'insetto, mentre il seguente progressivo ritorno ai valori delle densità iniziali si può interpretare come dovuto alla regolare diminuizione della temperatura nel periodo seguente.

Di più difficile interpretazione appaiono infine gli spostamenti locali dei massimi di densità che sono forse il risultato di modifiche locali e temporanee di alcuni parametri ambientali.

BIBLIOGRAFIA

1. GATTO, P. 1979. La Laguna di Venezia - Conservazione dell'ambiente fisico - Subsidenza, idrodinamica lagunare e difesa dei litorali. Atti del XI Congresso della Società Italiana di Biologia Marina, Orbetello, 23 marzo 1979.

2. BAUR, X. 1982. Chironomid haemoglobin - a major allergen for humans. Chironomus 2(3): 24-25.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 137-144

IL "SISTEMA-UTM" DEL TERRITORIO ITALIANO ED ORGANIZZAZIONE DEL SUO IMPIEGO NELLA CARTOGRAFIA TEMATICA ITALIANA CONFORME AI MODELLI NAZIONALI ED EUROPEI

S.L. Distefano

Comitato Internazionale dell'European Invertebrate Survey (EIS/CIE/EEW), Dipartimento di Biologia animale, Università degli Studi, Catania

Riassunto. - Presentando il "sistema di rappresentazione cartografica UTM", con particolare riguardo al comprensorio geografico italiano, ed il progetto internazionale di Cartografia degli Invertebrati Europei (EIS/CIE/EEW), l'autore evidenzia il ruolo che la cartografia tematica normalizzata secondo tali universali modalità svolte per la razionale organizzazione delle ricerche sul territorio.

Summary (Grid - and cartography - UTM of Italy and their application to the processing of national and european patterns of thematic maps). - The author present the "UTM system", with special emphasys on the Italian geographic territory, and the international programme of European Invertebrate Survey (EIS/CIE/EEW), pointing out the role which standardized thematic maps play in the rational organization of any kind of researches which are bound to a particular geographical distribution.

Premessa

La "cartografia tematica" consente la rappresentazione e la cognizione di un territorio finalizzato particolarmente all'evidenza ed interpretazione di quanto ad esso è riferibile secondo specifici "temi". Essa svolge una fondamentale funzione per una razionale indagine sull'ambiente, ancor più significativa impiegando - come già diffusamente avviene in biogeografia - la rappresentazione cartografica con il reticolo chilometrico della proiezione Universale Trasversa di Mercatore (UTM) che, proprio per la caratteristica possibilità di designazione delle "stazioni" - universalmente individuabili e direttamente rappresentabili - in forma chiara ed efficace, offre ulteriori vantaggi pratici sia per la localizzazione di qualsiasi sito sulle carte geografiche, come per una generale semplificazione e meccanizzazione dei calcoli e dell'eventuale disegno.

La "cartografia tematica UTM" finalizzata a discipline applicative, oltre che tipicamente biogeografiche, costituisce un prezioso strumento per il lavoro di ricercatore interessato ai fatti ed ai fenomeni distribuiti sulla superficie terrestre, per evidenziare chiaramente le sintesi a compimento di ciascuno studio e - perfezionandone l'impiego - anche per evidenziare organicamente, mano a mano, ogni tipo di indagine e di utile correlazione fra qualsivoglia caratteristica imputabile ad un territorio o ad un particolare ambiente, nonché - dipoi - per rappresentarne opportunamente i risultati, sempre secondo modalità di larga ed univoca interpretazione per i ricercatori di tutto il mondo.

Il sistema cartografico UTM

Il "sistema-UTM" è costituito dalla rappresentazione cartografica in base al reticolato chilometrico della proiezione Universale Trasversa di Mercatore e dal complesso dei relativi criteri e procedimenti, unificati in tutto il globo. Esso - originariamente usato soltanto per scopi militari - a differenza del reticolo geografico (ad intervalli sessagesimali) adotta meridiani e paralleli ortogonali fra loro con suddivisioni decimali.

Secondo il "sistema-UTM" la superficie del globo è stata suddivisa in 60 fusi di 6° di ampiezza in longitudine (contraddistinti da un numero) ed in 20 fasce di 8° di ampiezza in latitudine (contrassegnate da una lettera), ben determinati meridiani e paralleli geografici vengono fatti coincidere con specifici meridiani e paralleli reticolari di universale riferimento che intersecandosi delimitano - nel planisfero - un'univoca area costituente la zona-UTM (intestata con il numero del fuso e la lettera della fascia) (Fig.1).

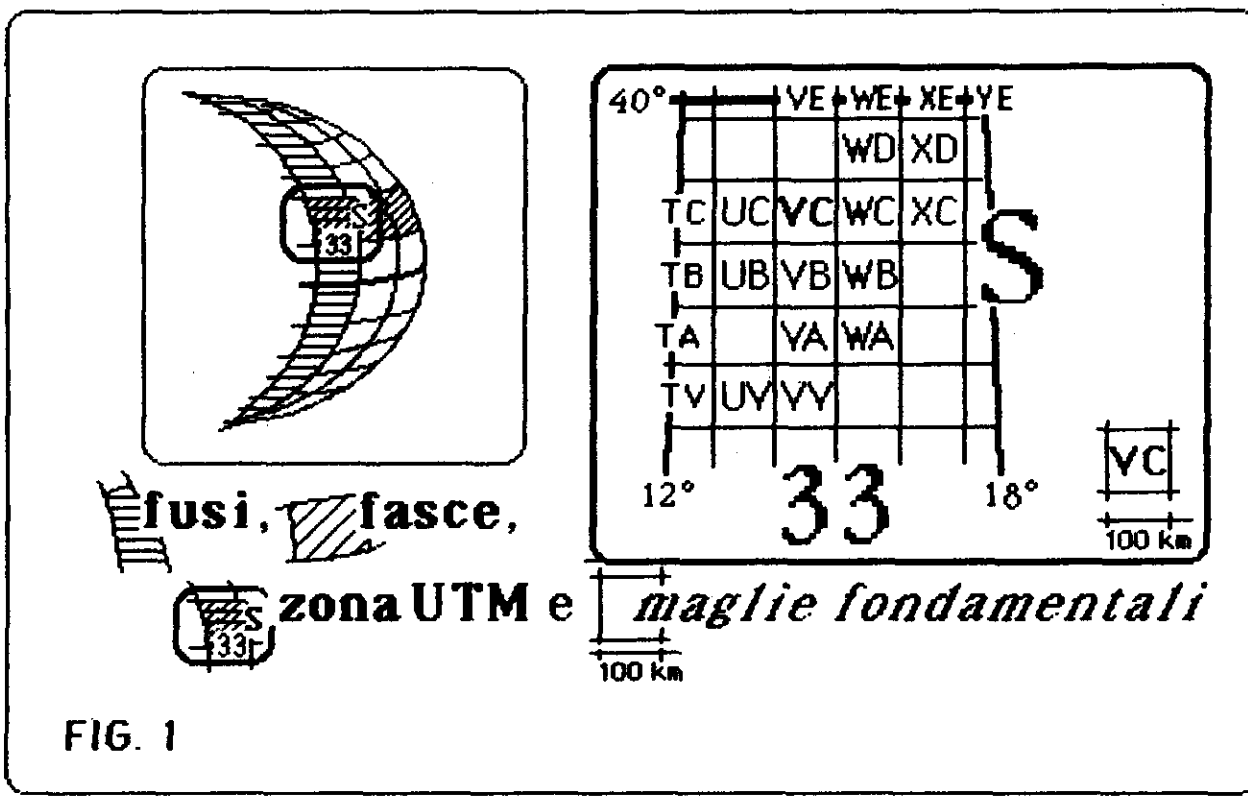


FIG. 1

In funzione della scala di rappresentazione delle carte corografiche e topografiche di base sono evidenziate maglie principali, tracciate in rapporto con i meridiani centrali dei fusi, originate staccando porzioni con lati paralleli di 100 chilometri (maglia fondamentale, (Fig.1) intestata con una convenzionale coppia di lettere) a loro volta divisibili in reticoli regolari di 10 Km di lato (particella Nazionale) (Fig.2), ovvero anche in 1 Km di lato (particella comunale) (Fig.4), che vengono intestate riferendosi ai valori delle relative coordinate cartesiane assumendo quale origine l'incontro del meridiano-reticolare-Ovest e del parallelo-reticolare-Sud di ciascuna maglia fondamentale. Per le suddivisioni del reticolo-UTM si è preferito il termine maglia anziché quello più corrente di "quadrato" per il fatto che tali suddivisioni lungo i margini di fusi contigui ("zone di compensazione"), per l'effetto del restringimento dei fusi verso i poli, non formano figure regolari.

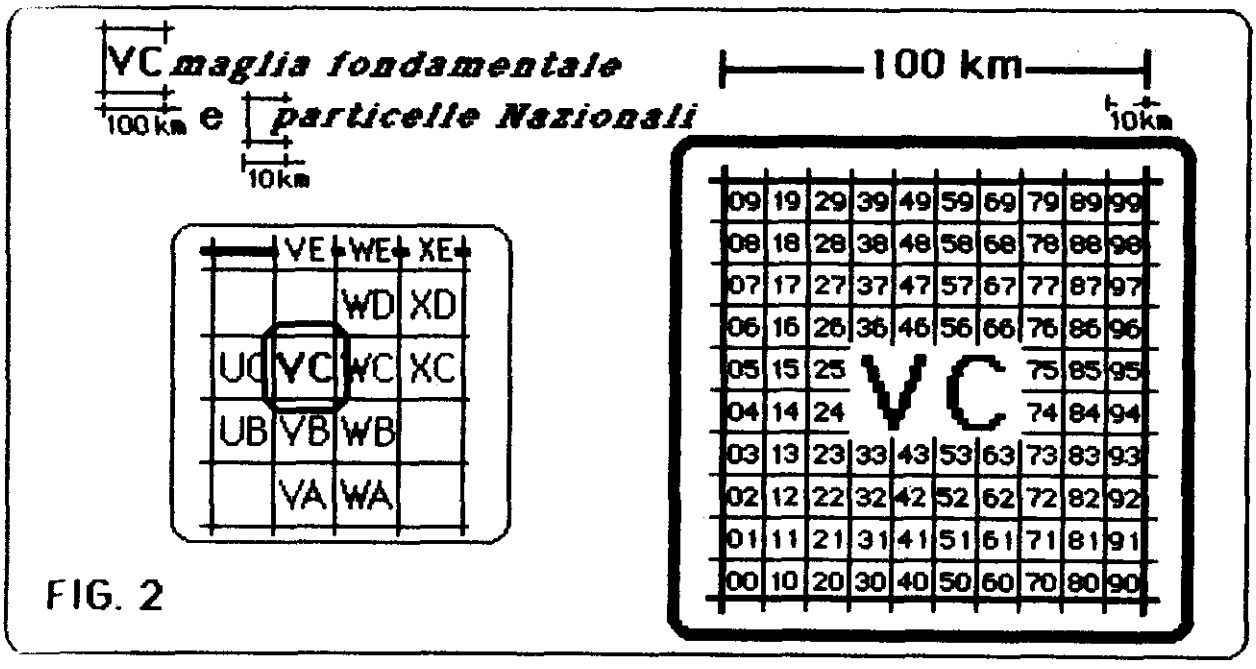


FIG. 2

Suddivisioni convenzionali applicate al "Sistema-UTM"

In relazione con l'accuratezza e la finalità di specifiche cartografie tematiche, si sono previste convenzionalmente anche ulteriori suddivisioni del reticolato-UTM staccando meridiani e paralleli reticolari di lunghezza regolare lungo gli assi della maglia di ordine subito superiore e originando maglie secondarie di 50 Km di lato (particella Europea (Fig.3) intestata con il numero convenzionale del programma "Flora Europea"), di 5 Km (particella Regionale) e di 2,5 Km (particella Provinciale), nonché di 0,5 Km di lato (particella Locale) (Fig.4), intestata con opportune lettere o coppie di lettere che le identificano secondo soluzioni originali ed organici criteri (Distefano 1973--1978) che evitano equivoci od ambiguità e sono in grado di ottimizzarne tutta la gestione, anche per l'uso del computer.

