

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Prevenzione e controllo
della malaria d'importazione in Italia**

Roberto Romi, Daniela Boccolini, Giancarlo Majori

Laboratorio di Parassitologia

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

01/29

Istituto Superiore di Sanità

Prevenzione e controllo della malaria d'importazione in Italia.

Roberto Romi, Daniela Boccolini, Giancarlo Majori

2001, ii, 38 p. Rapporti ISTISAN 01/29

Il presente lavoro è rivolto principalmente agli operatori del Servizio Sanitario Nazionale impegnati nella sorveglianza epidemiologica della malaria, nella diagnosi e nella prescrizione della profilassi antimalarica per i viaggiatori che si recano nelle aree endemiche. Il lavoro è diviso in cinque parti. Nella prima vengono definiti i lineamenti epidemiologici della malaria di importazione in Italia e analizzata la casistica più recente. Nella seconda vengono introdotte le specie plasmodiali patogene per l'uomo e viene descritto il loro ciclo di sviluppo. La terza parte è dedicata alla diagnosi di malaria, sia con la tradizionale tecnica di osservazione microscopica che con le più recenti tecniche biochimiche e molecolari. Nella quarta vengono approfondite le problematiche relative al rischio di contrarre la malattia nei diversi continenti e alla profilassi antimalarica; viene inoltre valutata l'incidenza della malaria nei viaggiatori italiani che si recano in zone di endemia. La quinta e ultima parte è dedicata alla sorveglianza dell'anofelismo residuo e alla descrizione delle relative tecniche entomologiche.

Parole chiave: Malaria, Malaria d'importazione, Italia

Istituto Superiore di Sanità

Prevention and control of imported malaria in Italy.

Roberto Romi, Daniela Boccolini, Giancarlo Majori

2001, ii, 38 p. Rapporti ISTISAN 01/29 (in Italian)

This paper is addressed to the national health service operators involved in malaria epidemiological surveillance, diagnosis and responsible for providing advice on the health hazards of international travels. The paper is divided into five sections: in the first one, the epidemiological features of imported malaria in Italy are presented and the most recent data are analysed and discussed. In the second section, the biology of the human plasmodia is described. The third section deals with the different techniques of malaria diagnosis, from the traditional diagnosis by microscopy to the new biochemical and molecular methods. The fourth section focuses on risk assessment and malaria prevention (prophylaxis) and an evaluation of the malaria incidence in Italian travellers to endemic countries is also presented. The fifth section deals with the surveillance of the anopheline vectors and the related entomological techniques.

Key words: Malaria, Imported malaria, Italy

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

INDICE

Introduzione	1
Attualità della malaria in Italia	3
Cenni di storia recente	3
Classificazione dei casi.....	4
Lineamenti generali della malaria d'importazione	4
Analisi del decennio 1986-1996	5
Casistica 1997-2000	7
Plasmodi della malaria umana	9
Inquadramento sistematico	9
Caratteristiche biologiche.....	9
Ciclo biologico e morfologia dei plasmodi	9
Ciclo pre-eritrocitario	9
Ciclo eritrocitario	10
Ciclo sessuato e sporogonico nell'anofele	11
<i>Plasmodium falciparum</i>	11
<i>Plasmodium vivax</i>	11
<i>Plasmodium ovale</i>	12
<i>Plasmodium malariae</i>	12
Diagnosi di malaria	13
Diagnosi microscopica di preparati ematici.....	13
Allestimento e colorazione dei preparati.....	13
Striscio sottile	14
Goccia spessa.....	14
Colorazione rapida	14
Ricerca dei parassiti e calcolo della parassitemia	14
Esame della goccia spessa.....	14
Esame dello striscio	15
Limiti di sensibilità dell'esame microscopico.....	15
Diagnosi differenziale dei Plasmodi	16
<i>Plasmodium falciparum</i>	17
<i>Plasmodium vivax</i>	17
<i>Plasmodium malariae</i>	17
<i>Plasmodium ovale</i>	18
Provenienza geografica dei parassiti malarici	18
Artefatti	19
Il metodo QBC	19
Metodi immunocromatografici	19
Diagnosi molecolare	21
Immunofluorescenza indiretta.....	21

Valutazione del rischio e prevenzione	23
La valutazione del rischio malarico.....	23
Incidenza della malaria nei viaggiatori italiani.....	23
Interruzione del contatto vettore-uomo.....	24
Protezione individuale dalle punture di zanzara	25
Mezzi meccanici e chimici per la protezione dalle zanzare	25
Impregnazione di materiali con insetticidi o repellenti	27
Chemioprolifassi della malaria.....	28
Cloroquina (CHL)	30
Cloroquina + Proguanil (C+P)	30
Meflochina (MEF)	30
Dossiciclina (DOX)	31
Anofelismo residuo in Italia	32
I vettori di malaria in Italia	32
Distribuzione e densità dei potenziali vettori	32
Capacità vettrice	33
Infettabilità del vettore	34
Tecniche per la valutazione della densità anofelica	35
Raccolta degli anofelini adulti.....	35
Raccolta delle larve anofeline.....	35
Valutazione del numero di punture per uomo per notte.....	35
Bibliografia	36

INTRODUZIONE

La malaria è una parassitosi molto antica da un punto di vista evolutivo, lo testimonia l'esistenza di più di cento specie di plasmodi malarici che si sviluppano in un elevato numero di ospiti vertebrati, quali rettili, uccelli, scimmie e uomo. I parassiti malarici si sono evoluti dai protozoi Coccidi (parassiti del tratto intestinale) sviluppando un adattamento ai tessuti degli organi interni e alle cellule del sangue. La successiva tappa evolutiva è stata la trasmissione di questi parassiti da un ospite all'altro per mezzo di insetti ematofagi, quali le zanzare. Già diversi secoli a.C., gli Assiri, gli Egizi, gli Indiani e i Cinesi avevano descritto nei loro testi febbri intermittenti che oggi si possono ricondurre ad attacchi malarici; nel 5° secolo a.C., Ippocrate aveva associato l'insorgenza delle febbri con le stagioni e i luoghi malsani.

Probabilmente la malaria ha avuto origine in Africa e si è distribuita da lì ad altre regioni calde, seguendo gli spostamenti dell'uomo verso l'area mediterranea, fino alla Mesopotamia, alla Penisola Indiana e al Sud-Est Asiatico. Quando e come la malaria abbia raggiunto il Nuovo Mondo è oggetto di ipotesi, in quanto non si hanno testimonianze storiche. È probabile che *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* vi furono portati dal Sud-Est Asiatico dai primi viaggiatori attraverso l'Oceano Pacifico nel primo millennio, mentre *Plasmodium falciparum* potrebbe essere arrivato nel continente Americano in epoca post-Colombiana, con gli schiavi deportati dall'Africa a partire dal 1500.

Le specie di plasmodi patogeni per l'uomo sono 4: *P. falciparum*, la specie più diffusa nella zona tropicale e subtropicale, *P. vivax*, specie prevalente in zone temperate, ma presente anche in zone tropicali e subtropicali; *P. malariae*, non uniformemente diffuso, con una frequenza molto bassa, nelle stesse zone di *P. falciparum*; *P. ovale*, presente principalmente in Africa tropicale, ma anche nel Pacifico.

La malaria è sempre stata, ed è ancora, argomento di ricerca e di studio; in Tabella 1 sono riportate le tappe storiche fondamentali toccate nell'arco di più di 3 secoli.

La malaria è considerata una delle malattie emergenti più diffuse nel mondo. Nelle aree tropicali e subtropicali rappresenta una delle prime cause di morbosità e mortalità. Ma l'endemia malarica è presente anche in zone temperate quali la Turchia e i Paesi transcaucasici dell'ex Unione Sovietica. La popolazione mondiale che vive in aree a rischio rappresenta il 42% dell'umanità e l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che l'incidenza globale della malaria sia dell'ordine di 300-500 milioni di casi per anno, con più di un milione di decessi (1). La situazione è particolarmente grave nell'Africa sub-sahariana, che da sola contribuisce a oltre due terzi dei casi totali di malaria nel mondo.

Come altre 43 malattie infettive, in Italia la malaria è soggetta a notifica obbligatoria (DM del 15 dicembre 1990; Circolare Ministeriale n. 22 del 12 maggio 1992). I laboratori delle Aziende Sanitarie Locali diagnosticano i casi clinici mediante osservazione al microscopio degli strisci ematici. I casi positivi vengono notificati dalle Autorità Sanitarie regionali al Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Salute con l'invio della scheda di notifica standard (contenente dati demografici, epidemiologici, clinici e parassitologici) e i vetrini su cui è stata effettuata la diagnosi. Il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) provvede alla conferma di diagnosi di tutti i casi denunciati. Tutti i dati relativi allo svolgimento di questa attività sono raccolti in un archivio informatico dedicato. Al Laboratorio di Parassitologia sono inoltre affidati compiti consultivi, di indirizzo, di coordinamento, di formazione e di aggiornamento in ambito malariologico per le diverse amministrazioni regionali.