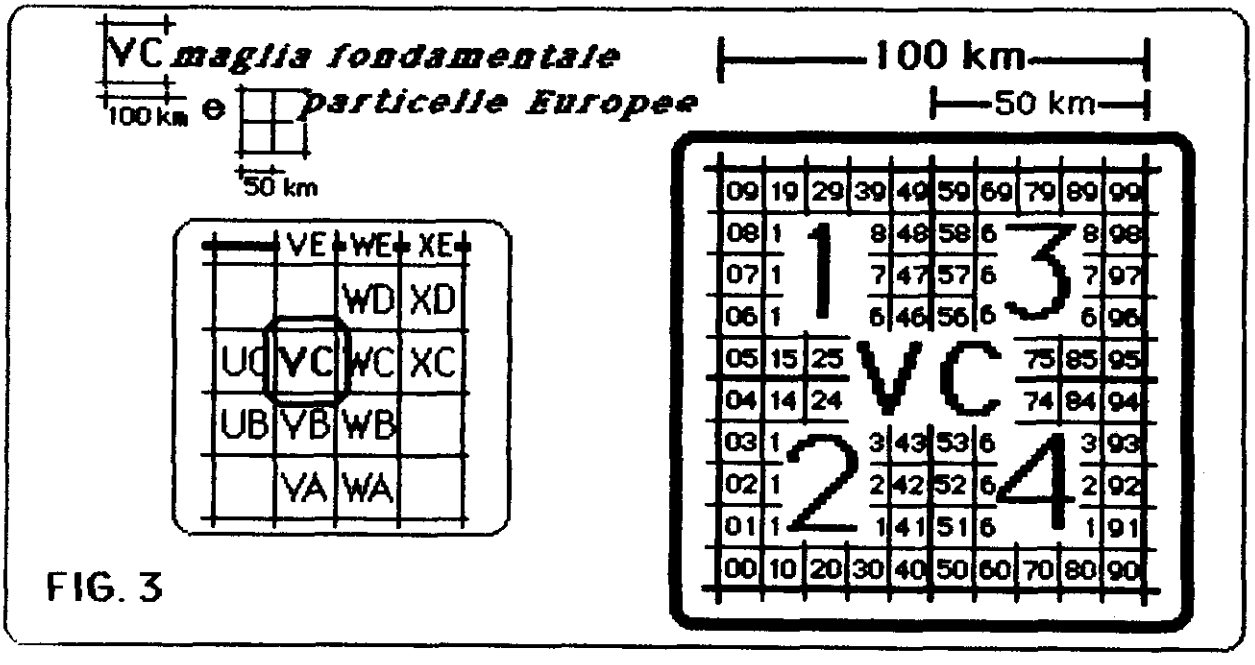


FIG. 3

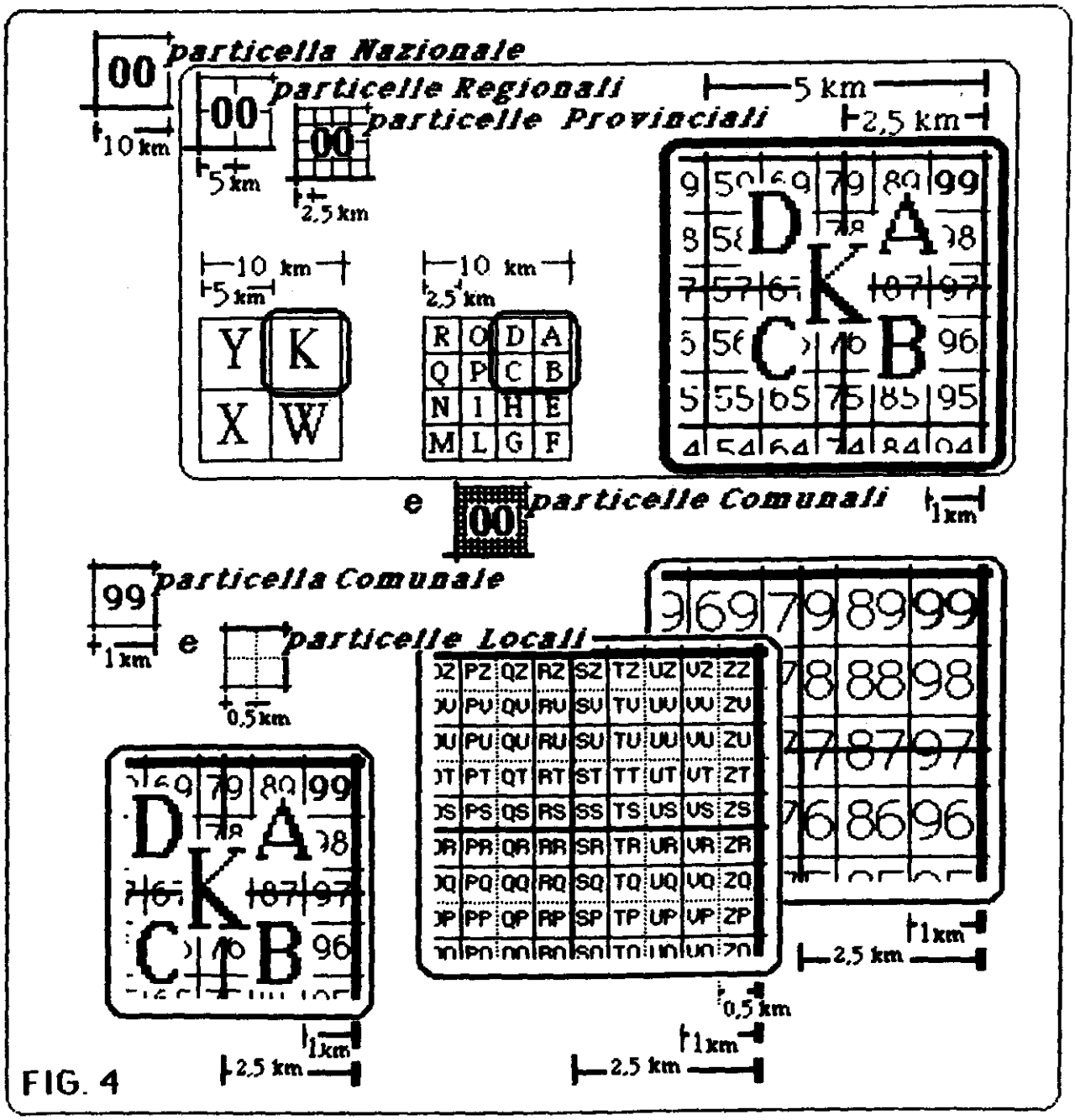


FIG. 4

A ciascuna delle maglie è, allora, associata una precisa notazione convenzionale - relativa alla loro preordinata intestazione - che individua ogni singola stazione da rappresentare cartograficamente e che predispone e agevola la redazione di carte tematiche-UTM normalizzate alle risoluzioni Europea, Nazionale, Regionale, Provinciale, Comunale e Locale.

La notazione-UTM, differenziata nella varie risoluzioni con distinte formulazioni via via più complete circoscrivendo il territorio in esame, è espressa tramite sigle - insite nel "sistema-UTM" o propriamente adottate in base a criteri sempre organici ed univoci - ognuna delle quali costituisce un preciso e complessivo riferimento, riscontrabile ed intellegibile in ogni parte del mondo. Essa rappresenta l'unità operativa e di correlazione che identifica ciascuna stazione - come ogni tipo di fenomeno distribuito - alla più significativa risoluzione utile agli obiettivi di una cartografia tematica.

Il "sistema-UTM" del territorio italiano

Presentando l'ancora inedita carta-UTM fondamentale d'Italia ed esponendo tutti i dati e le informazioni essenziali ad essa attinenti - che, sebbene limitatamente agli elementi significativi per il nostro tema, sono il risultato di precedenti finalizzati studi, tecnicamente più curati e circostanziati - si è concretata finalmente la redazione compiuta e organica di quella cartografia-UTM d'Italia rigorosamente conforme alla reale situazione del "sistema-UTM" del nostro territorio.

Il comprensorio geografico italiano - fatto coincidere esclusivamente coi limiti amministrativi nazionali - riguarda l'area compresa fra ∿6° e ∿19° di longitudine Est da Greenwich e fra ∿35° e ∿48° di latitudine Nord.

Il "sistema-UTM" relativo - come schematicamente presentato nella Tab.1(a), interessa i fusi 32, 33 e 34 (rispettivamente entro ∿6° e 12°, fra 12° e 18° e - per meno di un grado - oltre il 18° di latitudine) e le fasce S e T (separate dal parallelo geografico di 40° di latitudine) che vengono a circoscrivere così le zone-UTM 32S, 32T, 33S, 33T, 34S e 34T. La Figura mostra il territorio alla "risoluzione continentale" o "europea" evidenziando le 221 particelle Europee di 50 Km di lato in seno alle quali esso è compreso; la superficie del globo che riguarda l'Italia è rappresentata "dischiusa" lungo il parallelo reticolare più meridionale per evidenziare meglio sia i fusi-UTM contigui e le stesse "zone di compensazione" entro cui sono ascritte.

Le maglie fondamentali di 100 Km di lato del territorio italiano (80 in tutto, 24 delle quali appartenenti alle "zone di compensazione") sono ivi indicate con le proprie intestazioni convenzionali UTM e possono anche agevolmente ricavarsi i coinvolgimenti di ciascuna nelle relative zone-UTM in particolare la zona 34S è rappresentata da una piccolissima porzione della maglia fondamentale BK, al disotto dei 40° di latitudine e la 34T interessa l'ulteriore limitata porzione della stessa maglia BK insieme alla BL (in realtà ridotta alla sola particella Nazionale di "notazione" BL 40); tutte ricadenti nella "zona di compensazione" del fuso 34.

Le particelle Nazionali di 10 Km di lato sono complessivamente 3561, 608 delle quali appartengono alle "zone di compensazione" che ne coinvolgono 137 con una progressiva riduzione della superficie, procedendo verso Nord, lungo i meridiani di separazione tra i fusi. La parte continentale dell'Italia comprende 2870 particelle Nazionali, la Sardegna 313 e la Sicilia 345, con le rispettive isole circostanti.

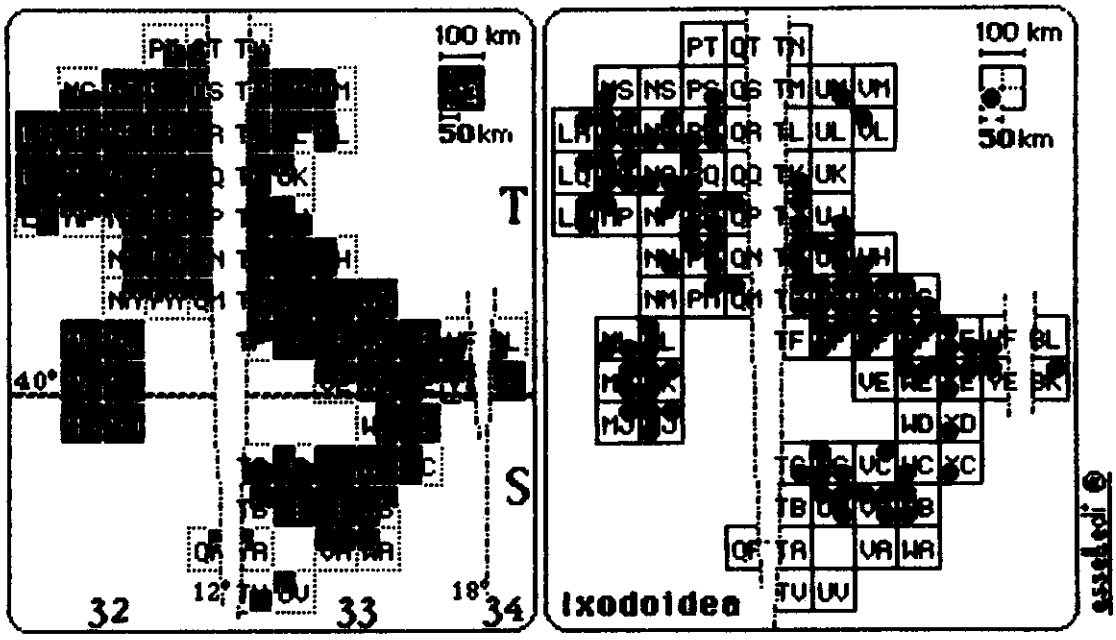
Questi elementi sono già ampiamente validi per operare le opportune scelte di strumenti e metodi per impostare, adeguatamente, specializzati sistemi informativi computerizzati o tradizionali e per organizzare ogni tipo di applicazione specifica; come pure per sviluppare le stesse operazioni di cartografia alle varie convenienti scale fornendo una rappresentazione tematica-UTM, così come è utile per le singole ricerche e per contribuire ai programmi di lavoro ed alla centralizzazione dei dati nazionali ed europei.

Il Progetto di Cartografia degli Invertebrati Europei

Nel 1969, John Heath (Monks Wood, GB) e Jean Leclercq (Gembloux, B)(1) suggerirono e propugnarono, auspicando una larga cooperazione europea, la redazione normalizzata di carte tematiche di distribuzione faunistica che rispondesse a precisi ed universali schemi operativi - relativamente all'acquisizione di informazioni, oltre che all'edizione di specifici "Atlanti" - e che conseguisse risultati omogenei e diffusamente utilizzabili da ogni ricercatore.

Su quelle indicazioni di base si avviò il progetto internazionale di Cartografia degli invertebrati Europei (noto come European Invertebrate Survey/Cartographie des Invertebres Europeens/Erfassung der Europaeischen Wirbellosen).

Tabella 1



Gli obiettivi principali del programma EIS/CIE/EEW prevedono sia la redazine di archivi di dati zoogeografici attendibili, da utilizzare per operazioni cartografiche ed elaborazioni statistiche, sia la pubblicazione e interpretazione di carte di distribuzione con reticolato UTM di 50 Km di lato (per le informazioni a livello europeo) e di 10 o di 5 Km di lato (per tutti i territori sufficientemente indagati). La meccanizzazione delle operazioni - non solo cartografiche - alla quale l'UTM propriamente si presta, fu già un elemento fondamentale e trascinante per l'avvio del progetto che si è andato potenziando parallelamente ai nuovi sviluppi ed agli incentivanti risultati scaturiti dall'evoluzione tecnologica ed anche dalla generale diffusione dell'informatica. Fino ai nostri giorni l'organizzazione dell'EIS/CIE/EEW ha raccolto l'adesione di un numero sempre crescente di istituzioni, studiosi e specialisti (i membri del comitato rappresentano oggi 25 nazioni europee).

Molteplici sono ormai le ricerche che, propriamente - o più liberamente - organizzate secondo tali principi e metodi, hanno portato validi contributi al progetto e particolarmente all'edizione delle attuali diverse migliaia di carte - che non riguardano solo gli invertebrati - raccolte e distribuite in specifici "Atlanti provvisori" (di Belgio, Gran Bretagna, Francia, Irlanda, Germania Federale e Saarland, Lussemburgo, Romania ed Olanda) od alla realizzazione di altre opere (specialmente italiane). Gli obiettivi più probabili ed imminenti porterebbero da un lato una serie di iniziative e di censimenti a livello europeo per la realizzazione di Atlanti europei alla "risoluzione continentale" (con inquadramento nelle maglie di 50 Km di lato) di alcuni gruppi sistematici di particolare interesse e significato.

La partecipazione italiana, già sensibile fin dalle "schede" manuali dell'antesignano "Schedario centrale della fauna appenninica, Museo civico di Storia naturale di Verona", ha portato contributi originali riguardo l'organizzazione e normalizzazione delle operazioni di base, l'applicazione di archivi e carte di distribuzione su schede perforate a selezione e correlazione manuale o elettromeccanica, la strutturazione di "data-base" geografici-faunistici prevedendo e utilizzando elaboratori elettronici (2-5), l'indagine geografica e cartografica del "sistema-UTM" di comprensori del bacino mediterraneo e dell'Euro-

pa, la preparazione e la redazione delle rappresentazioni tematiche nazionali e regionali di alcuni gruppi animali e - più recentemente - riguardo il congeniale impiego di sistemi informativi computerizzati (come lo specifico System of Localities Device, che perfeziona ed automatizza la gestione delle informazioni corologiche e tutte le operazioni cartografiche che precedono e comprendono la redazione delle carte di distribuzione-UTM), (6-8). Oggi, l'impiego di "microcomputers" distribuiti con queste speciali procedure, si avvia a soppiantare sia le - pur pratiche - schede perforate manuali, come le gravose strutture di elaborazione centralizzata e permette l'interattività ed un facile rapporto operativo con i propri archivi oltre ad un più veloce e diretto scambio di dati ed informazioni fra i ricercatori.

Alcune iniziative di interesse propriamente parassitologico hanno riguardato l'ormai prossima definizione della cartografia nazionale UTM dei Ditteri Simulidi italiani, frutto della illuminata partecipazione e della preziosa collaborazione del Dott. Leo Rivosecchi, nonché l'elaborazione di un primo "Atlante nazionale-UTM" con le carte di distribuzione delle 32 specie di Zecche note per l'Italia in seno alle particelle Nazionali di 10 Km di lato, l'analitica redazione delle relative "schede tematiche regionali" con specifiche indicazioni varie, biologiche e di raccolta e la costituzione della conseguente "banca-dati"; disponibili oggi grazie al fondamentale contributo personale - ed in qualità di coordinatore del "Centro di identificazione e di informazione degli Ixodoidei d'Italia" - del Dott. Lorenzo Sobrero; offerto, oltre che apportando letteratura, indicazioni e reperti originali, con lungimirante disponibilità scientifica e umana (9,10).

La Tab.1 (b), mostra la rielaborazione della carta delle complessive distribuzioni degli Ixodoidei italiani con inquadramenti alla "risoluzione continentale" (in seno alle particelle Europee di 50 Km). Un siffatto piano di copertura delle stazioni di raccolta delle Zecche nel territorio nazionale - pur costituendo solo un esempio stringato - evidenzia insieme al ruolo di informazione, che generalmente un'esposizione sintetica può offrire, anche quelle finalità di analisi, comparazione e controllo che la cartografia tematica-UTM in particolare è in grado di poter rappresentare - pur solamente attraverso suggerimenti - nella sua qualità di relazione strumento per la ragionata indagine del ricercatore.

BIBLIOGRAFIA

1. HEATH, J. & LECLERCQ, J. 1969. European Invertebrate Survey/Cartographie des Invertebrates Europeens/Erfassung der Europaischen Wirbellosen: Prel. Not. Biol. Rec. Cent., Abbot Ripton & Fac. Sci. Agron., Gembloux.
2. DISTEFANO, S.L. 1975. Italian partecipation in the programme for the European Invertebrate Survey. (National Report). In: Proc. II Int. Symp. E.I.S., Abbots Ripton.
3. DISTEFANO, S.L. 1976. Un particolare modello di scheda perforata a selezione manuale utilizzabile per la cartografia animale. In: Atti X Congr. Naz. Ital. Entomol. Sassari.
4. DISTEFANO, S.L. 1979. Indicazioni per una partecipazione italiana al programma internazionale di Cartografia degli Invertebrati Europei. (Riassunto) In: Atti XLVI Conv. U.Z.I., Catania.
5. DISTEFANO, S.L. 1979. Cartografia-UTM ed organizzazione delle informazioni sulla distribuzione dei nematodi. In: Atti Giornate Nematologiche, Firenze. pp. 205-219.
6. DISTEFANO, S.L. 1984. Struttura di un "data-base" di tipo faunistico conforme ai modelli nazionali ed europei e configurazione di un adeguato "sistema informativo" con impiego del computer. (Progetto di lavoro: Compilazione di un catalogo delle "diversità faunistiche" della regione Emilia-Romagna. Prep. Studiografica Esselledi®, Catania.

7. DISTEFANO, S.L. 1984. UTM-cartography: data base, surveying and mapping by microcomputer. (A practical approach for making the European Invertebrate Survey programme). In: Workshop "Computer in Biogeography", Linz.
8. DI STEFANO, S.L. 1984. Il "sistema-UTM" per la cartografia tematica. In: Atlas Faunae Siciliae-Aves. Il Naturalista Siciliano. 9 (suppl.) (in corso di stampa).
9. SOBRERO, L. & DISTEFANO, S.L. 1982. Cartografia UTM delle Zecche d'Italia. Atlante tematico nazionale della distribuzione degli Ixodoidea. Prep. Studiografica Esselledi®, Catania.
10. SOBRERO, L. & DISTEFANO, S.L. 1982. Schede tematiche regionali della distribuzione delle Zecche italiane. Zecca, ospite, data, località e stadi di cattura. Prep. Studiografia Esselledi®, Catania.

TAVOLA ROTONDA

PROBLEMI E METODI DELLA PARASSITOLOGIA MOLECOLARE

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 147-152

PROBLEMI DELLA BIOLOGIA DI BASE DEI PLASMODI

E. Dore

Laboratorio di Biologia Cellulare - Istituto Superiore di Sanità - Roma

La malaria costituisce ancora a livello mondiale uno dei maggiori problemi sanitari; la popolazione esposta al rischio di questa malattia è un terzo della popolazione (i casi riportati, e quindi probabilmente sottostimati, ammontano a circa 200 milioni l'anno).

I metodi di lotta tradizionali diventano sempre meno efficienti a causa della resistenza delle zanzare agli insetticidi e dei plasmodi ai farmaci conosciuti.

Questa situazione ha stimolato grandi sforzi per la produzione di un vaccino, che non può essere ottenuto per via tradizionale nella quantità necessaria.

Ci sono quindi diversi gruppi coinvolti nel clonaggio, con le tecniche della ingegneria genetica, dei geni responsabili della espressione degli antigeni delle varie forme; degli sporozoiti (per prevenire l'infezione) dei merozoiti (per prevenire la reinvasione e quindi lo sviluppo della malattia) e dei gametociti (per prevenire la trasmissione della malattia con un vaccino che viene quindi detto "altruista").

I risultati notevoli ottenuti in questo campo hanno in qualche modo nascosto la carenza di conoscenze di base della biologia del plasmodio. Fino a qualche anno fa i protozoi parassiti non erano stati affatto studiati dai biologi molecolari, anche se rappresentano un sistema biologico affascinante per il differenziamento funzionale e morfologico cui vanno incontro nelle varie fasi del loro ciclo vitale.

Il plasmodio era considerato un eucariote solo sulla base di una divisione chiara tra nucleo e citoplasma. In letteratura sono riportate stime della quantità di DNA per nucleo largamente differenti tra di loro; la contaminazione dovuta al DNA dell'ospite rende infatti non esatte determinazioni vecchie, ma anche recenti (il nucleo della cellula ospite contiene circa 300 volte più DNA di quello del plasmodio). Riassumendo i dati relativi alla caratterizzazione chimico-fisica del genoma del plasmodio di diverse specie (umano: P. falciparum, delle scimmie: P. knowlesi, dei roditori: P. berghei e P. yoelii e degli uccelli P.lophurae) (1-11) si ottiene che la complessità genetica del plasmodio è di circa $1.5\ 10^7$ coppie di basi, non si hanno generalmente DNA satelliti e il mitocondriale (6, 10, 11) ha dimensioni maggiori (10, 11) di quello dell'ospite. Tranne il plasmodio delle scimmie, tutti gli altri hanno una composizione in basi di circa il 20% G+C; questo fa pensare che la capacità di codificare di questo DNA sia notevolmente inferiore a quella prevedibile in base alle dimensioni fisiche del genoma; probabilmente cioè le regioni codificanti occupano una minima parte del genoma stesso.

Nel nucleo del plasmodio non sono stati messi in evidenza nè i cromosomi nè strutture simili in alcuno degli stadi del ciclo; la comparsa di emifusi in giovani oocisti, suggerisce che possano essere presenti da 5 a 10 cromosomi.

Risulta difficile comprendere perchè non sia mai stata osservata una condensazione dei cromosomi e diventa pertanto legittimo domandarsi se la organizzazione del DNA sia come quella trovata in tutti gli eucarioti, in cui il DNA interagendo con gli istoni forma i nucleosomi. Risultati discordanti sono riportati in letteratura sulla presenza o meno degli istoni, ma risultati negativi possono essere sempre dovuti alla mancanza di condizioni sperimentali ottimali, mentre d'altro canto, risultati positivi possono sempre essere dovuti nel plasmodio a presenza di materiale nucleare dell'ospite. I nostri tentativi su materiale altamente purificato non hanno dato nessun risultato positivo nè per quanto riguarda il pattern nucleosomale dopo digestione con nucleasi micrococcica, nè per la presenza di proteine uguali o almeno simili agli istoni, nè per la ibridazione del DNA totale, digerito con enzimi di restrizione, con un probe contenente il gene dell'istone H4 sia del ratto che del riccio di mare. Il problema rimane pertanto irrisolto.

Il plasmodio durante tutta la fase ematica del ciclo è in forma aploide. Si assume generalmente che la meiosi avvenga subito dopo la formazione delle zigote, ma nessuno ha mai dimostrato che gli sporozoiti sono aploidi; l'analisi genetica è resa impossibile dalle difficoltà trovate nell'ottenere l'infezione con un singolo sporozoita; con tecniche di citofluorimetria noi abbiamo determinato il contenuto in DNA degli sporozoiti confrontandolo con quello delle forme intraeritrocitarie (eritrociti contenenti 1, 2, 3... parassiti). I risultati ottenuti dimostrano che il contenuto in DNA degli sporozoiti è praticamente identico a quello di un eritrocita contenente un singolo parassita e significativamente diverso da quello di un eritrocita contenente due parassiti e quindi quantità doppia di DNA.

Il parassita nel suo ciclo vitale va incontro ad una serie di differenziamenti il cui meccanismo è praticamente sconosciuto. La fase ematica è attualmente la più studiata e quindi la più conosciuta perchè è relativamente facile ottenere sia "in vivo" che "in vitro" (con l'introduzione delle colture) quantità di materiale purificato per studi biochimici, strutturali e di biologia molecolare. Il punto centrale dello sviluppo intraeritrocitario è il meccanismo con cui alcune cellule differenziano in gametociti, forme morfologicamente e funzionalemente molto diverse dalle forme del ciclo schizogonico.

Come dimostrato anche da noi (5) una singola forma del ciclo asessuato è in grado di ridar luogo all'intero ciclo: il genoma aploide di un merozoita contiene cioè l'informazione necessaria a originare sia il gametocita maschile che quello femminile. Il passaggio dalla riproduzione asessuata a quella sessuata avviene quindi senza il mantenimento di una linea germinale geneticamente stabile: le cellule vegetative del ciclo schizogonico sono i progenitori dei gameti che ovviamente sono a loro volta i progenitori delle cellule vegetative. Il passaggio da un tipo di riproduzione all'altro deve quindi essere programmato con precisione, altrimenti il ciclo vitale verrebbe interrotto. Se questo "programma" consiste in un riarrangiamento genomico, questo deve essere necessariamente un evento reversibile, per cui in qualche momento il genoma deve riassumere la configurazione originale (il momento ovviamente più probabile è la meiosi).

La produzione dei gametociti è un evento che può essere modulato da fattori esterni sia "in vitro" (13-15) che "in vivo". "In vitro", in coltura, sembra che l'instaurarsi di condizioni avverse alla riproduzione asessuata stimoli la produzione di gametociti quasi come preparazione per una condizioni di vita diversa. "In vivo" è ben noto che parassiti mantenuti attraverso passaggi nell'ospite vertebrato, senza la pressione selettiva introdotta dal passaggio nella zanzara, perdono la capacità di produrre gametociti.

Negli ultimi anni il nostro gruppo si è occupato di chiarire la dinamica e possibilmente la base molecolare di questo fenomeno nel tentativo di capire il meccanismo del differenziamento stesso. Per un periodo corrispondente a circa 120 passaggi di P. yoelii in topo (5) sono stati controllati i seguenti parametri: a)infettività per le zanzare (rilevata come formazione di oocisti nello stomaco della zanzara); b)presenza di gametociti identificabili

morfologicamente; c)caratterizzazione del genoma con cinetiche di rinaturazione. I risultati possono essere così riassunti:

1) La perdita della infettività per le zanzare segue una dinamica a molti eventi.
2) Forme morfologicamente identificabili come gametociti, sono ancora presenti in una popolazione che ha perso la capacità di infettare le zanzare, e scompaiono in tempi molto più lunghi.
3) C'è una correlazione positiva tra quantità di DNA ripetuto nel genoma (determinato mediante cinetiche di rinaturazione) e infettività dei gametociti.

Queste considerazioni ci hanno portato a suggerire l'ipotesi che una amplificazione genomica rappresenti un momento necessario nella maturazione del gametocita (5). Il fatto che i gametociti sono presenti anche in popolazioni non infettive conferma che la maturazione completa degli stessi è un processo diverso da quello del "commitment" iniziale come messo in evidenza da Ponnudurai et al. (1982) (16).

La nostra ipotesi di una possibile amplificazione genomica riguarderebbe quindi il processo di maturazione, l'attivazione di alcune delle molte funzioni che il gametocita deve espletare (exflagellazione del gametocita maschile, formazione dello zigote...) e non il "commitment" iniziale.

Questa ipotesi ha portato altri Autori a saggiare l'amplificazione di geni specifici, in particolare dei geni del ribosomale (17). Questi infatti sembrerebbero dei buoni candidati per l'amplificazione almeno nel caso dei macrogametociti. I risultati negativi ottenuti non permettono ancora di avere una prova diretta della nostra ipotesi. Si potrebbe ancora speculare sulla possibilità di riarrangiamenti genomici specifici nella regolazione di geni differenti nelle varie forme del ciclo o come base molecolare dei fenomeni di variazione antigenica riportati anche nei plasmodi (18), in analogia con quanto descritto nei tripanosomi. A questo proposito l'osservazione che riguarda il ritorno alla variante antigenica iniziale come risultato del passaggio attraverso la zanzara (19) è molto importante per l'idea già precedentemente formulata che i cambiamenti genomici, che avvengono nella fase vegetativa, devono essere annullati in qualche momento del ciclo per assicurare una stabilità genomica al parassita. Il momento ideale per questo è ovviamente la meiosi attraverso ad es. il meccanismo del crossingover ineguale.