Tabella 1. Tappe storiche della malariologia

1666-1698	Sydenham e Morton in Inghilterra evidenziano l'efficacia specifica della corteccia di china nella cura di alcune forme febbrili
1712	Torti in Italia descrive l'azione specifica della corteccia di china sulle febbri intermittenti
1717	Lancisi avanza il sospetto che la malaria sia causata da microrganismi
1735	Condamine, capo di una spedizione francese in Perù, identifica l'albero di china come "Quina-quina"
1742	Linneo dà il nome di Chincona alla pianta
1820	Pelletier e Caventou in Francia isolano gli alcaloidi chinina e cinchonina dalla corteccia di china
1880	Laveran in Algeria osserva nel sangue di pazienti febbricitanti quelle forme che più tardi saranno riconosciute come forme sessuate del plasmodio
1885	Marchiafava e Celli sviluppano ulteriormente la scoperta e dimostrano che il parassita da loro chiamato <i>Plasmodium</i> , accrescendosi nel globulo rosso trasforma l'emoglobina in pigmento nero e si divide poi in piccoli corpiccioli che invadono altri globuli rossi
1886	Golgi descrive <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i>
1889	Marchiafava e Celli descrivono <i>P. falciparum</i>
1898	Ross descrive il ciclo di infezione malarica negli uccelli trasmessa da zanzare del genere <i>Culex</i> in India
1898	Grassi identifica le zanzare del genere <i>Anopheles</i> come vettori della malaria umana
1898	Grassi, Bastianelli e Bignami danno la prima descrizione dello sviluppo dei parassiti malarici nell'uomo
1901	Grassi intravede l'esistenza di un terzo ciclo, quello esoeritrocitario
1922	Stephens descrive <i>P. ovale</i>
1924	Inizio dello sviluppo di antimalarici sintetici per fare fronte alla scarsità di corteccia di china
1934	Raffaele descrive l'esistenza del ciclo esoeritrocitario (che si svolge nel reticolo endoteliale) nella malaria aviaria
1934	Sviluppo della cloroquina in Germania
1944	Sviluppo del Proguanil in Inghilterra
1946	Definizione da parte di Missiroli del piano quinquennale (1947-1951) di lotta antimalarica con DDT in Italia
1948	Shortt e Garnham dimostrano che nella malaria umana gli sporozoiti raggiungono il parenchima epatico per il primo ciclo di sviluppo

ATTUALITÀ DELLA MALARIA IN ITALIA

Cenni di storia recente

Ancora nel XIX secolo la malaria era molto comune in Italia ed era presente in buona parte delle aree costiere del Paese. Nel 1844 la prevalenza di questa parassitosi raggiungeva il 70% (2). Nella prima metà del secolo successivo, grazie alla disponibilità del chinino di Stato e alla bonifica di grandi aree palustri, la trasmissione malarica fu drasticamente ridotta e contenuta entro livelli accettabili (2). Durante il periodo 1906-1915, la situazione epidemiologica della malaria in Italia fu relativamente stazionaria con tassi di morbosità tra il 34 e il 18 per mille. Nel periodo corrispondente alla prima guerra mondiale (1915-1920) fu registrato un picco con tassi compresi tra il 41 e il 30 per mille. Tra il 1921 e il 1940 la morbosità discese lentamente, ma costantemente, con un'accelerazione del trend durante il periodo 1936-1940, quando il tasso toccò il 12 per mille. Era il momento della realizzazione delle grandi opere di bonifica integrale e di programmi di sviluppo agricolo che riducevano i focolai larvali dei vettori. Durante la seconda guerra mondiale il numero di casi di malaria aumentò drammaticamente. Molte aree, prevalentemente dell'Italia centrale, tornarono ad essere focolai anofelici come cento anni prima (3) anche a causa della distruzione delle opere di bonifica effettuata dalle truppe tedesche in ritirata, per rallentare l'avanzata degli alleati. Nel 1945 la morbosità malarica raggiunse il valore del 45 per mille, il più elevato del secolo. La situazione rimase grave nel periodo 1946-47 con tassi di morbosità intorno al 40 per mille ed un numero stimato di casi di circa 400.000 all'anno.

Per quanto riguarda la mortalità per malaria bisogna tenere conto della distribuzione territoriale delle specie parassitarie. La quasi totalità di decessi per malaria erano confinati alle regioni dove era presente *P. falciparum*: Sardegna, Sicilia, Calabria e in generale al centro Italia, con minore frequenza nel Lazio e Toscana, sporadicamente nel Nord. Tra il 1906-1911 il tasso di mortalità oscillò tra il 70 e il 50 per mille, seguito da un aumento notevole tra il 1915-1917 in cui superò il 150 per mille. A partire dal 1919 la mortalità per malaria ridiscese ai valori precedenti intorno al 50 per mille. Tra il 1930 e il 1935 fu raggiunto un plateau intorno al 35 per mille, seguito da una rapida discesa tra il 1935 e il 1947. È da notare che in quest'ultimo periodo non vi fu corrispondenza tra la curva di mortalità e quella di morbosità, grazie all'introduzione sul mercato farmaceutico mondiale di nuovi farmaci antimalarici di sintesi: Atebrina, Mepacrina, Plasmochina, ecc., più efficaci e meglio tollerati del chinino.

Nell'immediato dopoguerra venne sperimentato per la prima volta il DDT nella lotta antianofelica. Gli eccellenti risultati ottenuti in studi pilota, condotti in Italia centrale prima dall'esercito degli Stati Uniti e poi dall'Istituto Superiore di Sanità, portarono alla definizione di un programma quinquennale di lotta contro la malaria, basato su un singolo ciclo di trattamenti murali con 2 g di DDT per m² di tutti i fabbricati presenti nelle zone di endemia. La campagna iniziò nel 1947 e, nel breve arco di un anno, portò all'interruzione della trasmissione della malaria da *P. falciparum* su tutto il territorio nazionale (4). Il periodo 1948-1950 è dunque caratterizzato da un rapido "crollo" della morbosità. L'ultimo focolaio endemico di *P. vivax* fu riportato a Palma di Montechiaro (AG) nel 1956 (5), seguito da pochi casi sporadici nel 1962, sempre in Sicilia, in provincia di Palermo (6). Il 17 novembre 1970 l'organizzazione Mondiale della Sanità incluse ufficialmente l'Italia tra le nazioni libere da malaria. Da allora quasi tutti i casi di malaria registrati nel nostro Paese sono stati casi di importazione, cioè contratti all'estero in zone di endemia.

Nel 1997, in provincia di Grosseto, si è verificato un caso di malaria autoctona trasmesso da vettori indigeni, il primo e unico dopo l'eradicazione della malaria dal nostro Paese (7).

Classificazione dei casi

I casi di malaria sono classificati secondo la provenienza in accordo con la terminologia adottata dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità (8): un caso di malaria è 'importato' se l'infezione è stata acquisita al di fuori della zona in cui viene diagnosticata e 'autoctono' se è stata contratta localmente. I casi autoctoni, a loro volta, si definiscono come:

1. *indotti*, se dovuti a trasfusione sanguigna (malaria trasfusionale) o a un'altra forma di inoculazione parenterale (scambi di siringa tra tossico dipendenti o eventi accidentali);
2. *introdotti*, se associati alla puntura di una zanzara. Se la zanzara è stata accidentalmente importata da zone di endemia può dare origine a un caso di malaria definito "aeroportuale" o "da bagaglio", a seconda se il caso si sia manifestato in prossimità di un aeroporto internazionale o altrove; se la zanzara è indigena può dare origine ad un caso secondario di malaria dopo essersi infettata su un portatore di gametociti proveniente dall'estero.
3. *criptici*, se i casi di malaria autoctona sono contratti con modalità non definibili dall'inchiesta epidemiologica.

Lineamenti generali della malaria d'importazione

Il problema della malaria di importazione cominciò a presentarsi concretamente in Italia alla fine degli anni '70. Infatti fino ad allora il numero di casi era sempre stato inferiore a 50 l'anno, ma a partire dal 1976 si registrò un incremento improvviso che raggiunse, nel 1978, un picco di 243 casi/anno, a causa del notevole afflusso di profughi provenienti in gran parte dal Sud-Est asiatico (9) (Figura 1).

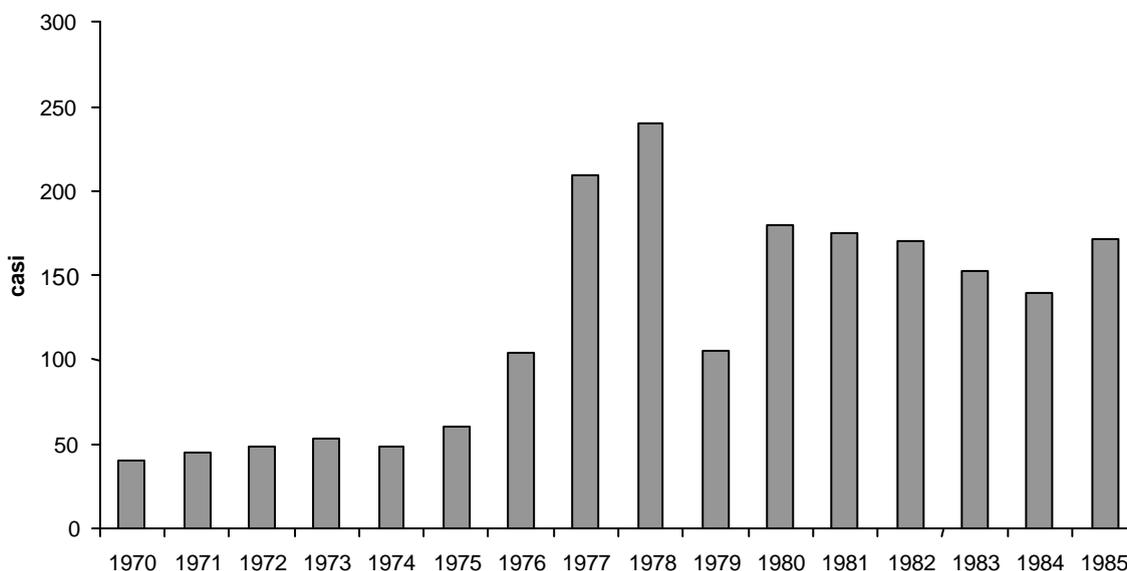


Figura 1. Casi totali di malaria notificati in Italia (1970-1985)

Tra il 1979 e il 1984 il numero totale dei casi subì un decremento sostanziale con oscillazioni intorno ai 100 casi/anno. A partire dagli anni 1985-1986 fino al 1999, si è registrato un continuo, costante aumento dei casi di importazione (10-12), mentre nel 2000 si è registrata la prima inversione di tendenza degli ultimi 15 anni. L'analisi particolareggiata della casistica 1986-2000 è presentata e discussa di seguito.