Cercando di migliorare la comprensione della biologia di base del plasmodio della malaria siamo giunti a confrontarci con i problemi più importanti e affascinanti della biologia di base e ci siamo resi conto di quanto poco ancora si conosce di questo organismo che è così importante riuscire a combattere.

BIBLIOGRAFIA

1) BAHR, G.F. 1966. Quantitative cytochemical study of erythrocytic stages of P. lophurae and P. berghei. Mil. Med. 131: 1064-1070.

2) GUTTERIDGE, W.E., TRIGG, P.I.& WILLIAMSON, D.H. 1971. Properties of DNA from some malarial parasites. Parasitology. 62: 209-219.

3) KILEJIAN, A. 1975. Circular mitochondrial DNA from the avian malarial parasite P. lophurae. Biochim. Biophys. Acta. 390: 276-284.

4) DORE, E., BIRAGO, C., FRONTALI, C. & BATTAGLIA , P.A., 1980. Kinetic complexity and repetitivity of P. berghei DNA. Mol. Biochem. Parasitol. 1: 199-208.

5) BIRAGO, C., BUCCI, A., DORE, E., FRONTALI, C. & ZENOBI, P. 1982. Mosquito infectivity is directly related to the proportion of repetitive DNA in P. berghei. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 29-40.

6) GOMAN, M., LANGSLEY, G., HYDE, J.E., YANKOVSKY, N.K., ZOLG, W.J. & SCAIFE, J.G. 1982. The establishment of genomic DNA libraries for the human Malaria parasite P. falciparum and identification of individual clone by hybridization. Mol. Biochem. Parasitol. 5 : 391-400.

7) HOUGH-EVANS, B.R. & HOWARD, J. 1982. Genome size and DNA complexity of P. falciparum. Biochim. Biophys. Acta. 698: 56-61.

8) POLLACK, Y., KATZEN, A.L., SPIRA, D.T. & GOLENSER, J. 1982. The genome of P.falciparum. I: DNA base composition. Nucleic Acid Res. 10: 539-546.

9) DORE, E., FRONTALI, C., FORTE, T. & FRATARCANGELI, S. 1983. Further studies and electron microscopic characterization of P. berghei DNA. Mol. Biochem. Parasitol. 8: 339-352.

10) McCUTCHAN, T.F., DAME, J.B., MILLER, L.H. & BARNWELL, J. 1984. Evolutionary relatedness of Plasmodium species as determined by the structure of DNA. Science. 225: 808-811.

11) WILLIAMSON, D.H., WILSON, R.J.M., BATES, P.A., McCREADY, S., PERLER, F. & QIANG, B. 1985 Nuclear and Mitochondrial DNA of Primate malarial parasite Plasmodium knowlesi. Mol. Biochem. Parasitol. 14: 199-209.

12) CANNING, E.U., & SINDEN, R.E. 1973. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of P. berghei. Parasitology. 67: 29-40.

13) CARTER, R. & MILLER, L.H. 1979. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in P. falciparum in continuos culture. Bulletin of the W.H.O. 57: 37-52.

14) SMALLEY, M.E. & BROWN, J. 1981. P. falciparum gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 316-317.

15) MONS, B.& VAN DER KAAY, H.J. 1980. The effect of cryopreservation on gametocytogenesis of P. berghei: a preliminary report. Acta Leidensia. 48: 9-16.

16) PONNUDURAI, T., MEUWISSEN, J.H.E.Th., LEEUWENBERG, A.D.E.M., VERHAVE, J.P. & LENSEN, A.H.W. 1982. The production of mature gametocytes of Plasmodium falciparum in continuous coltures of different isolates infective to mosquitoes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 242-250.

17) CORNELISSEN, A.W.C.A., LANGSLEY, G., WALLIKER, D. & SCAIFE, J.G. 1984. Gametocytogenesis and ribosomal rRNA gene organization in the rodent malarias P. chabaudi and P. berghei. Mol. Biochem. Parasitol.

14: 165-174.

18) TURNER, M.J. 1984 Antigenic Variation in Parasites. Parasitology 88: 613-621.

19) McLEAN, S.A., PEARSON, C.D. & PHILLIPS, R.S. 1982 P. chabaudi: Antigenic variation during recrudescent parasitaemias in mice. Exp. Parasitol.: 54: 296-302.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 153-156

ASPETTI GENETICI E MOLECOLARI DELLA FARMACO-RESISTENZA IN SCHISTOSOMA MANSONI

L.Pica, D.Cioli

Istituto di Biologia Cellulare, CNR, Roma

Riassunto-E' stato studiato il meccanismo d'azione di farmaci del gruppo Icantone e Oxamniquina per quanto riguarda il loro effetto sulle sintesi macromolecolari e sulla sopravvivenza di Schistosomi tenuti in vitro o dopo trattamento in vivo dell'ospite.

Introduzione

L'identificazione di gruppi attivi nelle molecole di farmaci permette di raggruppare i composti in famiglie, (cosa importante in casi di farmaco-resistenza e di terapie associate) e di sintetizzare molecole che, pur mantenendo caratteristiche farmacologiche , siano più convenienti dal punto di vista di tossicità, somministrabilità e costo.

Un esempio ,da noi studiato, di farmaci schistosomicidi aventi lo stesso meccanismo d'azione ,è quello dell'Icantone e dell'Oxamniquina.Questi composti mostano tra di loro una serie di somiglianze strutturali e biologiche.

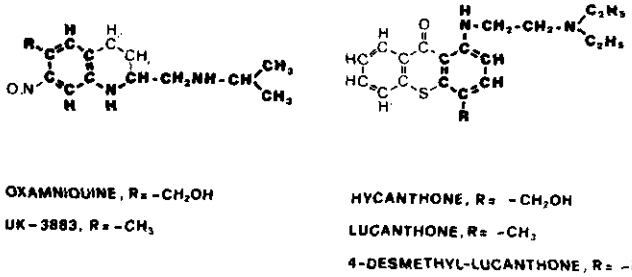


Fig.1.-Formule strutturali dei composti studiati.

Come si vede nella figura 1, le loro molecole planari portano una catena laterale alchilamino-etilamino in posizione para rispetto al gruppo critico $-CH_2OH$. Entrambi i composti , prodotti ossidativi di precursori (inattivi in vitro) aventi in R un gruppo metilico , sono attivi in vitro ed in vivo nel trattamento di infezioni di S.mansoni, ma non di S.japonicum; inoltre ceppi di schistosomi resistenti all'Icantone (selezionati in natura ed in laboratorio) mostrano una cross-resistenza nei confronti dell'Oxamniquina .

Materiali e Metodi.

I ceppi di Schistosoma usati,come pure i metodi di incubazione in vitro con precursori radioattivi ,sono stati precedentemente descritti,(1, 2).

Risultati e Discussione.

Dell'Icantone, farmaco storicamente più vecchio dell'Oxamniquina per l'impiego terapeutico e di cui sono note alcune caratteristiche chimico-fisiche e biologiche (interazione col DNA, mutagenicità e cancerogenicità), abbiamo studiato l'azione sulle sintesi macromolecolari nel sistema di schistosomi sensibili e resistenti dopo trattamento in vitro ed in vivo.
E' risultato che questo composto causa un blocco irreversibile delle sintesi di acidi nucleici(ed in minor misura di proteine) di schistosomi adulti; tale blocco é invece completamente reversibile (dopo rimozione del farmaco) nei sistemi resistenti: S.japonicum,ceppi Icantone-resistenti , forme immature di S. mansoni e cellule HeLa (considerate queste ultime come modello di cellule dell'ospite).Abbiamo messo cioé in evidenza una stretta correlazione tra inibizione irreversibile delle sintesi di acidi nucleici e morte del parassita.
Le stesse ricerche,estese all'Oxamniquina, hanno dato analoghi risultati, dando forza all'ipotesi,basata inizialmente soltanto sulla cross-resistenza dei due farmaci, secondo cui l'Icantone e l'Oxamniquina uccidono i parassiti con il medesimo meccanismo d'azione.

Per quanto riguarda l'aspetto genetico della resistenza , é risultato, dall'analisi della progenie (F_1 ed F_2)di incroci tra ceppi wild-tipe e ceppi resistenti all'Icantone , che la resistenza é un carattere autosomale recessivo(3). La recessività del carattere "resistenza" (deficienza di qualche attività), i tempi relativamente lunghi (2-3 settimane)necessari a questi farmaci per esplicare la loro azione mortale,pur dopo un breve contatto col parassita,ci hanno indotto a pensare ad una certa analogia con noti agenti cancerogeni e ad ipotizzare che l'Icantone (e l'Oxamniquina) non siano i veri agenti schistosomicidi ma che essi vengano trasformati nel verme sensibile(ma non nei sistemi resistenti,per motivi genetici o di sviluppo) nei composti attivi,dotati di attività alchilanti e capaci quindi di legarsi covalentemente alle macromolecole , in particolare al DNA, degli organismi.
Questa ipotesi trova forte supporto dall'uso di un derivato dell'Icantone,l'estere metil-carbamato, composto per il quale sono state messe in evidenza più spiccate caratteristiche antitumorali e maggiori capacità alchilanti rispetto all'Icantone. Abbiamo trovato infatti che il trattamento con questo estere causa un blocco irreversibile delle sintesi di acidi nucleici e,come atteso, causa la morte dei parassiti , non solo nei vermi sensibili ma anche in quelli resistenti all'Icantone.

Nella tabella 1 sono riportati i risultati,espressi come % del controllo, dell'incorporazione di uridina tritiata , due ore dopo trattamento in vitro con Oxamniquina (OXA), Icantone (HC) e Icantone metil -carbamato (HC-MC),di vermi sensibili e di vermi resistenti (ceppi Icantone-resistenti, vermi immaturi e S.japonicum).Nella stessa tabella sono parallelamente riportati i valori di sopravvivenza di vermi trattati nelle stesse condizioni .Come si vede,esiste una netta correlazione tra inibizione di incorporazione del precursore tritiato e morte dei vermi.

Altri esteri dell'Icantone(acetato, propionato ecc.) sono stati da noi saggiati ed é stata trovata una forte corrispondenza tra capacità alchilante e schistosomicida.

Grazie all'uso di molecole tritiate (ricerche in corso) ci proponiamo di dimostrare che l'Icantone si lega covalentemente alle macromolecole di parassiti sensibili ma non a quelle di forme resistenti, mentre l'Icantone metil-carbamato si lega alle macromolecole di entrambi.

Tabella 1. - Effetto dei farmaci sulla incorporazione di ^{3}H-uridina (I) e sulla sopravvivenza (S) degli schistosomi. Tutti i valori sono espressi come % rispetto ai controlli non trattati.

Schistosomi	OXA		HC		HC-MC	
	I	S	I	S	I	S
Sensibili	30	0	34	3	29	0
Resistenti	98	88	93	90	40	6
Immaturi	65	74	96		35	
S.japonicum	93		126		20	

BIBLIOGRAFIA

1. Pica-Mattoccia,L. & Cioli,D. 1983. Effect of hycanthone administered in vivo upon the incorporation of radioactive precursors into macromolecules of S.mansoni.Mol. Biochem.Parasitol.8:99-107.
2. Pica-Mattoccia,L. & Cioli,D. 1985. Studies on the mode of action of Oxamniquine and related schistosomicidal drugs. Amer.J.Trop.Med.Hyg.34:112-118.
3. Cioli,D.&Pica-Mattoccia,L. 1984. Genetic analysis of hycanthone resistance in S.mansoni.Amer.J.Trop.Med.Hyg.33:80-88.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 157-162

UN DNA SINCRONIZZATORE: IL KDNA DEI TRIPANOSOMI

P.A. Battaglia, C. Birago & M. Ponzi

Laboratorio di Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - I 5000-10000 cerchietti di DNA contenuti nell'unico mitocondrio dei kinetoplastidi sembrano non codificare nulla: non è mai stata isolata una proteina codificata da essi, non vengono tradotti nelle mini cells, sono estremamente eterogenei in sequenze di nucleotidi. Malgrado ciò la loro perdita produce dei mutanti diskinetoplastici non vitali. Qual'è allora la funzione dei minicircles? Noi ipotizziamo che servano a sincronizzare la replicazione del DNA mitocondriale con la replicazione del DNA nucleare in modo da impedire la perdita dell'unico mitocondrio dei Tripanosomatidi.

Summary. - The 5000-10000 DNA minicircles of the unique mitochondrion of kinetoplastides protozoa do not codify for any protein. The DNA of mini-circles is extremely heterogeneous in sequences and is not translatable into bacterial mini-cells. In spite of the loss of mini-circles lethal diskinetoplastic mutants are produced. What is the mini-circle function? We hypothesize that these mini-circles synchronize the replication of mitochondrial and nuclear DNA in order to prevent the loss of the only mitochondrion of Trypanosomatide.

Introduzione

Il DNA del kinetoplasto, l'unico mitocondrio dei protozoi parassiti tripanosomi, è la forma più "barocca" di DNA che si conosca. Esso è, infatti, un gigantesco gomitolo costituito da migliaia di "cerchietti" di DNA concatenati tra loro (dai 5 ai 10.000 per ogni kinetoplasto) nelle diverse specie, e da poche decine di grandi circoli di DNA con funzione di DNA mitocondriale dell'animale (1, 2).

Come è strutturato internamente e che funzione ha un oggetto biologico tanto strano?

Dalla parte della struttura

Le prime osservazioni al microscopio elettronico della gigantesca matassa del kDNA misero in evidenza che i cerchietti di DNA, pur così numerosi, erano però tutti uguali, in dimensioni, nell'ambito di una stessa specie (3).

Si pensò così che i 10.000 cerchietti si originassero, per replicazione, da uno solo e che la straordinaria amplificazione desse origine a cerchietti tutti uguali, in ultima analisi, nella sequenza.