Analisi del decennio 1986-1996

Tra il 1986 ed il 1996 sono stati confermati dall'ISS 5.843 casi di malaria, la quasi totalità dei quali (99,6%) sono stati contratti in paesi tropicali e subtropicali ove la malaria è presente allo stato endemico. Diciassette casi si sono verificati in soggetti che non avevano mai visitato zone endemiche: 8 indotti – di cui 7 trasfusionali (13, 14) e 1 accidentale in un tossico-dipendente per scambio di siringa infetta; 9 introdotti – di cui 2 da aeroporto (15) e 7 definiti criptici in quanto non è stata accertata la modalità del contagio, probabilmente dovuti alla puntura di zanzare infette giunte in Italia con aeromobili, bagagli o carichi commerciali (16-18).

Il 57,8% (n. = 3.580) dei casi totali è stato registrato in cittadini italiani; di questi, il 5,5% (195 casi) si è manifestato in militari rientrati dalle missioni di pace delle Nazioni Unite in Somalia e Mozambico tra il 1993 e il 1995. Dall'analisi dei casi verificatisi nel decennio tra i cittadini italiani (Figura 2) si rileva un iniziale rapido aumento, da 163 casi nel 1986 a 369 nel 1989, con una successiva stabilizzazione al disotto dei 400 casi annui, ad eccezione del biennio 1993-1994 in cui le missioni effettuate dai nostri soldati in Africa hanno determinato un sensibile aumento del numero di casi. Il 47% dei cittadini italiani si erano recati all'estero per turismo, il 46% per lavoro, mentre il 7% rientravano temporaneamente in Italia essendo residenti nelle zone di endemia. I Paesi nei quali i cittadini italiani hanno contratto la malaria sono 56: 39 in Africa, 7 in Asia, 8 in Centro e Sud America, 1 in Oceania (Papua Nuova Guinea) e 1 in Europa (Turchia). I principali Paesi per numero di casi sono risultati il Kenya (14,8%), la Costa d'Avorio (8,8%) e la Nigeria (5,3%).

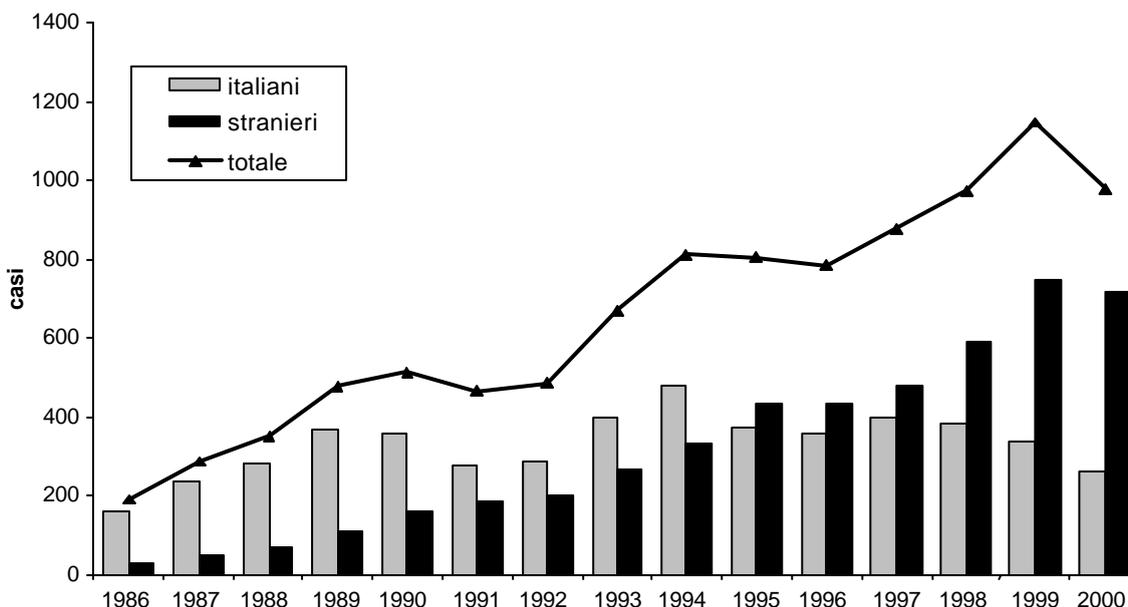


Figura 2. Andamento dei casi di malaria notificati in Italia (1986-2000)

Il 42,2% (n. = 2.263) dei casi totali del decennio riguarda invece cittadini stranieri. I casi verificatisi tra gli stranieri sono stati in costante aumento, essendo passati dai 28 del 1986 ai 432 del 1996 (vedi Figura 2). A partire dal 1995 il numero di casi di malaria verificatisi tra stranieri ha superato quello dei casi tra cittadini italiani (431 contro 370). L'incremento è dovuto essenzialmente all'aumento del flusso immigratorio dai paesi africani verificatosi in Italia in questi ultimi anni.

Negli italiani, il maggiore numero di casi (14,6%) è stato registrato nel mese di gennaio, periodo che segue quello di maggiore flusso turistico per ferie natalizie trascorse in Paesi tropicali. Negli stranieri invece, il maggiore numero di casi è stato registrato nel mese di settembre (28,6%), periodo che segue quello di visita nei paesi di origine. Il maggior numero di casi di malaria è stato notificato nelle regioni del Nord Italia e nel Lazio. In Lombardia (26,4%), in Veneto (20,7%), nell'Emilia Romagna (11,6%) e nel Lazio (13%), sono stati notificati complessivamente i 2/3 dei casi di malaria totali. Negli ultimi anni si è osservato un incremento del numero delle notifiche dalle regioni insulari. *P. falciparum* è stato l'agente eziologico responsabile del maggior numero di infezioni (73,3%), seguito da *P. vivax* (20%), *P. malariae* (2,8%) e *P. ovale* (2,0%); nell'1,9% delle infezioni sono state evidenziate più specie plasmodiali. Il maggior numero di infezioni (88,1%) sono state contratte in Africa, dove predomina *P. falciparum* (82,2% dei casi). In Asia, Sud America e Oceania predomina invece *P. vivax*, rispettivamente con l'81,4%, il 72% e il 76,2% dei casi.

Nel decennio 1986-1996 si sono verificati 48 decessi per malaria (Figura 3). 44 dei deceduti erano di nazionalità italiana, recatisi nella gran parte dei casi (51,2%) in Kenya per turismo. La letalità media nel periodo riportato è stata dell'1,9%. La distribuzione dei decessi per anno ha un andamento pressoché costante fino al 1995, mentre il 1996 risulta anomalo in quanto non si sono verificati decessi.

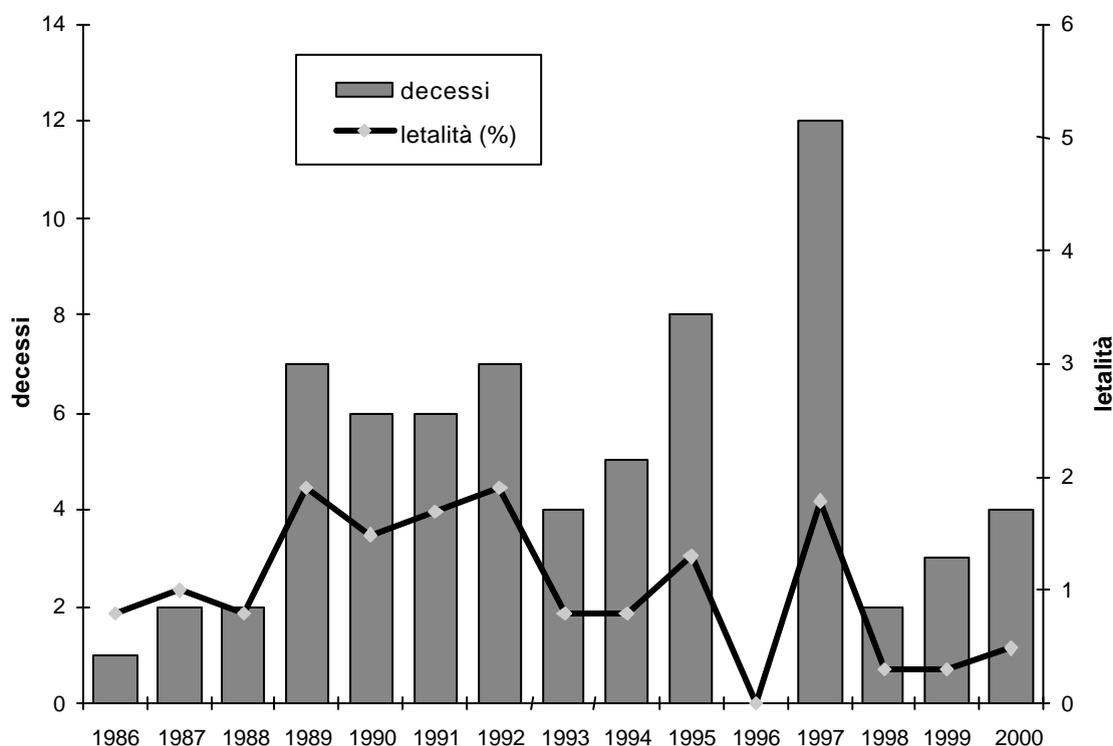


Figura 3. Numero di decessi dovuti a *P. falciparum* e tasso di letalità in Italia (1986-2000)

Nel maggior numero delle infezioni sostenute da *P. falciparum* la sintomatologia si è manifestata prima del rientro in Italia (13,4%) o entro la prima settimana dal rientro (45,8%), mentre per le infezioni in cui erano coinvolte le altre specie plasmodiali la latenza si è allungata spesso oltre le 5 settimane. Il tempo medio intercorso tra inizio della sintomatologia e l'effettuazione della diagnosi emoscopica è stato di 8,3 giorni, ma nel secondo quinquennio si è accorciato a 6 giorni e la diagnosi microscopica nel 78,6% dei casi è stata effettuata entro il primo giorno dopo il ricovero ospedaliero. Ciò indicherebbe un più tempestivo ricorso alle cure mediche da parte dei viaggiatori che manifestano sintomatologia febbrile al rientro in Italia.

Nelle terapie dei casi da *P. falciparum*, la meflochina è risultato in assoluto il farmaco più utilizzato (35,1%), seguito da chinino (17,%) e cloroquina (14,4%). L'associazione di chinino con tetraciclina è poco usata (10,9%), mentre nel restante 22,6% dei casi sono stati utilizzati altri farmaci antimalarici o altre combinazioni farmacologiche. Dei soggetti con infezioni da *P. vivax* e *P. ovale*, solo il 32,3% hanno ricevuto il trattamento radicale con primachina e sono state osservate 92 recidive corrispondenti al 9,1% delle infezioni da *P. vivax*.

Nel 77,3% dei casi l'identificazione della specie plasmodiale effettuata dai presidi sanitari locali è stata confermata dall'ISS, nell'8,8% dei casi l'identificazione è invece risultata errata e nel restante 13,9% dei casi i sanitari hanno rinunciato all'identificazione della specie plasmodiale. In 38 casi (4,7%) il vetrino con lo striscio ematico non è stato allegato alla scheda di notifica. L'identificazione delle specie plasmodiali responsabili delle infezioni sembra dunque presentare ancora difficoltà per il personale sanitario influenzando sulla adeguatezza della terapia rispetto all'agente eziologico in causa.

Casistica 1997-2000

Nel 1997 il numero totale dei casi è stato di 885, di cui 408 (46%) tra cittadini italiani e 477 (54%) tra cittadini stranieri (vedi Figura 2). I casi di importazione sono stati 883 e quelli di malaria autoctona 2 (12). Di questi uno è stato un caso di inoculazione accidentale verificatosi in ambiente ospedaliero a carico di personale sanitario (19), l'altro un caso di malaria introdotta, il primo in Italia dal dopoguerra trasmesso da una anofele indigena (7). Quest'ultimo caso, dovuto a *P. vivax*, si è verificato in provincia di Grosseto ed è stato causato da una zanzara anofele infettatasi su un portatore di gametociti proveniente dall'India. Nel 1997 la mortalità, sebbene nella media, è stata piuttosto elevata: 12 decessi, di cui 10 tra cittadini italiani e 2 tra immigrati africani, con una letalità dell'1,8% (vedi Figura 3).

Nel 1998 il numero totale dei casi è stato di 973, di cui 385 (40%) tra cittadini italiani e 588 (60%) tra cittadini stranieri (vedi Figura 2). I casi sono stati tutti di importazione (20). Nel 1998 ci sono stati due soli decessi dovuti a *P. falciparum*, con una letalità dello 0,25% (vedi Figura 3).

Nel 1999 il numero totale dei casi è stato di 1.083, di cui 337 (31%) tra cittadini italiani e 746 (69%) tra cittadini stranieri (vedi Figura 2). I casi sono stati tutti di importazione con l'esclusione di un caso da *P. falciparum* dovuto a trasfusione di sangue (20). Nel 1999 ci sono stati 3 decessi, con una letalità dello 0,3% (vedi Figura 3).

Nel 2000, come già detto, si è osservata una riduzione percentuale dei casi di malaria di circa il 10% rispetto all'anno precedente (20). Il numero totale dei casi è stato di 977, di cui 263 (27%) tra cittadini italiani e 714 (73%) tra cittadini stranieri (vedi Figura 2). I casi sono stati tutti di importazione con l'esclusione di un caso accidentale da *P. falciparum* contratto in ambiente ospedaliero. Nel 2000 ci sono stati 4 decessi, con una letalità dello 0,5% (vedi Figura 3).

In quest'ultimo quadriennio, la diagnosi di specie plasmodiale effettuata dai presidi sanitari locali è stata confermata dall'ISS nell'81,5% dei casi, l'identificazione è risultata errata nel 7% dei casi e nel restante 11,5 % i sanitari hanno omesso l'identificazione della specie.

Nell'ultimo decennio si è assistito a una recrudescenza della malaria nel mondo. In Italia il numero dei casi notificati è stato in costante aumento fino al 1999, con una lieve flessione nel 2000. Ha contribuito a determinare questo andamento il crescente volume di traffico di passeggeri intercontinentali, sia della componente di popolazione italiana che si sposta per turismo o per lavoro, sia della sempre più numerosa quota di immigrati che periodicamente rientrano per un breve soggiorno nel loro Paese di origine. Sulla base di dati ISTAT, la distribuzione percentuale per origine degli immigrati evidenzia una provenienza dall'Europa per il 47,4%, dall'Africa per il 25,7%, dalle Americhe per il 14,2% e dall'Asia per il 12,7%. Tale composizione è ovviamente soggetta a continue modifiche in relazione a fattori economici e politici presenti nei Paesi d'origine: la presenza africana infatti nell'ultimo decennio si è quintuplicata. Tra i casi di malaria notificati in Italia negli stranieri nell'ultimo decennio, l'88,0% si è manifestato in soggetti originari di Paesi africani, l'11,3% dall'Asia, lo 0,5% dal continente americano e lo 0,2% dall'Oceania. In particolare, l'aumento dei casi di malaria osservato nel 1997-1999, dopo alcuni anni di sostanziale equilibrio, risulta legato all'incremento dei casi registrati tra i cittadini stranieri, rimanendo pressoché stabile, o addirittura in diminuzione, il numero dei casi tra cittadini italiani (12, 20). Nel 2000, il divario dei casi tra cittadini italiani e stranieri si è ancora più accentuato (20). Viene dunque confermato l'andamento del decennio 1986-1996 che ha visto un aumento costante dei casi di malaria tra cittadini stranieri, principalmente di nazionalità africana. La diminuzione dei casi totali riportata nel 2000 potrebbe essere casuale o forse rappresentare una inversione del trend che andrà confermata nei prossimi anni.

Il numero di viaggiatori italiani che non effettuano la profilassi antimalarica rimane comunque alto in maniera allarmante, mentre tendono ad accorciarsi i tempi medi di diagnosi che rimangono comunque piuttosto lunghi in assoluto. L'identificazione delle specie plasmodiali sembra infine presentare ancora difficoltà per il personale sanitario, influenzando sull'adeguatezza della terapia dell'agente eziologico e quindi sulla prognosi del caso.

PLASMODI DELLA MALARIA UMANA

Inquadramento sistematico

Gli agenti eziologici della malaria sono protozoi appartenenti al Phylum Apicomplexa, Classe Sporozoa, Sottoclasse Coccidia, Ordine Eucoccidiida, Sottordine Haemosporina, Famiglia Plasmodiidae. I protozoi appartenenti al genere *Plasmodium* si sono differenziati dagli altri protozoi del phylum Apicomplexa (piroplasmidi e coccidi) alcune centinaia di milioni di anni fa, probabilmente prima del Cambriano. Se ne conoscono più di cento specie di cui 4 interessano l'uomo: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. L'adattamento di queste 4 specie all'uomo è avvenuto indipendentemente nel tempo. *P. falciparum*, pur essendo probabilmente la specie più anticamente adattata all'uomo, è il più virulento, forse perché diffusosi dai focolai d'origine solo in tempi relativamente recenti. Filogeneticamente *P. falciparum* è più vicino a *P. reichenowi*, parassita degli scimpanzé, piuttosto che a *P. malariae* e *P. vivax* (21, 22).

Caratteristiche biologiche

I plasmodi della malaria sono parassiti dixerici (completano il loro ciclo vitale tra un ospite vertebrato e uno invertebrato) dotati di notevole specificità parassitaria. Si moltiplicano per schizogonia (divisione multipla per mitosi del nucleo seguita da divisione cellulare) nelle cellule del parenchima epatico (ciclo pre-eritrocitario) e poi nei globuli rossi (ciclo eritrocitario); qui si formano anche i gametociti che, ingeriti dall'insetto vettore, maturano a gameti nello stomaco e si accoppiano originando uno zigote mobile (oocinete). Segue la formazione di un'oocisto con numerosi sporozoitici (ciclo sporogonico) che raggiungono le ghiandole salivari e da qui vengono iniettati all'uomo. Nella maggior parte del loro ciclo vitale questi protozoi sono aploidi in quanto la meiosi avviene subito dopo la fecondazione (23).

Ciclo biologico e morfologia dei plasmodi

Ciclo pre-eritrocitario

La forma infettante del parassita è lo sporozoita, che viene iniettato all'ospite vertebrato da una femmina infetta di un dittero ematofago appartenente alla Sottofamiglia Anophelinae. Gli sporozoitici hanno una forma affilata e sono lunghi 12-15 μm . Circolano nel sangue per meno di un'ora, quindi raggiungono le cellule del parenchima epatico. L'invasione di queste cellule è mediata dall'interazione della proteina circumsporozoitica (CS) del parassita e da recettori specifici dell'epatocita. All'interno di queste cellule, la maggioranza dei parassiti inizia a moltiplicarsi per schizogonia producendo così dei grossi schizonti epatici che, dopo un periodo di maturazione di 5-11 giorni, a seconda della specie considerata, arrivano a contenere migliaia di merozoitici. Questi ultimi sono mononucleati e caratterizzati dalla presenza di un complesso apicale rigido, il conoide, che permette la penetrazione nei globuli rossi, iniziando così il ciclo eritrocitario del parassita. Con queste modalità lineari procede l'infezione di *P. falciparum* che può provocare recrudescenze (ripresa delle manifestazioni cliniche dopo l'attacco primario della

malattia dovute a parassiti ancora presenti nel sangue) entro tempi relativamente brevi, ma non recidive (ripresa delle manifestazioni cliniche dopo mesi dall'attacco primario dovute a parassiti nel fegato) della malattia. *P. malariae*, può dare origine a recrudescenze anche a distanza di anni. Le recidive si osservano al contrario in *P. vivax* e *P. ovale* per i quali è stato dimostrato che alcuni sporozoi penetrati negli epatociti si trasformano in una forma quiescente, l'ipnozoita che, dopo un periodo di latenza variabile, riprende a svilupparsi in schizonti epatici, costituendo così la vera fonte delle recidive (24).