Quando però fu possibile isolare e saggiare biochimicamente la matassa del kDNA, la sorpresa non fu piccola nel constatare che i cerchietti, tutti uguali al microscopio elettronico, apparivano uno diverso dall'altro, se digeriti con gli enzimi di restrizione (4).

Tutti uguali o tutti diversi? La soluzione poteva ottenersi solo isolando

singoli cerchietti in quantità sufficiente da permettere l'analisi biochim della sequenza nucleotidica, chiarendo così definitivamente, quale fosse la lo struttura.

E' quello che abbiamo fatto nel nostro Laboratorio con Marta Ponzi Cecilia Birago "clonando" singoli cerchietti del kDNA del T. lewisi con i meto ormai classici dell'ingegneria genetica e sottoponendo quindi un paio di ques cerchietti all'analisi delle sequenze nucleotidiche con il metodo di Sanger (5

La struttura dei cerchietti è quella che appare nella Fig. 1.

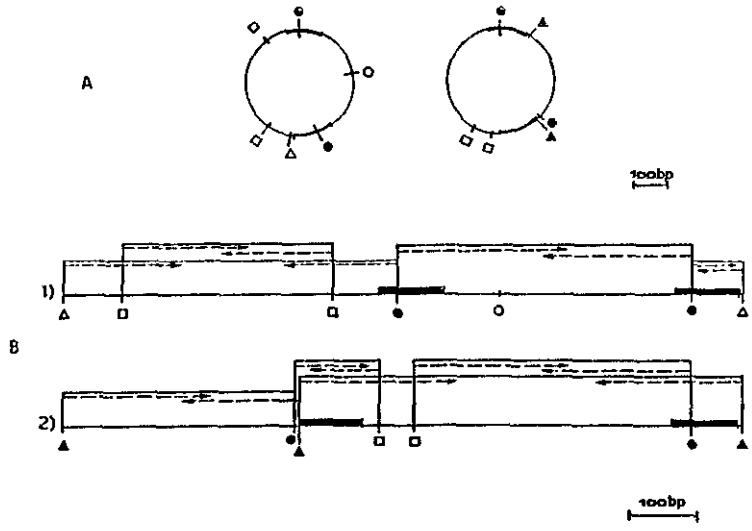


Fig. 1 - Struttura dei mini-circles dopo sequenza dei nucleotidi.
In tratto spesso, la regione costante (K); in tratto sottile, la regione variabile.
Minicircle BAM ed ECO.

Affacciate simmetricamente l'una all'altra appaiono, in ogni cerchietto, due regioni nucleotidiche che sono completamente uguali tra di loro, e che sono anche uguali nelle migliaia di altri cerchietti del kDNA del T. lewisi: abbiamo dato a queste regioni il nome di regioni costanti (K). Tutto il resto della sequenza appare profondamente variabile tra un cerchietto e l'altro.

Cosa avviene se si paragonano regioni costanti di cerchietti appartenenti a specie diverse la cui sequenza è stata fatta da altri autori, ad esempio, minicircles di tripanosomatidi, lontanissimi evolutivamente, come il nostro T. lewisi e la Leishmania tarentolae (6)? In seno alle regioni costanti appartenenti alle diverse specie si conserva un nucleo comune di sequenze (GGGGTTGGTGTAATA) fiancheggiato da due sequenze ripetute M(GGTGGGAC) e C(CAGGGTGG) delle quali l'una è l'immagine speculare dell'altra.

La permanenza di una regione nucleotidica identica in specie così lontane, suggerisce che a mantenerla sia stata una pressione selettiva così forte da ipotizzare una funzione comune e importante per tutti i Tripanosomatidi, localizzata nei nucleotidi della regione Super K: forse la regione che presiede alla replicazione dei mini-circles. Nel nostro, come in altri laboratori, si sta lavorando intorno a questa possibilità.

Dalla parte della funzione

L'approccio generale seguito per chiarire la funzione di un tratto di DNA è quello che parte dal presupposto che il DNA, qualunque questo sia, contenga un'informazione che, per essere espressa, viene trascritta in RNA e, nella maggioranza dei casi, tradotta in proteine.

Un primo approccio è quello quindi di dimostrare, nei Tripanosomi, un RNA sintetizzato dai mini-circles.

Nessuno è mai riuscito a dare una dimostrazione della presenza di un RNA

trascritto nei mini-circles, eccetto in un caso, mai ripetuto da altri (7).

Nell'impossibilità di dimostrare direttamente, nel Tripanosoma, la presenza di proteine espresse dai mini-circles, si può vedere di saggiare la capacità espressiva dei mini-circles in un sistema eterologo, ad esempio nei batteri, in cui sia più semplice mettere in rilievo una proteina espressa dai mini-circles.

Sia noi che Brunel abbiamo introdotto un singolo cerchietto nei batteri per trasformazione, per poi saggiare la presenza di proteine codificate dal mini-circle (8).

Per Brunel la biosintesi di una proteina non c'è, per noi c'è. Soltanto che è troppo lunga (19.000 dalton) per l'open reading frame trovata nei nostri cerchietti tanto da far supporre un artefatto prodotto dalla saldatura del veicolo (il plasmide) che ci è stato necessario per introdurre il cerchietto nel batterio.

Un mini-circle: un replicon

Un DNA che non ha altra funzione se non quella di replicarsi come si integra nel funzionamento della cellula?

I Tripanosomatidi posseggono un solo mitocondrio che non va perduto: infatti l'unico Tripanosoma che può farne a meno, il T. equiperdum, non è in grado di passare per un insetto vettore. Inoltre mutanti diskinetoplastici sono letali per gli altri Tripanosomi, e quello che è importante è che essi sono prodotti da farmaci che rendono asincrona la replicazione del mitocondrio con quella del nucleo. Allora perché il mitocondrio non sia perso, la fase S del kinetoplasto deve essere uguale a quella del nucleo S_N ed è ciò che realmente avviene (9). Ma come ottenere $S_N = S_K$ se il DNA del nucleo è 4 volte di più del DNA_K (2)? L'eguaglianza nei tempi di S_N e S_K è possibile se il numero dei replicon del DNA nucleare R_N è uguale al numero dei replicon del kinetoplasto R_K.

Il replicon è definito come unità capace di replicazione autonoma. In base a questa definizione ogni mini-circle corrisponde ad un replicon infatti: 1) Christine Brack ha dimostrato che ogni circolo ha la possibilità di replicarsi indipendentemente (10); 2) Kidane e anche noi abbiamo dimostrato, trasformando il lievito, che ogni sequenza saldata ai mini-circles è replicata come parte del mini-circle.

Allora se ogni mini-circle è un replicon R_K = 5000 numero dei mini-circles in un kinetoplasto. E R_N? $R_N = 6 \times 10^7 / 2 \times 10^4$ (numero di basi presenti nel nucleo dei tripanosomi al numeratore ed al denominatore lunghezza media di un replicon sempre in coppie di basi).

In definitiva $R_K = R_N$ infatti $5 \times 10^3 = 3 \times 10^3$.

La dimostrazione che ogni mini-circle rappresenta un replicon offre una spiegazione a tre proprietà comuni a tutti i mini-circles: 1) forma circolare 2) numero costante (in seno ad ogni specie) 3) dimensioni uguali (in seno ad ogni specie).

1) Replicon lineari sono variabili in numero e in dimensioni, la forma circolare mantiene l'identità di ogni singolo replicon.
2) Se variasse il numero dei mini-circles ad ogni replicazione, il DNA del mitocondrio non riuscirebbe a sincronizzare la sua replicazione con quella del nucleo.
3) Se variassero le dimensioni tra i diversi mini-circles varierebbe anche il tempo di replicazione di ciascun cerchietto.
   Inoltre, l'estrema variabilità della sequenza, con solo un tratto perennemente conservato, fa dei mini-circles una struttura ideale per un DNA senza geni in grado solo di replicarsi.

Con quale velocità si replicano i mini-circles

Si può trovare anche un altro modo, un po' indiretto, per dimostrare che ogni mini-circle è un replicon.

Dai lavori di Cosgrave (9) e dei Simpson (11) sappiamo che da un kinetoplasto se ne originano 2 in 60 minuti. In questo tempo i cerchietti del kDNA debbono essere duplicati dalla DNA polimerasi. La velocità di duplicazione dei cerchietti dipende dal tipo di DNA polimerasi usata.

Tra tutte le polimerasi i mini-circles dovrebbero usare quella mitocondriale arganello in cui sono rinchiusi. Vediamo se è vero.

Tabella 1. - Con quale velocità si replicano i mini-circles

	V = Kb/min	S_K	
Mitocondrio	0.05	60'	$3 \times 1 \times 10^3$
Eucarioti	0.5.5	60'	$30-300 \times 1 \times 10^3$
Batteriofago	5	60'	$300 \times 1 \times 10^3$
Procarioti	100	60'	$6000 \times 1 \times 10^3$

Dalla Tab. 1 può osservarsi che le polimerasi dei batteri e dei loro virus sono troppo veloci. Infatti, nel tempo in cui viene sintetizzata l'intera matassa del kinetoplasto esse sarebbero in grado di sintetizzarne una cento e mille volte più grande. La DNA polimerasi eucariotica, confinata nel nucleo, è anche essa troppo veloce di 10-100 volte. E' soltanto la DNA polimerasi del mitocondrio che ha una velocità adatta a completare la sintesi del DNA del kinetoplasto nel tempo giusto.

E' da notare che nel mitocondrio sono presenti dalle 200 alle 400 molecole di DNA polimerasi (12), solo poche di queste sono però attive, fatto questo che mantiene la velocità di sintesi nell'ordine del numero di replicon della Tab. 1.

Il calcolo teorico della velocità con cui dovrebbe replicarsi il DNA del kinetoplasto è in accordo così con l'ipotesi che ogni mini-circle sia un'unità di replicazione autonoma.

Conclusioni

Tutto è in favore così dell'ipotesi che il DNA del kinetoplasto assolva ad una funzione assolutamente originale: la sincronizzazione tra i tempi di replicazione del DNA mitocondriale e quello del nucleo.

Il kDNA si rivela così un oggetto biologico buono, non solo come bersaglio assolutamente specifico dei farmaci antitripanosomiaci, ma anche per pensare.

L'approccio ormai classico struttura-funzione della biologia moderna sembra qui non completamente soddisfacente se limitato allo studio di una parte (il Kdna) priva di funzioni se considerata isolata dal resto. La funzione del Kdna, di sincronizzare la replicazione del mitocondrio con quella del nucleo non sembra proprietà di una parte ma, integrata nel complesso cellulare, è parte del tutto.

BIBLIOGRAFIA

1. BATTAGLIA, P.A., DEL BUE, M., OTTAVIANO, M. & PONZI, M. 1983. A Puzzle genome: kinetoplast DNA in Molecular biology of Parasites. Raven Press, New York. pp. 107-124.
2. ENGLUND, P.T., HAJDUK, S.L. & MARINI, J.C. 1982. The molecular biology of Trypanosomes. Ann. Rev. Biol. 51: 315.
3. RENGER, H.C. & WOLSTENHOLME, D.R. 1970. Kdna of the hemoflagellate T. lewisi. J. Cell Biol. 47: 689.
4. BORST, P. & HOEIJMAKERS, J.H.J. 1979. Kinetoplast DNA. Plasmid 2: 20-40.
5. PONZI, M., BIRAGO, C. & BATTAGLIA, P.A. 1984. Two identical symmetrical

regions in the minicircle structure of T. lewisi kinetoplast DNA. Mol. Bioch. Par. 13: 111-119.

6. KIDANE, G.Z., HUGHES, D. & SIMPSON, L. 1984. Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of Kdna from Leishmania tarentolae. Gene 27: 265-277.

7. FOUTS, P. & WOLSTENHOLME, D.R. 1979. Evidence for a partial transcript of the small circular component of kinetoplast DNA of Crithidia acanthocephali. Nucleic Acid Res. 6: 3785-3804.

8. BRUNEL, F., DAVISON, J., YINH HA TI & MERCHEZ, M. 1980. Cloning and expression of T. brucei kDNA in E. coli. Gene 12: 223.

9. COSGRAVE, W.B. & SKEEN, M. 1970. The cell cycle in Crithidia fasciculata. Temporal relationships between synthesis of DNA in the molecules and in the kinetoplast. J. Protozool. 17: 172-177.

10. BRACK, C.H., DELAIN, E. & RIOU, G. 1972. Replicating, covalently closed, circular DNA from kinetoplast of T. cruzi. Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 1624.

11. SIMPSON, A.L. & SIMPSON, L. 1976. Pulse-labeling of kinetoplast DNA: localization of two sites of synthesis within the networks and kinetics of labeling of closed minicircles. J. Protozool. 23: 583-587.

12. KORNEBERG, A. 1980. DNA replication. W. Freeman and Company, San Francisco.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 163-168

ETEROGENEITA' DELLA TUBULINA DEI PROTOZOI PARASSITI

P. Cappuccinelli (a), D. Zicconi (a), C. Sellitto (a) & V. Viclicky (b)

(a) Istituto di Microbiologia (Facoltà di Medicina), Università di Sassari, Sassari; (b) Institute of Molecular Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Krc.

Riassunto. - Utilizzando anticorpi monospecifici e monoclonali prodotti contro tubulina di cellule superiori è stata studiata, con l'immunofluorescenza indiretta e l'immunoblotting, la reattività immunologica della tubulina di Trichomonas vaginalis, Herpetomonas muscarum, Leishmania tropica e Naegleria gruberi. I risultati mostrano un notevole grado di eterogeneità immunologica sia della tubulina delle differenti strutture microtubulari di uno stesso Protozoo, sia rispetto alla tubulina di cellule superiori.

Summary. - The immunoreactivity of tubulin of Trichomonas vaginalis, Herpetomonas muscarum, Leishmania tropica and Naegleria gruberi has been evaluated using indirect immunofluorescence and immunoblotting with monospecific and monoclonal antibodies raised against tubulin from higher cells. Our results show an immunological heterogeneity of tubulin both within the same protozoan cell and with respect to the tubulin of higher organisms.