Ciclo eritrocitario

La penetrazione dei merozoiti nei globuli rossi è dovuta al riconoscimento di particolari recettori di superficie. Dopo l'invasione i parassiti si trasformano in trofozoiti ameboidi, mononucleati, con un grosso vacuolo digestivo e attiva sintesi di DNA. Si accrescono metabolizzando, per glicolisi anaerobica, il glucosio del sangue utilizzando ATP e fattori di crescita presenti nell'eritrocita. La fonte di azoto è rappresentata dalla parte proteica dell'emoglobina la cui grossa molecola viene pinocitata attraverso un microporo di 0,1 μ a funzione di citostoma, e introdotta nel vacuolo digestivo. Un pigmento ferroporfirinic, emozoina, si accumula in forma granulare nel citoplasma dei parassiti. Il trofozoita si accresce occupando quasi tutto l'eritrocita, diminuisce il vacuolo digestivo e si trasforma in schizonte andando incontro a una serie di divisioni binarie del nucleo. I nuovi nuclei, in numero da 6 a 32 a seconda della specie, si dispongono a rosetta. A questo punto l'eritrocita si gonfia ed esplose, liberando i merozoiti che vanno ad infettare altri eritrociti dando origine a cicli addizionali di schizogonia. Il pigmento viene fagocitato dai leucociti e dalle cellule epiteliali depositandosi soprattutto nella milza e nel midollo osseo. Lo sviluppo dei parassiti è generalmente sincrono e perciò la rottura dei globuli rossi è simultanea provocando il parossismo malarico con febbre, brividi, e sudorazione associate al rilascio di tossine da parte del parassita. Tale parossismo si ripete periodicamente dopo tempi corrispondenti alle velocità del ciclo schizogonico nelle differenti specie e precisamente: ogni 48 ore per *P. falciparum* (terzana maligna), *P. vivax* (terzana benigna), e *P. ovale*; ogni 72 ore per *P. malariae* (quartana). Dopo vari cicli schizogonici ematici alcuni merozoiti danno origine alle forme sessuate del parassita, i gametociti, i quali aumentano gradualmente di volume senza subire divisioni nucleari. Il genoma aploide del merozoita può originare sia gametociti femminili (macrogametocita) che maschili (microgametocita) che rimangono avvolti dalla membrana dell'eritrocita. La produzione dei gametociti segue ritmi circadiani per poter infettare le zanzare, coincidendo con il periodo di attività del vettore (24).

Recettori di superficie e fattori interni, associati per lo più ad anomalie genetiche del globulo rosso possono determinare una resistenza naturale alla malaria. Un esempio del primo gruppo sono popolazioni africane Duffy negative resistenti a *P. vivax*. Infatti solo la presenza di questi recettori permette la penetrazione del parassita. Esempi del secondo gruppo sono individui portatori di anomalie genetiche come G6PD deficienza, talassemia, anemia falciforme. In questo ultimo gruppo, si ritiene che l'infezione da *P. falciparum* abbia operato una selezione in popolazioni di aree endemiche che ha portato un equilibrio tra omozigoti normali, sensibili alle infezioni, e anormali, portatori di anomalie genetiche letali. Il genotipo favorito è perciò l'eterozigote parzialmente resistente a *P. falciparum* e che non manifesta il carattere letale.

Ciclo sessuato e sporogonico nell'anofele

I vettori di malaria sono zanzare appartenenti al genere *Anopheles*. Quando un anofele punge una persona infetta, le forme sessuate del plasmodio (gametociti) presenti nel sangue escono dai globuli rossi nello stomaco della zanzara. Sono queste le uniche forme che sopravvivono alla digestione. Il nucleo del microgametocita va incontro a numerose divisioni mitotiche mentre, dal citoplasma, emergono strutture a forma di flagelli di 20-25 μ in ognuno dei quali migra un nucleo (esflagellazione) formando microgameti che si staccano dal corpo residuale. Il macrogametocita si trasforma in macrogamete maturo che attira chemiotatticamente i microgameti uno dei quali lo feconda (da 20 minuti a 2 ore dopo il pasto di sangue). Si forma lo zigote che assume una forma vermicolare detta oocinete che interagendo con la membrana peritrofica del pasto di sangue si apre la strada tra le cellule epiteliali dello stomaco della zanzara e si installa tra esse e la membrana elastica che copre lo stomaco. Qui il parassita assume forma sferoidale, subisce una divisione meiotica e si trasforma in oocisti (48 ore dopo il pasto di sangue). L'oocisti si accresce in funzione della temperatura e dell'umidità esterna (valori medi per la temperatura 20-30 °C e per l'umidità 60%) raggiungendo 48-80 μ di diametro. Il nucleo si divide attivamente formando 10.000 sporozoiti mobili che rompono la parete dell'oocisti e della lamina basale e sono rilasciati nell'emocele da dove raggiungono le ghiandole salivari e da qui sono iniettati nell'ospite vertebrato (24).

Plasmodium falciparum

P. falciparum è la specie più comune nelle zone tropicali e subtropicali, occasionalmente nelle zone temperate (da cui questo plasmodio è praticamente scomparso in seguito a programmi di eradicazione). Questo protozoo è l'agente eziologico della malaria cosiddetta "terzana maligna", la forma più grave, perché può essere letale. La gravità della malattia dipende dall'eccezionale capacità moltiplicativa del parassita (elevato numero dei merozoiti prodotti sia da schizonti epatici che eritrocitari). Si osservano frequentemente infezioni multiple dello stesso eritrocita. Inoltre il parassita modifica la superficie dei globuli rossi che risulta ricoperta da tubercoli i quali aderiscono alle cellule endoteliali. Per questo motivo i trofozoiti si concentrano nei capillari degli organi interni (cervello, cuore, milza, ecc.) dove inizia la schizogonia. Nello striscio di sangue generalmente si osservano solo i trofozoiti e/o gametociti; gli schizonti sono presenti nelle fasi precomatose. Il periodo di incubazione va generalmente da 9 a 19 giorni. Il ciclo schizogonico ematico si completa in 48 ore e gli accessi febbrili si ripetono quindi ogni terzo giorno; tuttavia il ritmo di moltiplicazione ha tendenza a sdoppiarsi e spesso i parossismi malarici dell'attacco primario si susseguono a ritmi più ravvicinati e irregolari. Raramente l'infezione dura più di 12-18 mesi e praticamente mai più di 2 anni. Il ciclo nella zanzara si completa in 10-11 giorni alla temperatura ottimale di 30 °C e non si compie sotto i 20 °C.

Plasmodium vivax

È la specie a più ampia distribuzione presente anche nelle zone temperate. I livelli di parassitemia raggiunti da *P. vivax* nell'uomo sono assai inferiori a quelli che può raggiungere *P. falciparum*. È l'agente eziologico della malaria cosiddetta "terzana benigna", responsabile di circa il 40% dei casi di malaria nel mondo; è praticamente assente in Africa occidentale; le sue

infezioni sono caratterizzate da frequenti ricadute, ma la malattia è raramente letale. Il periodo di incubazione va generalmente dai 12 ai 18 giorni (o fino a 6 mesi). Il ciclo schizogonico ematico si completa in 48 ore; perciò durante la malattia gli accessi febbrili si susseguono ogni terzo giorno. Le recidive che si originano da forme dormienti nel fegato (ipnozoiti) sono frequenti, ma praticamente tutte le infezioni si esauriscono entro i tre anni. Tutte le forme ematiche sono visibili nello striscio di sangue. Il ciclo nella zanzara è di 11 giorni alla temperatura ottimale di 25 °C.

Plasmodium ovale

È presente principalmente in Africa tropicale e occasionalmente nell'Oceano Indiano e nel Pacifico occidentale (Papua e Nuova Guinea). È responsabile di una assai bassa percentuale dei casi di malaria nel mondo. Il periodo di incubazione va generalmente dai 16 ai 18 giorni (o per anni). Gli accessi febbrili si ripetono ogni 48 ore. La malattia che provoca è del tutto simile a quella da *P. vivax*, ma questo tipo di zanzara è più benigno. Generalmente la parassitosi si estingue al termine della serie di accessi che caratterizza il primo attacco.

Plasmodium malariae

Ha la stessa distribuzione di *P. falciparum* ma è molto meno frequente. È l'agente eziologico della malaria cosiddetta "quartana", che si manifesta generalmente dopo un mese dall'inoculazione. È responsabile di circa il 5% dei casi di malaria nel mondo. Il periodo di incubazione va generalmente dai 18 ai 40 giorni ma può raggiungere alcuni anni. Durante gli attacchi, l'accesso febbrile si verifica ogni 72 ore. Terminato l'attacco primario, le ricadute sono assai frequenti. La malattia ha un andamento generalmente benigno, ma alcune infezioni si riattivano periodicamente per più di 40 anni. Sembra che ciò sia dovuto al ridestarsi di forme ematiche del parassita come dimostrerebbe l'alta frequenza di infezioni trasfusionali da *P. malariae* (recrudescenze). Tutte le forme ematiche sono visibili nello striscio di sangue. Il ciclo sporogonico nella zanzara si compie in circa 25 giorni alla temperatura ottimale di 22 °C.

Alcune caratteristiche tipiche dell'infezione dovuta ai differenti plasmodi umani sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche dell'infezione da differenti plasmodi umani

Caratteristica	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
Ciclo pre-eritrocitario (giorni)	6-7	14-16	7-8	9
N. approssimativo merozoiti per schizonte epatico	40.000	2.000	>10.000	15.000
Ciclo eritrocitario (ore)	48	72	48	48
N. merozoiti per schizonte ematico (media)	8-32 (16)	8-12 (8)	8-24 (16)	4-8 (6)
Parassitemia (per mm ³)				
valore medio	>100.000	6.000	20.000	90.000
valore massimo	2.000.000	2.0000	50.000	300.000
Recrudescenze in tempi	brevi	anche molto lunghi	---	---
Recidive	no	no	sì	sì

DIAGNOSI DI MALARIA

La diagnosi clinica della malaria deve essere seguita dalla conferma diagnostica con test di laboratorio. L'identificazione del parassita malarico viene comunemente effettuata su preparati microscopici di sangue periferico: lo striscio sottile e la goccia spessa (25). La diagnosi emoscopica, per la sua semplicità, economicità e rapidità di risposta, rappresenta ancora il metodo standard per la diagnosi di malaria, tuttavia da diversi anni sono disponibili altre tecniche, alcune delle quali standardizzate in kit commerciali, che hanno lo scopo di rendere più semplice e rapida la diagnosi anche per personale non specializzato. Quelli di maggior interesse sono certamente i test cosiddetti immunocromatografici o immunoenzimatici (26) che sono indirizzati prevalentemente alla diagnosi rapida di *P. falciparum*, l'unica specie che determina una infezione che può evolvere in forme gravi o complicate. È comunque buona regola confermare, appena possibile, le diagnosi effettuate con tecniche alternative con l'osservazione diretta del parassita.

Tecniche più recenti, quali i test molecolari trovano, per il momento, il loro massimo impiego in diversi campi della ricerca e solo in alcuni casi possono rappresentare un valido supporto diagnostico all'esame emoscopico.

Le tecniche diagnostiche per la malaria possono quindi essere riunite, nel loro complesso, in 5 gruppi:

- *metodi diretti*
 1. Diagnosi microscopica di preparati ematici
 2. Il metodo QBC
 3. Test immunocromatografici
 4. Test molecolari
- *metodi indiretti*
 5. Test immunologici

Di seguito vengono trattate singolarmente le diverse tecniche. Un particolare approfondimento verrà dedicato alla diagnosi microscopica.

Diagnosi microscopica di preparati ematici

Allestimento e colorazione dei preparati

Una corretta preparazione della goccia spessa e dello striscio permette di determinare parassitemie anche molto basse e di valutare con precisione la densità parassitaria. Il prelievo deve essere fatto prima che il paziente inizi il trattamento terapeutico tenendo presente che i parassiti sono generalmente più numerosi nel sangue qualche ora dopo l'inizio dell'accesso febbrile. Per ogni individuo si deve allestire almeno una goccia spessa per la ricerca del parassita e uno striscio per l'identificazione della specie (25).

Il prelievo viene fatto nell'adulto dal polpastrello, nei bambini al di sotto dei sei mesi, dal tallone. Lo striscio deve essere uniforme e sottile. Condizioni per la buona riuscita di uno striscio sono: la pulizia scrupolosa dei vetrini (che devono essere privi di tracce di grasso e di impronte digitali), le ridotte dimensioni della goccia di sangue e la rapidità della strisciata. Gli strisci che non vengono subito utilizzati devono essere tenuti al riparo dalla polvere ed essere colorati nel giro di pochi giorni. Per eseguire un preparato in goccia spessa si dispongono su un

vetrino portaoggetti 23 gocce di sangue che vengono distribuite con l'aiuto dell'angolo di un altro vetrino su una superficie circolare di circa 1 cm². Si lascia asciugare per alcune ore, al riparo dalla polvere e dagli insetti, eventualmente in termostato. Bisogna tenere presente che i migliori preparati si ottengono colorando da 6 a 12 ore dopo l'allestimento, ma in termostato a 37 °C sono sufficienti un paio d'ore.

Striscio sottile

La colorazione più stabile e soddisfacente per l'evidenziazione di parassiti malarici nei preparati emoscopici è quella di Giemsa. Il colorante è formato da una soluzione in alcol e glicerina di eosinati di blu di metilene ed eosinati di azzurro di metilene, che diventano attivi sciolti in acqua o soluzione tampone. Il procedimento è il seguente:

1. fissazione dello striscio con alcol metilico per 30 s;
2. lavaggio con acqua corrente;
3. preparazione della soluzione Giemsa: 3 gocce di colorante puro per ogni ml di acqua distillata o soluzione tampone corrispondono ad una concentrazione del 10%. La soluzione di Giemsa non può essere conservata ma va preparata volta per volta nelle quantità d'impiego, tenendo presente che per ogni vetrino da colorare necessitano circa 3 ml di soluzione;
4. copertura dello striscio con la soluzione colorante preparata, per 20 min;
5. lavaggio con acqua corrente;
6. asciugatura all'aria.

Goccia spessa

La goccia spessa non va fissata onde permettere la lisi dei globuli rossi; lisi e colorazione possono essere effettuate contemporaneamente, trattando il preparato con una soluzione di Giemsa al 5%-10% in acqua distillata o tampone per 20 min, con l'accorgimento di rinnovare la soluzione che copre il preparato verso la metà di questo tempo di colorazione. Poi si sciacqua delicatamente con acqua distillata.

Colorazione rapida

Si copre il preparato con il colorante non diluito per 2 min. Si aggiunge la soluzione tampone, goccia a goccia, sopra il vetrino in modo tale da diluire progressivamente, nell'arco di 5 min, il colorante già versato, poi si sciacqua e si asciuga all'aria.

Ricerca dei parassiti e calcolo della parassitemia

Esame della goccia spessa

La determinazione della positività di un vetrino va fatta per regola sulla goccia spessa, osservandola con un obiettivo 100X ad immersione. La ricerca va protratta per cento buoni campi prima di giudicare un vetrino come negativo (è considerato un buon campo quello che contiene almeno 15-20 globuli bianchi) (25).

Anche la determinazione della parassitemia, in termini di numero di parassiti per microlitro (μl) di sangue, viene fatta su goccia spessa. Valutando in 8000 il numero medio di globuli bianchi per μl , si contano, con l'aiuto di un contacolpi, il numero di parassiti e di globuli bianchi contenuti in 10-20 buoni campi. Applicando la seguente formula si determina il numero di parassiti per μl di sangue:

$$\frac{\text{numero di parassiti} \times 8000}{\text{numero dei leucociti}} = \text{parassiti per } \mu\text{l}$$

Una valutazione molto più precisa si ottiene conoscendo con esattezza il numero di globuli bianchi del paziente.

Esame dello striscio

Sullo striscio sottile si dovrebbe effettuare solamente la diagnosi di specie. Dovendo comunque procedere alla determinazione della positività o negatività su striscio sottile in mancanza di goccia spessa, la ricerca va protratta per almeno 400 campi (sempre con obiettivo 100X) prima di giudicare il preparato come negativo. Qualora necessario, su striscio si può anche valutare la parassitemia percentuale, osservando almeno 100 campi e dopo aver valutato il numero medio di globuli rossi per campo.

Limiti di sensibilità dell'esame microscopico

Le alte parassitemie non sfuggono alla diagnostica tradizionale, mentre il problema si pone nei casi di bassa o addirittura bassissima parassitemia. La diagnosi microscopica dei parassiti malarici ha infatti una soglia di sensibilità di 10-20 parassiti per μl di sangue. Come noto, basse parassitemie possono essere presenti essenzialmente in tre situazioni cliniche:

1. infezione malarica in soggetti semi-immuni, che sviluppando una vigorosa reazione immunitaria impediscono una schizogonia massiva;
2. infezione malarica in soggetti non immuni in corso di profilassi, o in seguito a trattamento improprio o incompleto;
3. infezioni da *P. falciparum* molto sincronizzate: casi piuttosto rari in cui lo striscio periferico può essere negativo (parassitemia al di sotto della soglia) perché quasi tutti i plasmodi sono allo stadio di schizonte, sequestrati nei capillari degli organi interni e quindi assenti dal periferico, oppure perché vi è appena stata emolisi massiva dovuta alla rottura degli schizonti stessi e dell'emazia che li conteneva.

Nel secondo e nel terzo caso poter fare rapidamente diagnosi di malaria è essenziale, perché un risultato falsamente negativo può portare all'*exitus*. Anche nel primo caso una diagnosi rapida è comunque auspicabile, sia per alleviare un disagio anche grave durante l'attacco acuto, sia per evitare il rischio di forme di malaria cronica o evolutiva.

Nella casistica affluita al Laboratorio di Parassitologia dell'ISS per la conferma della diagnosi emoscopica nell'ultimo decennio, la parassitemia per *P. falciparum* è risultata inferiore a 400 parassiti/ μl (corrispondente a circa 1/10.000 globuli rossi) nel 22% dei casi e addirittura inferiore a 100 parassiti/ μl nel 3,8% dei casi.

Diagnosi differenziale dei Plasmodi

Come già detto, la diagnosi differenziale dei plasmodi si effettua su striscio sottile. Un utile ausilio alla diagnosi possono essere le tavole a colori edite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (27).

Per la corretta diagnosi di specie bisogna tenere presenti alcuni punti fondamentali:

1. I plasmodi sono parassiti endocellulari che svolgono l'intero ciclo di sviluppo schizogonico all'interno degli epatociti prima e dei globuli rossi poi. Solo le forme infettanti (sporozoiti) e quelle invasive di nuove cellule (merozoiti) possono trovarsi libere per brevissimo tempo, tanto che la loro osservazione su preparati ematici è da considerarsi pressoché impossibile.
2. Con i più comuni metodi di colorazione (Giemsa e May-Grunwald) l'emazia si colora omogeneamente di rosa, mentre il parassita si presenta con il citoplasma azzurro-violetto e la cromatina del nucleo che assume varie gradazioni di rosso. Spesso sono evidenti i granuli di pigmento che si colorano di bruno-scuro.
3. Durante il ciclo di sviluppo il parassita assume forme e dimensioni diverse con presenza di vacuoli nel citoplasma.
4. Nel citoplasma del parassita può esserci presenza di pigmento scuro.
5. Possono essere presenti granulazioni rossastre nel citoplasma delle emazie parassitate.
6. La forma e il colore dell'emazia parassitata possono variare. Il parassita può indurre delle modificazioni nel globulo rosso che lo contiene e questo può diventare ipertrofico, assumere forme ovali o allungate, decolorarsi o presentare sfrangiature.