Introduzione

La tubulina costituisce una delle proteine principali dei Protozoi. In particolare, nei Protozoi flagellati e dotati di microtubuli pellicolari o assostilari rappresenta quantitativamente una quota cospiqua delle proteine totali, potendo raggiungere, come nelle Leishmanie, anche il 10-20% (1). Poichè essa è la proteina costitutiva dei microtubuli, indispensabili per numerose funzioni cellulari, quali la motilità, il mantenimento della forma, l'espressione di antigeni di membrana, la mitosi, ecc., teoricamente rappresenta un ottimo bersaglio di inibitori specifici in grado di bloccare le funzioni cellulari in cui è coinvolta. Perchè questi inibitori possano essere eventualmente utilizzati in terapia, è necessario che siano dotati di specificità assoluta verso la tubulina dei Protozoi parassiti, in modo da non interferire con le analoghe strutture delle cellule dell'ospite. Questa specificità è possibile solo nel caso in cui la tubulina dei Protozoi sia differente nella struttura chimica da quella degli organismi superiori. Lo scopo di questo lavoro è la dimostrazione dell'eterogeneità della tubulina di alcuni Protozoi parassiti confrontandola con quella di cellule superiori. E' stata anche studiata l'eterogeneità di tubuline appartenenti a strutture cellulari diverse all'interno di uno stesso Protozoo. L'approccio è stato

di tipo immunochimico utilizzando anticorpi monoclonali e monospecifici in grado di riconoscere determinanti antigenici diversi della tubulina.

Materiali e Metodi

Protozoi. Sono stati utilizzati i seguenti Protozoi: Trichomonas vaginalis, (ceppo isolato da un caso di trichomoniasi vaginale acuta), Leishmania tropica (gentilmente fornito dal Dr.C.Bordier, Lausanne), Naegleria gruberi NEG (ATCC 30223) ed Herpetomonas muscarum (isolato nel nostro laboratorio). I protozoi venivano coltivati secondo le tecniche usuali (2) ed erano utilizzati in fase di crescita logaritmica. La conta dei Protozoi era effettuata con metodo diretto con la camera di Thoma. La vitalità veniva determinata con il metodo dell'esclusione del blu tripano.

Anticorpi. La preparazione dell'anticorpo monospecifico anti-tubulina di flagello di spermatozoo del riccio di mare Strongylocentrotus purpuratus (MS) è stata precedentemente descritta (3). La produzione e la caratterizzazione degli anticorpi monoclonali anti-tubulina di cervello (TU-01, TU-02, TU-03 e TU-04) sono riportate altrove (4 e manoscritto in preparazione). Gli anticorpi monoclonali anti-tubulina di lievito (YL 1/2 e YL 1/34) sono stati gentilmente forniti dal Dr. J. Kilmartin, Cambridge, U.K.

Immunoblotting. Dopo elettroforesi delle cellule su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti (5), i campioni erano trasferiti elettroforeticamente dal gel su carta di nitrocellulosa (Millipore) secondo la tecnica dell'immunoblotting (6). Era poi possibile localizzare le bande della tubulina mediante colorazione reversibile con eparina-blu di toluidina. Dopo decolorazione, le membrane erano saturate con siero bovino al 30% e quindi incubate con opportune diluizioni di anticorpo in Tris-Cl 10mM, NaCl 0,15M, pH 7,4 (TBS) per 4 ore a 22°C. Il complesso immune veniva evidenziato con un secondo anticorpo coniugato con perossidasi, usando l' α-cloronaftolo come substrato della reazione enzimatica.

Immunofluorescenza. Le cellule erano fissate e permeabilizzate con una delle tre seguenti metodiche: formaldeide 3% e Triton X-100 0,2% in "cytoskeleton buffer" (CB) (7) per 20 min., glutaraldeide 1% e Triton X-100 0,2% in CB per 20 min., formaldeide 3% in CB per 20 min. seguita da metanolo per 10 min. a -20°C. I microrganismi erano poi incubati con i diversi anticorpi monospecifici e monoclonali in camera umida, a 37°C per 45 min. I vetrini erano lavati con TBS per 30 min. e successivamente incubati in camera umida a 37°C per 45 min. con anti-γ-globuline di topo o di coniglio coniugate con isotiocianato di fluoresceina (DACO). Dopo ripetuti lavaggi in TBS, i vetrini erano montati con Gelvatol (8), osservati con un microscopio Leitz Laborlux 20 e fotografati su pellicola Ilford HP5.

Risultati

L'immunoreattività della tubulina di Protozoi flagellati e di amoebe di Naegleria gruberi con anticorpi anti-tubulina monospecifici e monoclonali, di diversa origine, è stata studiata con la tecnica dell'immunoblotting dopo elettroforesi su gel di poliacrilamide e trasferimento su fogli di nitrato di cellu-

losa.

Tabella 1. - Immunoblotting di tubuline di Protozoi con anticorpi monospecifici e monoclonali anti-tubulina.*

Protozoi	Anticorpi						
	MS	TU-01	TU-02	TU-03	TU-04	YL 1/2	YL 1/34
Trichomonas vaginalis	+	+	+	±	-	-	-
Herpetomonas muscarum	+	-	nd	nd	nd	+	+
Leishmania tropica	+	+	+	+	+	nd	nd
Naegleria gruberi	-	-	nd	nd	nd	±	±

+ = reazione positiva; - = reazione negativa; ± = reazione debolmente positiva; nd = non determinato.
* Tutti gli anticorpi usati danno reazione positiva con tubulina di cervello di pecora e tubulina di flagello di spermatozoo di riccio di mare.

La Tabella 1 mostra i risultati di una serie di esperimenti. Mentre tutti gli anticorpi usati danno reazione positiva con tubulina di organismi superiori (cervello di pecora e flagello di spermatozoo di riccio di mare), solo alcuni di essi cross-reagiscono con la tubulina di T. vaginalis, H. muscarum e N. gruberi. Questi risultati dimostrano una eterogeneità delle tubuline dei Protozoi nei confronti di quelle di organismi superiori. Poichè il sistema dei microtubuli di alcuni Protozoi è notevolmente complesso e, da un punto di vista funzionale, è possibile riconoscere tipi diversi di microtubuli (flagellari, pellicolari, assostilari, mitotici, ecc.) con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta è stata studiata l'immunoreattività dei microtubuli di L. tropica e T. vaginalis (Tabella 2 e 3 e Figura 1). I risultati con ambedue i Protozoi mostrano anche in questo caso una diversa reattività immunologica dei differenti microtubuli. Ad esempio, i microtubuli flagellari di T. vaginalis sono riconosciuti unicamente da uno dei sei monoclonali usati (TU-01), mentre quelli assostilari e mitotici rispettivamente da due e da tre (Tabella 2). Nel caso di L. tropica, invece, due anticorpi monoclonali (YL 1/2 e YL 1/34) riconoscono i microtubuli flagellari, tutti reagiscono con quelli pellicolari e solo tre (TU-01, TU-03 e TU-04) con quelli mitotici (Tabella 3).

Tabella 2. - Immunofluorescenza indiretta dei microtubuli di Leishmania tropica con anticorpi anti-tubulina.

Microtubuli	Anticorpi						
	MS	TU-01	TU-02	TU-03	TU-04	YL 1/2	YL 1/34
Flagellari	+	-	-	-	-	+	+
Pellicolari	+	±	±	+	±	+	+
Mitotici	+	+	-	+	+	-	-

Tabella 3. - Immunofluorescenza indiretta dei microtubuli di Trichomonas vaginalis con anticorpi anti-tubulina.

Microtubuli	Anticorpi						
	MS	TU-01	TU-02	TU-03	TU-04	YL 1/2	YL 1/34
Flagellari	+	±	-	-	-	-	-
Assostilari	+	+	±	-	-	-	-
Mitotici	+	+	+	+	-	-	-

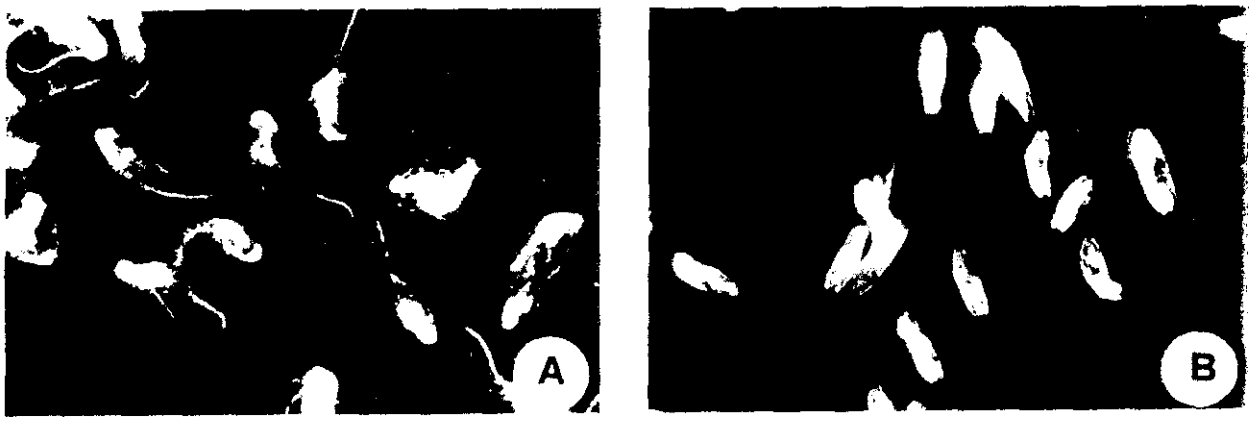


Figura 1 - Immunofluorescenza indiretta di T.vaginalis con un anticorpo monospecifico anti-tubulina (a) e di L.tropica con l'anticorpo monoclonale TU-03 (b). Ingrandimento: 800x.

Discussione

Questo lavoro mostra come la tubulina di alcuni Protozoi flagellati (T.vaginalis, H.muscarum e L.tropica) e dell'ameboflagellato N.gruberi sia immunologicamente eterogenea nei confronti di quella delle cellule superiori. Tale eterogeneità è abbastanza singolare se si considera che, fino a non molto tempo fa, la tubulina era considerata una delle proteine cellulari più conservate filogeneticamente (9). Più recentemente,però, si sono accumulate indicazioni che mostrano come alcune delle tubuline dei microrganismi eucariotici possano essere differenti dalle analoghe proteine delle cellule superiori (10). Nel nostro caso, la dimostrazione dell'eterogeneità è stata ottenuta utilizzando anticorpi monoclonali, in grado di riconoscere singoli determinanti antigenici della molecola. La mancata reattività degli anticorpi con alcune delle tubuline esaminate potrebbe essere dovuta sia all'assenza del determinante verso cui sono stati prodotti, sia ad una sua diversa esposizione. Anche questa ultima possibilità è, in ogni caso, indice di una diversità conformazionale tra le tubuline che potrebbe, eventualmente, essere alla base di una diversa sensibilità ai farmaci antimicrotubulari. Una differente sensibilità dei microtubuli di T.vaginalis nei confronti di inibitori specifici è stata recentemente dimostrata (11).

I nostri risultati indicano anche una eterogeneità immunologica delle tubuline appartenenti a strutture differenti di uno stesso Protozoo e sono in accordo sia con la "multi-tubulin hypothesis" (12) sia con dati recenti ottenuti col

flagellato Crithidia fasciculata (13). Questa eterogeneità non è inattesa in quanto i microtubuli dei Protozoi sono organizzati in strutture differenti, almeno per quanto riguarda la loro distribuzione intracellulare e le funzioni svolte. Inoltre è noto come il sistema genico che controlla la sintesi della tubulina sia notevolmente complesso, potendosi avere, come nel caso di T.brucei, anche 13-17 geni per ciascuna delle due subunità (14).

In conclusione, questi dati dimostrano una eterogeneità della tubulina dei Protozoi nei confronti di quella delle cellule superiori che può essere la base per l'azione selettiva di inibitori specifici del sistema dei microtubuli dei Protozoi parassiti.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr.J.Kilmartin per gli anticorpi monoclonali anti-tubulina di lievito (YL 1/2 e YL 1/34). Lavoro eseguito con contributi del CNR, progetto finalizzato "Controllo delle malattie da infezione", e del Ministero della Pubblica Istruzione (60%).

BIBLIOGRAFIA

1. CAPPUCCINELLI, P. & MORRIS, N.R.(Eds). 1982. Microtubules in Microorganisms. Marcell Dekker,Inc., New York and Basel.
2. TAYLOR, A.E.R. & BAKER, J.R.(Eds). 1978. Methods of cultivating parasites in vitro. Academic Press, London, New York, San Francisco.
3. CAPPUCCINELLI, P., UNGER, E. & RUBINO, S. 1981. Immunofluorescence of microtubular structures during the cell cycle of Dictyostelium discoideum. J.Gen. Microbiol. 124: 207-211.
4. VICLICKY, V., DRABER, P., HASEK, J. & BARTEK, J. 1982. Production and characterization of a monoclonal antitubulin antibody. Cell Biol.Int.Rep. 6: 725-730.
5. LAEMNLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
6. TOWBIN, H.T., STAEMELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
7. SMALL, J.V. & CELIS, J.E. 1978. Filament arrangements in negatively stained cultured cells: the organization of actin. Citobiologie. 16: 308-325.
8. RODRIGUEZ, J. & DEINHARDT, F. 1960. Preparation of a semipermanent mounting medium for fluorescent antibody studies. Virology. 12: 316-317.
9. LUDUENA, R.F. & WOODWARD, D.O. 1973. Isolation and partial characterization of α- and β-tubulin from outer doublets of sea urchin sperm and microtubules of chick-embryo brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3594-3598.
10. LITTLE, M., KRAUHS, E., POSTINGL, H., LUDUENA, R.F. & RICE, N. 1982. Tubulin subunits from higher and lower eukaryotes: a structural comparison. In: Microtubules in Microorganisms. P.Cappuccinelli & N.R.Morris (Eds). Marcell Dekker, Inc., New York and Basel. pp. 1-14.
11. JULIANO,C., MARTINOTTI,M.G. & CAPPUCCINELLI, P. 1985. In vitro effect of microtubule inhibitors on Trichomonas vaginalis. Microbiologica. 8: 31-42.

12. FULTON, C. & SIMPSON, P.A. 1976. Selective synthesis and utilization of flagella tubulin. The multi-tubulin hypothesis. In: Cell Motility. R.Goldman, T.Pollard & J.Rosenbaum (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp. 987-1005.
13. RUSSEL, D.G., MILLER, D. & GULL, K. 1984. Tubulin heterogeneity in the Trypanosome Crithidia fasciculata. Mol. Cell. Biol. 4: 779-790.
14. THOMASHOW, L.S., MILHAUSEN, M., RUTTER, W.J. & AGABIAN, N. 1983. Tubulin genes are tandemly linked and clustered in the genome of Trypanosoma brucei. Cell. 32: 35-43.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 169-172

NEW TECHNOLOGIES AND CLASSICAL PARASITOLOGY: THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO IDENTIFY PARASITES INSIDE THE VECTORS

F. Esposito (a) & S. Lombardi (b)

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

Summary. - The sporozoite antigens of Plasmodium have been intensively studied during these years. Their molecular structure has been described and their role in the host's immune response has began to be understood. The possibility to develop a sporozoite-based vaccine is currently investigated. In addition a radioimmunoassay was evisaged to detect the circumsporozoite antigen inside the vector. The assay was compared in an experimental fiéld trial wich the conventional technique of salivary glands dissection.

Riassunto. - Lo studio degli antigeni dello sporozoita di Plasmodium hanno compiuto negli ultimi anni progressi considerevoli. In particolare è stata descritta nei dettagli la struttura molecolare dell'antigene "circumsporozoitico" di P. falciparum e si sono cominciate ad ottenere significative indicazioni sul significato di tale antigene dal punto di vista della reattività immunologica dell'ospite. E' in corso di valutazione la possibilità di sviluppo di vaccini basati su tali antigeni. Inoltre è stato messo a punto in test radioimmunologico che consente di individuare l'antigene circumsporozoitico nel corpo del vettore. Questo test è stato messo a confronto in uno studio sperimentale sul campo con la tecnica convenzionale della dissezione delle ghiandole salivari per evidenziare la presenza di sporozoiti all'interno del vettore.

The heterogeneity of antibodies produced in the immune response reduces the reliability of immunologic assay. Experimental immunization is still more of an art than a science and serologists have had to be satisfied with whatever quality and quantity of antiserum an immunized animal will provide. Even when operationally pure antigens are used for immunization, animals frequently make large amounts of antibody against minor contaminants. The affinity and quantity of the antibody often vary from animal to animal and from one bleeding to the next. Nevertheless, these problems have not prevented the affective use of antibodies in basic and applied research in biology and medicine. Immunologists have continued to seek methods of immunization that would produce large amounts of homogeneous antibodies and, as often happens in science, the solution grew out of a series of basic and completely unrelated experiments.

On August 1975 Köhler and Milstein published in Nature a paper reporting that cultured mouse myeloma cells could be fused to normal splenocytes from animals immunized with sheep red blood cells. The hybrid cell lines grew continuously in culture and they could be frozen, recovered and injected into the peritoneal cavity of syngeneic mice, where they grew and induced an ascites that contained large amounts of antibody (up to 15 mg of antibody per ml of ascite). These findings exceeded even the wildest dreams of immunologists. Not only is it possible to generate a homogeneous antibody, but the production of

that antibody is immortalized, and the only limitation on the amount of antibody available is the number of mice one is willing to give injections. In addition, impure antigens can be used, since the technique results in the identification and propagation of cloned cell lines. These lines produce a single antibody that reacts with the antigen and does not react with any contaminating material.

Basic researchers and clinical investigators recognized the enormous potential of monoclonal antibodies and began to generate such reagents. In some situations, where it might indeed be better to obtain large amounts of heterogeneous antiserum from a single bleeding, the introduction of hybridoma technology is more of a fashion than a need. In many cases however it is an imperative necessity and we will now give an example that refers to both basic and applied parasitology, and more precisely to the study of malaria parasites.

Malaria is still the most important parasitic disease affecting 200 to 400 million people. Malaria kills more than one million people, mostly children, every year and disables many individuals in endemic areas. Any chance of success for whatever strategy for mosquito control in endemic malarial areas depends on the accurate determination of the proportion of infected mosquitoes, as well as on the identification of the main vector species.

The sporozoite index (S.I.) represents the proportion of mosquitoes bearing sporozoites in their salivary glands. Obviously this parameter is of paramount importance for the determination of the inoculation rates, i.e. the number of infective bites per man per night. Up to now, determination of S.I. has required laborious dissection and subjective microscope examination of salivary glands of individual mosquitoes. Let's think about what a difficult task it is in areas where the infection rate is below 1 infected Anopheles out of 1000. In addition, the morphology of sporozoites does not allow their species identification. Therefore, when for instance Plasmodium falciparum and P. malariae and other plasmodia coexist, the identification of the parasite species infecting a mosquito is unachievable by simple microscopy.

Recently the group led by Ruth Nussenzweig at the New York University accomplished an important breackthrough in unveiling the secrets of the immunologic aspects of the host-parasite relationships in malaria (1). Monoclonal antibodies were obtained by fusing myeloma cells with splenocytes from mice bitten by irradiated, infected Anopheles. The summary of the results is that a single monoclonal antibody displayed all properties of polyclonal sera obtained from animals vaccinated with whole sporozoites or from patients suffering from malaria. This monoclonal identified a stage - and species - specific membrane antigen that covers the sporozoite surface and has been named circumsporozoite or CS protein. Cross-reactivity was never observed between the CS proteins of the main human malaria parasites.

Thanks to the availability of the relevant monoclonal antibody, the gene coding for the CS protein of P. falciparum has been cloned and the complete structure of the protein has been elucidated (2,3). The rough central half of the molecule consists of repeated subunits of 4 aminoacids (Asn-Ala-Asn-Pro). The presence of these repetitive subunits appears to be a common property of all the CS proteins. For instance in P. knowlesi they consist of 12 repetitions of 12 aminoacids. The recurrent subunits can explain the immunodominance of the CS proteins: in a study about the specificity of antibodies in immune sera from human and monkeys vaccinated with irradiated sporozoites it was shown that a single monoclonal antibody could inhibit 70-95% of the specific binding of these polyclonal sera to sporozoites extracts (4). Furthermore, every monoclonal antibody obtained thus far against sporozoites is directed against the CS protein. These findings are relevant to the development of vaccines against malaria using purified CS proteins. This molecule, with its surprising simplicity, appears to lend itself ideally to the chemical peptide synthesis as a means of production. This is still a developing story and we refrain to go deeper into this matter. We prefer rather to describe in detail what can be defined an useful by product of this line of research, namely the immediate

practical application of the antibody to detect sporozoites in mosquitoes.

A simple, quick immunoassay has been developed that not only easily detects but also identifies sporozoites in individual or pooled mosquitoes. Briefly, a microtiter plates is coated with a monoclonal antibody directed against the CS protein. Then mosquitoes, or part of mosquitoes, are crushed to obtain an antigenic extract that is transferred into the previously coated plate. A 2- hour incubation allows the sporozoite antigens that may be present in the extract to bind to the antibody. At this point a second antibody, identical to the first but radioactively or enzyme labelled is added. Of course this antibody is bound, and the "sandwich" is completed, in the case, and only in the case, the antigen was bound by the first one (5). Incidentally it should be noticed that this kind of two-site immunoradiometric assay (IRMA) is possible thanks to the peculiar structure of the antigen, provided with single, recurrent epitopes. Otherwise, 2 different monoclonal antibodies, directed against 2 different epitopes should have been used. Actually the ability of the CS protein to be bound in a 2-site IRMA is one of the ways in which the repetitive structure of the molecule was envisaged. Thus, the infected mosquitoes and the species of the infecting sporozoites can be readily detected. As to the sensitivity, in our hands it proved to be around 50 sporozoites/mosquito, diluting the mosquito in 150μ l of fluid. This latter is not a trivial detail, since it means that up to 5 different monoclonals, directed against the CS proteins of 5 Plasmodium species can be assayed on the same mosquito.

Reviewing now the dissection of salivary glands in comparison with IRMA, it appears that the former is slow, subjective, unable to provide species identification, and requires freshly collected material; the latter is rapid, allows to deal with large samples, allows the species identification, can be performed outside the collection areas, in a central lab. A still open question concerns the relative reliability of the two methods. In a recent field trial in Gambia (6). it was found a good agreement between dissection and IRMA: this latter gave an 8% infected mosquitoes and microscope gave a rough 5%. The difference was claimed to be the consequence of the ability of the monoclonal antibody to detect sporozoite antigens in the oocyst, just before the release of sporozoites.

In a recent investigation (Esposito et al., in preparation) we had the opportunity to test by IRMA about 4000 mosquitoes of the A. gambiae complex (A. gambie and A. arabiensis) collected inside human houses in malaria hyperendemic areas of West Africa (Mali and Burkina-Faso), during the 1984 rainy season (June-October). This sampling activity was carried out in connection with malariological surveys by various colleagues including Y. Touré, G. Sabatinelli, P. Rossi and M. Coluzzi. Part of the material was processed by the same colleagues for dissection and microscopical examination of salivary glands.

To verify the quantitative contribution to the IRMA positivity given by sporozoite antigens present at the oocyst level, we performed two additional experimental procedures. First, we cut mosquitoes in abdomens and thoraxes and processed separatedly each body fraction by IRMA. Second, we processed by IRMA a sample of mosquitoes experimentally infected on a gametocyte-bearing patient. Mosquitoes were killed at different times after the bite, so that the IRMA was performed on sub-samples where the sexual cycle of Plasmodium was at different stages.

The results of our trial can be summarized as follows: i) IRMA consistently gave percentages of infected mosquitoes higher than those obtained by dissection; ii) the difference could not be explained entirely by the positivity in IRMA of mature oocysts, since the percentage of mosquitoes bearing sporozoite antigens only at the abdomen level did not compensate the difference between the results of IRMA and those of dissection; iii) the difference did not depend on a reactivity given by early stages of the sexual cycle of Plasmodium, since all the mosquitoes were negative for up to 10 days after the bite, when the positivity started appearing at the abdomen level.

An explanation for the different outcomes of IRMA and dissection should

then be looked for by investigating the quantitative aspects of the assay. IRMA allows the quantitation of sporozoites/mosquito by means of a standard curve prepared from serial dilutions of known amounts of sporozoites. By running the standard dilutions together with the unknowns it is easy to calculate the number of sporozoites on the basis of the obtained counts per minute. From these calculations we obtained for the IRMA a threshold value of about 50 sporozoites/mosquito. A threshold value for the dissection technique is difficult to be established. However, by comparing the results obtained following the two techniques on very well matched samples in the Gambia's field trial by Collins et al. (6), the threshold for the microscopic dissection can be hypothetically set aroun 500 sporozoites/mosquito. The difference in threshold of sensitivity could explain the difference between the results provided by the two techniques in our trial.

IRMA thus appears to be not only quick and simple, but even much more sensitive than the conventional technique. In addition, it allows the identification of the species of Plasmodium infecting the mosquito. We actually found 3 mosquitoes harbouring together sporozoites of P. falciparum and P. malariae. This result could never be achieved by microscope.

In conclusion, IRMA lends itself to a wider and wider use for determination of sporozoite indices. Its use opens new questions to the epidemilogist, but to open new questions cannot be considered a drawback for a new tool provided by immunology to epidemiology of malaria. Furthermore, it has to be stressed that the kind of assay presented here is amenable to general applications, since virtually any parasite can be identified virtually in any vector, provided of course that the relevant monoclonal antibodies are available.

REFERENCES

1. YOSHIDA, N., NUSSENZWEIG, R.S., POTOCNJAK, P., NUSSENZWEIG, V. & AIKAWA, M. 1980. Hybridoma produces antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. Science 207: 71-73.
2. DAME, J.B., WILLIAMS, J.L., MC CUTCHAN, T.F., WEBER, J.L., WIRTH, R.A., HOCKMEYER, W.T., MALOY, W.L., HAYNES, J.D., SCHNEIDER, I., ROBERTS, D., SANDERS, G.S., REDDY, E.P., DIGGS, C.L. & MILLER, L.H. 1984. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Science 225: 593-595.
3. ENEA, V., ELLIS, J., ZAVALA, F., ARNOT, D.E., ASAVANICH, A., MASUDA, A., QUAKYI, I. & NUSSENZWEIG, R.S. 1984. DNA cloning of Plasmodium falciparum circumsporozoite gene: aminoacid sequence of repetitive epitope. Science 225: 628-629.
4. ZAVALA, F., COCHRANE, A.H., NARDIN, E.H., NUSSENZWEIG, R.S. & NUSSENZWEIG, V. 1983. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. J. Exp. Med. 157: 1947-1957.
5. ZAVALA, F., GWADZ, R.W., COLLINS, F.H., NUSSENZWEIG, R.S. & NUSSENZWEIG, V. 1982. Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes. Nature 299: 737-738.
6. COLLINS, F.H., ZAVALA, F., GRAVES, P.M., COCHRANE, A.H., GWADZ, R.W., AKOH, J. & NUSSENZWEIG, R.S. 1984. First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 538-543.

Ann. Ist. Super. Sanità
Vol. 22, N. 1 (1986), pp. 173-178

MODIFICAZIONI DELLE LARVE NEONATE DI TRICHINELLA SPIRALIS DURANTE LA MATURAZIONE

F. Bruschi (a), M.P. Viola-Magni (a) & R.A. Binaghi (b)

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

Riassunto. - Gli autori descrivono recenti osservazioni su modificazioni biochimiche ed immunologiche che si instaurano nelle larve neonate di Trichinella spiralis durante la maturazione.

Summary (Modifications of Trichinella spiralis new-born larvae during maturation). - Authors describe some recent observations on the modifications of biochemical-immunological characteristics in new-born larvae of Trichinella spiralis during maturation.

Le larve new-born di Trichinella spiralis (NBL) rappresentano lo stadio contro il quale si innesca la risposta immunitaria dell'ospite, dalla riuscita della quale dipende la possibilità o meno di installazione del parassita (1).