Gli stadi di sviluppo del parassita malarico riscontrabili nel sangue periferico sono 3:

– Trofozoiti

Si presentano in tre forme diverse:

1. *ad anello*: è presente un vacuolo più o meno grande all'interno del citoplasma con il nucleo situato in posizione periferica. Sono forme precoci dei parassiti malarici
2. *compatta*: il nucleo è sempre in posizione più o meno periferica ed il vacuolo appare notevolmente ridotto. Sono forme adulte del parassita
3. *ameboide*: il citoplasma appare ripartito in più masserelle, simili a pseudopodi. Sono forme adulte del parassita malarico.

– Schizonti

Sono presenti almeno 3 masse distinte di cromatina (nuclei) nello stesso parassita. Si tratta di parassiti in fase di replicazione schizogonica, all'interno dei quali sono visibili i singoli merozoiti. I nuclei sono situati a volte in posizione centrale, facendo assumere al parassita la caratteristica forma a rosetta (*P. malariae*). Il numero dei merozoiti varia in genere da 4 a 32. In questo stadio il parassita può raggiungere dimensioni tali da riempire tutto il globulo rosso che lo contiene.

– Gametociti

È lo stadio sessuato del parassita. Sono forme molto grandi che occupano l'intera emazia, spesso la deformano in maniera caratteristica. Il nucleo è composto da una grossa massa di cromatina più o meno compatta, di forma tondeggianti o allungata. Sono molto evidenti i granuli di pigmento (emozoina).

Plasmodium falciparum

Nel sangue periferico sono riscontrabili trofozoiti e gametociti. La presenza di schizonti è da ritenersi evento eccezionale ed è indice di gravità della malattia. I trofozoiti sono presenti principalmente nella forma ad anello, molto più raramente in forma compatta. Si tratta comunque di parassiti di piccole dimensioni, che non superano 1/3 del diametro dell'emazia che li contiene. Il citoplasma è molto sottile. Molto comuni sono le forme a "doppio castone", dove la cromatina è separata in due masserelle distinte, e le forme "accollate", dove il parassita appare adagiato sulla superficie del globulo rosso. È frequente la presenza di più parassiti all'interno della stessa emazia. Possono essere presenti nel citoplasma dell'emazia parassitata alcuni grossi granuli rossastri, detti di Maurer dal loro descrittore. I gametociti assumono la caratteristica forma a falce o a banana, e occupano l'intero globulo rosso; nel citoplasma sono molto evidenti granuli scuri di emozoina.

Plasmodium vivax

Nel sangue periferico sono riscontrabili tutte le forme di sviluppo del parassita. I trofozoiti assumono tutte le forme precedentemente descritte, ma comunemente si presentano come anelli o come forme ameboidi. Le forme ad anello sono piuttosto grandi, con contorni irregolari e una grossa massa di cromatina. La forma ameboidi è caratteristica esclusiva di *P. vivax*. Il parassita è in genere molto grande, col citoplasma che assume forme diverse e che spesso appare frazionato in più blocchetti, apparentemente scollegati l'uno dall'altro. La massa di cromatina è grande, ben distinta e compatta. Gli schizonti sono in genere molto grandi, occupano buona parte della cellula ospite. Di solito presentano da 12 a 18 grossi merozoiti, ciascuno dei quali dotato di una grossa massa di cromatina. I gametociti si accompagnano sempre all'ipertrofia dell'emazia; si presentano come grosse forme compatte: sono presenti vari granuli di pigmento scuro e una grossa massa di cromatina. *P. vivax* è, tra i quattro plasmodi umani, quello di maggiori dimensioni. Esso causa generalmente l'ipertrofia dell'emazia ospitante, soprattutto nello stadio di schizonte e gametocita. Lo stato di sofferenza dell'emazia è espresso anche dalla sottile granulazione rosata presente su tutta la sua superficie (granulazioni di Schuffner). Queste granulazioni non sono sempre ben visibili (sono molto importanti il tempo di fissaggio con metanolo e il pH del tampone di colorazione), possono essere assenti durante le fasi precoci di sviluppo del parassita, e non sono più apprezzabili quando il parassita riempie interamente la cellula ospite. L'emazia può essere parassitata anche da più parassiti (in genere non più di due o tre).

Plasmodium malariae

Nel sangue periferico sono riscontrabili tutte le forme di sviluppo del parassita. I trofozoiti possono presentarsi sia nella forma ad anello, che in quella compatta. Le forme anulari sono più grandi e più spesse di quelle del *P. falciparum*, raggiungono anche i 2/3 del diametro dell'emazia. La cromatina si presenta come una masserella di maggiori dimensioni. Le forme compatte assumono sovente una caratteristica forma "a fascia", disponendosi lungo il diametro principale dell'emazia. La cromatina può assumere forma allungata ed è molto comune la presenza nel citoplasma di granuli bruno-giallastri di emozoina, particolarmente evidenti in questo parassita. Generalmente non si riscontra più di un parassita nella stessa emazia. Gli schizonti, molto comuni, non sono molto grandi, occupano solo parzialmente il corpo dell'emazia. I merozoiti sono presenti generalmente in numero di 8 o 10, e disposti

ordinatamente nella tipica forma a “rosetta”. Al centro di questa è sempre presente la masserella di pigmento bruno-giallastro. I gametociti hanno forma arrotondata, citoplasma compatto, con una grossa massa di cromatina situata in posizione eccentrica e numerosi, grossi granuli di pigmento nel citoplasma. Non sono molto grandi, spesso occupano solo una parte del citoplasma dell’emazia; a volte questa appare perfino di dimensioni ridotte rispetto a quelle non parassitate.

Plasmodium ovale

Nel sangue periferico sono riscontrabili tutte le forme di sviluppo del parassita. I trofozoiti si presentano sia nella forma ad anello, che in quella compatta, mai in forma ameboide. Gli anelli sono grandi, generalmente di dimensioni intermedie tra quelli di *P. malariae* e *P. vivax*. Le forme compatte presentano una grossa massa di cromatina, possono essere visibili numerose granulazioni di emozoina. Gli schizonti generalmente con 8-14 merozoiti, disposti più o meno disordinatamente intorno alla massa di pigmento scuro. I gametociti riempiono buona parte dell’emazia, a volte ipertrofica. Si presentano come masserelle di forma tondeggianti, ma più spesso ovale. Numerosi granuli di pigmento bruno sono presenti nel citoplasma. Anche *P. ovale* induce delle modificazioni caratteristiche nella cellula ospite. Questa può diventare ipertrofica e la sua superficie si ricopre di una granulazione rosata simile a quella di Schuffner, ma composta da granuli più grossi e meno numerosi, detti di James. Anche in questo caso le granulazioni sono frequenti nelle forme più adulte del parassita. La cellula ospite assume spesso una forma allungata con una o entrambe le estremità sfrangiate.

Provenienza geografica dei parassiti malarici

Va ricordato che un ulteriore ausilio diagnostico può venire dall’esatta conoscenza del paese dove il caso di malaria è stato contratto. Come noto, infatti, le diverse specie plasmodiali non presentano la stessa distribuzione. La ripartizione geografica dei plasmodi malarici è schematizzabile per grandi linee come riportato in Tabella 3.

Tabella 3. Ripartizione geografica dei plasmodi malarici

Area geografica	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>
Africa del Nord	frequente	frequente	assente	predominante
Africa Occidentale	predominante	poco frequente	frequente	molto raro
Africa Centrale	predominante	frequente	raro	molto raro
Africa Orientale	predominante	frequente	raro	raro
Madagascar, Oceano Indiano	predominante	frequente	raro	poco frequente
America Centrale	frequente	raro	-	frequente
America del Sud	frequente	raro	-	predominante
Asia del Sud-Ovest	frequente	poco frequente	-	predominante
Dall’India al Sud-Est Asiatico	predominante	poco frequente	-	frequente
Indonesia	predominante	poco frequente	raro	frequente
Isole del Pacifico	frequente	poco frequente	raro	frequente

Artefatti

Spesso nello striscio si può riscontrare la presenza di artefatti o di elementi del sangue, come le piastrine, che possono indurre a una diagnosi errata. Gli artefatti più comuni (batteri, spore, cristalli, grani di polvere, ecc.) sono facilmente individuabili trovandosi su un piano differente ed essendo rifrangenti. Tra gli elementi del sangue ricordiamo le piastrine e i piccoli linfociti. Le piastrine tendono ad aggregarsi tra loro e, se adagiate sulla superficie di un'emazia, possono essere scambiate per un parassita malarico. L'assenza di cromatina e il confronto con gruppi simili posti fuori dalle emazie, portano facilmente alla loro individuazione. A volte anche i nuclei di piccoli linfociti, di cui non sia ben visibile il citoplasma, possono essere scambiati per schizonti. Anche in questo caso la presenza di una colorazione omogenea deve portare ad escludere che si tratti di un parassita.

Il metodo QBC

Si tratta di un metodo che utilizza un colorante biologico nucleare rivelabile all'osservazione con microscopio a fluorescenza. L'unico kit commerciale che utilizza questa tecnica è il QBC (Quantitative Buffy Coat, Becton Dickinson, Tropical Disease Diagnostics, Sparks, MD, USA). È un metodo di grande sensibilità che permette di evidenziare anche parassitemie inferiori ai 10 parassiti/μl, difficili da diagnosticare con l'osservazione dei preparati ematici tradizionali (28, 29). Questo metodo richiede una attrezzatura specifica per la sua esecuzione (centrifuga per microcapillari e microscopio a fluorescenza). Per quanto riguarda la diagnosi di specie, il metodo permette di distinguere con certezza solamente tra *P. falciparum* e le altre 3 specie plasmodiali. Il tubo QBC è costituito da un capillare tarato da ematocrito, sulle pareti interne del quale sono stati fatti adsorbire il colorante biologico nucleare (l'arancio di acridina) e un anticoagulante (ossalato di potassio). Questo capillare viene riempito con circa 60 μl di sangue prelevati dal polpastrello e centrifugato. I componenti del sangue si separano a seconda della loro densità, formando delle bande ben distinte. L'osservazione al microscopio a fluorescenza permette di individuare, nell'interfaccia tra cellule e plasma, quattro bande ben distinte. La gran parte delle emazie parassitate, contenenti le forme più giovani dei parassiti si collocano nell'interfaccia tra la banda scura dei globuli rossi e quella giallo-fluorescente dei granulociti. I parassiti appaiono colorati in giallo-verde fluorescente su fondo scuro. Questo metodo è stato rapidamente superato dall'avvento dei test immunoenzimatici, di più semplice e rapida esecuzione.