Già da diversi anni è possibile ottenere in vitro le NBL grazie al metodo descritto da Demis e coll. (1). Seguendo la loro esperienza, tutti coloro che si sono occupati in questi anni di questo stadio della Trichinella spiralis hanno lavorato su NBL ottenute da larve adulte incubate per tutta la notte, senza tener conto di eventuali modificazioni che si potevano verificare durante le prime ore di vita delle larve; si pensava cioé di usare una popolazione omogenea di NBL contro cui testare in vitro gli antisieri e la risposta di cellule effettrici quali eosinofili, neutrofili, macrofagi.

Tuttavia era a tutti chiara la difficlotà di ottenere risultati estremamente ripetibili negli studi in vitro e le percentuali di mortalità delle NBL incubate con antisiero e cellule di varia provenienza, erano estremamente variabili.

Molto recentemente Jungery e coll. (2) hanno dimostrato la diversa composizione proteica della superficie di NBL di diverse età. Mediante un'analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide questi autori hanno dimostrato che sulla superficie delle larve di età di 0,5 ore, 3 ore, 6 ore è presente una sola proteina, del peso molecolare di circa 64 KDa. Alla 18ª ora di vita compaiono altre tre proteine del peso molecolare rispettivamente di 58, 34 e 32 KDa; questo pattern proteico rimane invariato anche a 18,50 ore dalla nascita delle larve (Fig.1). Da questi risultati si può concludere che le NBL vanno incontro nelle prime ore di vita a modificazioni della loro superficie che potrebbero avere un significato nelle interrelazioni ospite-parassita per questo elminto.

Quasi contemporaneamente Binaghi ed i suoi collaboratori hanno osservato che se si impiegavano NBL isolate dopo solo due ore di incubazione delle larve adulte, in test di citotossicità cellulare anticorpo-mediata (ADCC) con cellule di essudato peritoneale di topo si avevano degli indici di mortalità di NBL

estremamente più alti e con risultati maggiormente ripetibili rispetto agli esperimenti in cui si impiegavano NBL separate da larve adulte incubate per tutta la notte, quindi di diversa età.

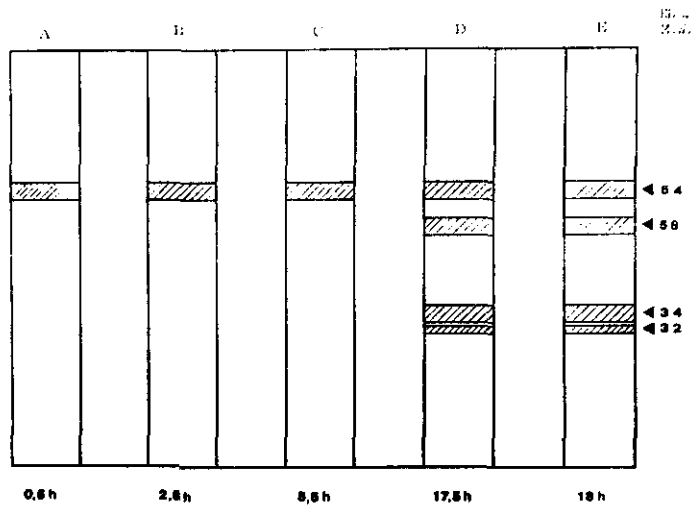


Fig.1.- Analisi delle proteine della superficie di NBL di diversa età, mediante *elettroforesi su gel di SDS-poliacrilamide, in condizioni riducenti. Le ore di* B, C, D, E si devono intendere rispettivamente come 3, 6, 18 e 18,5 ore di vita delle larve (ridisegnate da Jungery e coll., 1983).

Da questa osservazione sono stati compiuti alcuni esperimenti in vitro ed in vivo per verificare se esistesse una differenza di comportamento tra NBL di due ore e 20 ore di vita. Negli esperimenti in vitro è risultato che incubando cellule di essudato peritoneale di topi Low antibody Producer (LP) di Biozzi con NBL di due ore o di 20 ore, antisiero di topo e complemento si avevano risultati diversi a seconda dell'età delle larve; nel primo caso infatti dopo 24 ore di incubazione con le cellule si aveva una mortalità variabile tra il 50 ed il 100% mentre nel secondo caso questa era praticamente assente anche dopo 48 ore di incubazione. Alla luce di questi risultati sono stati compiuti quindi esperimenti in vivo. Sono state iniettate NBL di due e 20 ore di vita per via endovenosa a topi di vari ceppi e dopo 30 giorni gli animali sono stati uccisi per la valutazione del loro grado di infezione. Questo è stato valutato calcolando in percentuale il numero di larve muscolari raccolte rispetto alle NBL iniettate. Le NBL di 20 ore si sono rivelate molto più infettive di quelle di due ore con un grado di infezione variabile a seconda dei ceppi impiegati (3) (Tab.1).

Successivamente Gansmüller e coll. (4) hanno effettuato uno studio di microscopia elettronica sulle cellule aderenti alle larve di due ore e di 20 ore di vita, dopo due ore di incubazione con cellule di essudato peritoneale di topo LP di Biozzi, normale, antisiero e complemento. I risultati hanno mostrato che pure impiegando una popolazione cellulare contenente 30-40% di linfociti, 40-50% di microfagi, 10% di monociti, 5-10% neutrofili e 1-3% di eosinofili, le cellule aderenti alle NBL di due ore risultavano esclusivamente degli eosinofili. Tali cellule si presentavano fortemente aderenti alle larve con la membrana cellulare che si uniformava alle pieghe presenti normalmente alla superficie delle larve; inoltre apparivano in corso di esocitosi e del

Tabella 1. - Infettività delle NBL a diverse età.

CEPPO	% delle larve muscolari a 30 giorni d'infezione * NBL 2 ore		NBL 20 ore	
Swiss	11	(36)	53	(29)
BALB/c	8	(10)	29	(5)
BP	8	(5)	52	(11)
CP	8	(11)	33	(8)

In parentesi il numero degli animali testati.
* % relativa al numero di NBL iniettate e.v. (3).

materiale elettrondenso, di probabile origine eosinofilica era interposto tra le cellule e le larve (Fig. 2).

Fig. 2. - Eosinofilo aderente ad una NBL di due ore di vita. x 17.500 (4).

Viceversa le cellule aderenti alle NBL di 20 ore erano esclusivamente macrofagi che pur presentando un'intensa attività di membrana non avevano segni di esocitosi (Fig. 3). Questi risultati sono stati ottenuti dopo 2 - 3 ore di incubazione con le cellule, quando non è ancora evidenziabile la mortalità delle larve. Se si prolungava l'incubazione le larve di due ore andavano incontro a morte entro 24 ore, mentre quelle di 20 ore non presentavano una mortalità rilevante neppure dopo 48 ore di incubazione con le cellule.

Un riassunto delle caratteristiche delle NBL di diversa età sulla base dei risultati ottenuti dal gruppo di Binaghi è illustrato in Fig. 4.

Molto recentemente Ortega-Pierres e coll. (5) hanno ottenuto un anticorpo monoclonale di classe IgG_1, diretto contro una proteina presente sulla superficie delle NBL di peso molecolare pari a 64 KDa, vale a dire la proteina che è presente da sola sulle larve di due ore di vita. Questo anticorpo monoclonale non reagisce contro gli antigeni di superficie né delle larve muscolari, né di quelle adulte di T. spiralis; sulla base di test di immunofluorescenza e di aderenza con eosinofili infatti l'anticorpo monoclonale non ha dato reazioni crociate con larve muscolari. Questo ultimo dato ci può far ipotizzare che nel passaggio maturativo da NBL a larva muscolare la proteina di 64 KDa non sia più espressa sulla superficie del parassita; saremmo

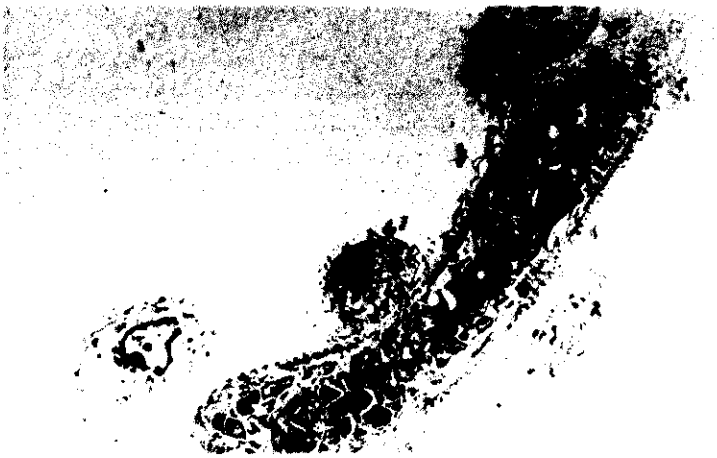


Fig. 3. - Macrofagi aderenti ad una NBL di 20 ore di vita. x 5.000.
(per gentile concessione di A. Anteunis)

quindi difronte ad un meccanismo di vera e propria variazione antigenica. Gli autori hanno dimostrato anche che incubando NBL di 3 ore di vita opsonizzate con questo anticorpo monoclonale, con eosinofili purificati (circa 95%) le cellule aderivano alle larve e ne provocavano una mortalità che tuttavia era di minore intensità e più lenta ad instaurarsi di quella che si aveva opsonizzando le larve con siero immune fresco. La mortalità mediata dall'anticorpo monoclonale aumentava se si aggiungeva al sistema siero fresco normale ma non venivano raggiunti mai i livelli di citotossicità ottenuti con il siero immune fresco; questo potrebbe significare che altri anticorpi, diretti contro altre proteine di superficie, sono necessari per avere il massimo effetto larvicida.

	LARVE 2 ore	LARVE 20 ore
Cellula aderente in sistemi ADCC	Eosinofilo	Macrofago
Sensibilità all'ADCC	+	-
Infettività dopo iniezione e.v.	10 %	30-60 %

Fig. 4. - Caratteristiche delle NBL di diversa età.

Anche gli esperimenti in vivo con questo anticorpo monoclonale hanno dato dei risultati interessanti. Gli autori hanno iniettato per via endovenosa in topi normali BALB/c NBL incubate con anticorpi monoclonali; in questa maniera è stata ottenuta una riduzione del 50% rispetto a quella avuta iniettando NBL da sole ed una riduzione più marcata rispetto all'infezione ottenuta con iniezione di NBL incubate con un anticorpo monoclonale diretto contro le larve muscolari. Se da un lato è stata dimostrata l'efficacia di questo anticorpo monoclonale anti NBL, in vivo, bisogna tuttavia osservare che le percentuali d'infezione ottenute da questi autori iniettando NBL di 2 ore di vita sono molto più alte di quelle ottenute da Binaghi e coll.; questi, inoltre, hanno ottenuto iniettando NBL da sole delle percentuali di infezione addirittura inferiori a quelle trovate da Ortega-Pierres e coll. iniettando NBL incubate con anticorpo monoclonale diretto contro di esse.

In una recente rassegna sugli antigeni di superficie dei parassiti (6) gli autori, descrivendo il lavoro di Jungery e coll., ipotizzano che le NBL di poche ore di vita non posseggano il recettore per il Complemento che comparirebbe tardivamente; questo permetterebbe ai parassiti di essere inattaccabili dalle cellule dell'ospite per tutto il tempo necessario per arrivare ai muscoli e quindi essere anatomicamente sequestrate dai meccanismi di difesa immunitari. Secondo questa ipotesi le NBL di due ore dovrebbero risultare più resistenti in vivo di quelle di 20 ore in cui potrebbe essere già comparso il recettore del Complemento. Questa teoria è senza dubbio in contrasto con i risultati ottenuti da Binaghi e coll. secondo i quali sono le larve di due ore le meno infettive.

Quale che sia il momento di insorgenza di una resistenza da parte delle larve, resta il fatto che ancora non siamo in grado di stabilire se questo fenomeno abbia un significato nella vita naturale del parassita e che rilevanza abbia o se si tratti piuttosto di una conseguenza della coltura in vitro dei parassiti. Anche nella schistosomiasi da Schistosoma mansoni è stata descritta un'acquisizione da parte dello stadio polmonare della schistosomula di una resistenza da parte della tossicità dei macrofagi che invece sono capaci di determinare una mortalità delle schistosomule allo stato cutaneo (7).

Il verificarsi di un fenomeno analogo in stadi di parassiti così diversi quali lo Schistosoma mansoni e la Trichinella spiralis ci fa propendere per l'ipotesi che si tratti di un processo naturale.

La modificazione delle larve durante la loro maturazione rappresenta comunque un modello estremamente interessante per lo studio dei meccanismi di evasione della risposta immune da parte dei parassiti e, per quanto riguarda la trichinellosi, potrebbe aiutare a comprendere meglio la modalità con cui l'ospite si difende da questo parassita. Dal punto di vista estremamente parassitologico sarà di notevole interesse valutare se durante la aturazione is hanno modificazioni della sintesi di proteine, DNA, RNA che potrebbero spiegare la differente composizione proteica delle NBL di diversa età.

BIBLIOGRAFIA

1. DENNIS, D.T., DESPOMMIER, D. & DAVIS, N. 1970. Infectivity of the newborn larva of Trichinella spiralis in the rat. J. Parasitol. 56: 974-977.
2. JUNGERY, M., CLARK, N.W.T. & PARKHOUSE, R.M. 1983. A major change in surface antigens during the maturation of newborn larvae of Trichinella spiralis. Mol. Biochem. Parasitol. 7: 101-109.
3. 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).
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. ORTEGA-PIERRES, G., MACKENZIE, C.D. & PARKHOUSE, R.M.E. 1984. Protection against Trichinella spiralis induced by a monoclonal antibody that promotes killing of newborn larvae granulocytes. Parasite Immunology 6: 275-284.
6. PHILIPP, M. & RUMJANECK, F.D. 1984. Antigenic and dynamic properties of helminth surface structures. Mol. Biochem. Parasitol. 10: 245-268.
7. SHER, A., JAMES, S.L., SIMPSON, A.J.G., LAZDINS, J.K. & MELTZER, M.S. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine Schistosomiasis. III. Loss of susceptibility to macrophage-mediated killing during maturation of S. mansoni schistosomula from the skin to the lung stage. J. Immunol. 128: 1876-1879.