Metodi immunocromatografici

Recentemente sono stati commercializzati numerosi test rapidi per la diagnosi di malaria di cui tre facilmente reperibili in Italia. Due di questi, ParaSight®-F e ICT malaria® si basano sull'individuazione nel sangue intero di un antigene solubile, la glicoproteina di tipo 2 ricca in istidina di *P. falciparum* (PfHRP-II) che è liberata durante il ciclo eritrocitario del parassita con un picco durante la rottura degli schizonti (30-32). Il ParaSight®-F è specifico per la diagnosi di *P. falciparum*, mentre dell'ICT malaria® esiste oggi una versione combinata che rivela anche le infezioni da altri plasmodi. Un terzo prodotto, l'OptiMal® si basa sull'individuazione nel sangue intero di lattato deidrogenasi (pLDH) liberata dai plasmodi (33). Il test riconosce sia *P.*

falciparum che, genericamente, gli altri plasmodi. Il procedimento è in grandi linee il seguente: con capillari tarati si prelevano 10-50 µl di sangue dal polpastrello; che si trasferiscono su una apposita striscia sensibilizzata o in pozzetti di reazione, aggiungendo alcune gocce di reagenti lisanti e anticorpi specifici marcati con un sistema rivelatore. Dopo qualche minuto si sciacqua con alcune gocce di detergente e si legge il risultato a occhio nudo. In caso di positività, sulla estremità della strisce appariranno due o tre linee di colore o forma diversa a seconda del prodotto utilizzato. Una striscia rappresenta sempre il controllo positivo, un'altra la positività per *P. falciparum* e l'eventuale terza la positività generica per *Plasmodium spp.*

Tutti i sistemi presentano specificità elevata e una sensibilità in grado di rivelare parassitemie superiori a 100-200 parassiti per microlitro (µl) di sangue. Inoltre presentano diversi vantaggi rispetto al tradizionale esame emoscopico: non richiedono microscopio o altra apparecchiatura, bastano pochi minuti per il risultato, dispongono di un controllo positivo integrato per svelare eventuali errori di procedimento, possono essere eseguiti e interpretati anche da operatori non specializzati e infine i kit sono di poco ingombro e di facile trasporto.

Nella diagnosi della malaria, questi test immunocromatografici possono risultare un ausilio diagnostico particolarmente utile in caso di infezioni con bassa parassitemia o in situazioni di urgenza, quando risulta importante conoscere rapidamente se un caso di malaria diagnosticato clinicamente è dovuto a *P. falciparum* o ad altre forme plasmodiali. Va peraltro ricordato che all'impiego di questi test rapidi deve essere comunque associato un successivo esame emoscopico, come previsto dalle norme vigenti. Va infine fatto notare che da uno studio recente è emerso il ruolo del fattore reumatoide quale causa di falsa positività col saggio Para-Sight®-F. In detto studio, l'83% dei pazienti portatori di fattore reumatoide e senza infezione malarica ha presentato una reazione positiva al saggio (34).

I fattori reumatoidi sono infatti rappresentati da una popolazione eterogenea di autoanticorpi (prevalentemente IgM, ma anche IgG, IgA e IgE) capaci di reagire con alcuni determinanti antigenici localizzati sul frammento Fc delle immunoglobuline G. Poiché i fattori reumatoidi sono riscontrabili in circa il 5% di persone apparentemente sane, e nel 10-20% dei soggetti di oltre 65 anni di età, la non completa affidabilità di questo saggi in tali soggetti deve essere tenuta in considerazione per la corretta interpretazione dei risultati.

In Tabella 4 vengono riportati i 5 prodotti commerciali sull'impiego dei quali è stata prodotta la maggiore quantità di letteratura scientifica.

Tabella 4. Kit immunocromatografici per diagnosi rapida di malaria

Marchio®	Produttore	Distributore in Italia	Enzima e specie bersaglio
ParaSight	Becton Dickinson USA	Becton Dickinson Italia	HRP-2 solo <i>Plasmodium Falciparum</i>
ICT MALARIA	AMRAD Australia	Promesan (MI)	HRP-2 <i>Plasmodium Falciparum</i> + <i>Plasmodium spp</i>
Optimal	TCS Microbiology UK	Diamed (MI)	PLHD <i>Plasmodium Falciparum</i> + <i>Plasmodium spp</i>
ULTIMED	Pharma & Health Belgio	Non distribuito in Italia	HRP-2 solo <i>Plasmodium Falciparum</i>
MAKRO MAL	Makro Medical Australia	Non distribuito in Italia	HRP-2 solo <i>Plasmodium Falciparum</i>

Diagnosi molecolare

I primi approcci di diagnostica molecolare della malaria hanno ormai più di un decennio (35). I metodi basati sulla ibridazione di sonde specifiche (marcate o meno con radioisotopi) con DNA plasmodiale, sono stati recentemente sostituiti da tecniche molecolari più sensibili basate sull'amplificazione di determinate regioni del DNA del parassita attraverso la reazione di polimerizzazione a catena (Polymerase Chain Reaction, PCR) (36). Questa semplice tecnica ha fornito le basi per lo sviluppo di nuove procedure da impiegare in malariologia non solo per la diagnostica di specie, ma soprattutto per lo svolgimento di indagini epidemiologiche (37) e per la caratterizzazione genetica dei vari ceppi di plasmodio (30).

La PCR e la nested-PCR hanno permesso la diagnosi differenziale delle quattro specie di plasmodi umani attraverso l'amplificazione del gene che codifica per una piccola subunità dell'RNA ribosomale. La PCR-hybridisation, la PCR-size polymorphism, l'uso di enzimi di restrizione (PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) e l'amplificazione casuale di sequenze polimorfiche di DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) sono le metodiche che hanno fornito utili informazioni sulla natura e l'entità delle differenze genetiche nelle diverse popolazioni di plasmodi (39).

Tutte queste pratiche trovano però, ancora scarsa applicazione nella diagnostica di routine. I principali limiti sono costituiti dalla necessità di operare in laboratori attrezzati, con personale specializzato e i costi per campione ancora piuttosto alti. Tuttavia l'elevata sensibilità (la sensibilità della nested-PCR è di 1 parassita/μl) e specificità (a livello di singolo genoma), nonché la semplicità di interpretazione e la riproducibilità dei risultati rendono questi metodi uno strumento estremamente valido per la diagnosi in presenza di basse parassitemie (submicroscopiche), per la diagnosi di infezioni miste in presenza di una specie prevalente, per distinguere tra reinfezioni e recrudescenze dovute alla stessa specie plasmodiale (39), per caratterizzare ceppi farmaco-resistenti e per le diagnosi di malaria post mortem in assenza di preparati istologici.

Attualmente non sono disponibili sul mercato kit commerciali per la diagnosi molecolare di malaria, certamente occorrerà ancora del tempo perché venga standardizzato un metodo per l'estrazione del DNA dai campioni e un processo di PCR automatizzato che permetta anche di quantificare la carica parassitaria.

Immunofluorescenza indiretta

I metodi sierologici per la ricerca degli anticorpi hanno un uso limitato nella diagnosi di malaria in fase acuta perché danno risultati positivi soltanto alcuni giorni dopo la comparsa dei parassiti nel sangue. In aree dove la malaria è stata o è ancora endemica tali test assumono notevole importanza in studi epidemiologici dove vengono utilizzati per valutare i cambiamenti nell'intensità della trasmissione malarica. In zone dove la malaria non è endemica questi test possono essere utilizzati per lo screening dei donatori di sangue, per diagnosi di esclusione di malaria in pazienti con picchi febbrili ricorrenti e con esame microscopico del sangue negativo. In ogni caso un limite di questi metodi è il fatto che la raccolta e la conservazione dei campioni di siero e la preparazione dell'antigene impongono cautela nella interpretazione dei risultati.

Il principale metodo sierologico usato per la diagnosi di malaria è l'immunofluorescenza indiretta, introdotto nel 1962. L'unico kit commerciale reperibile in Italia è prodotto dalla BioMerieux. La positività di questo test indica la presenza di una risposta immunitaria, ma non necessariamente la presenza di parassiti malarici (40). L'antigene omologo è formato da sangue

ricco di schizonti ottenuti da colture continue di *P. falciparum*. Il siero antiuomo è polivalente (IgG+IgM) e è coniugato con isotiocianato di fluoresceina come marcatore. I titoli di anticorpi più elevati si riscontrano dopo circa 23 settimane dall'acquisizione dell'infezione. Nelle aree endemiche il titolo anticorpale aumenta con l'età ed è direttamente correlato all'intensità del contatto tra uomo e plasmodio. L'immunofluorescenza indiretta può rilevare gli anticorpi anche anni dopo l'esposizione al parassita malarico. Per una corretta valutazione dei risultati ottenuti bisogna ricordare che il test è specifico per *P. falciparum* ma presenta una debole reattività crociata anche con le altre specie plasmodiali. In linea di massima titoli anticorpali minori di 1/20 indicano l'assenza di infezione in atto; titoli tra 1/20 e 1/40 suggeriscono una infezione pregressa da *P. falciparum* o una infezione in atto dovuta ad altre specie plasmodiali. Titoli maggiori di 1/80 indicano infezione da *P. falciparum* in atto o comunque molto recente. La ripetizione del test dopo due settimane potrà seguire l'eventuale "movimento anticorpale" per una corretta interpretazione dei risultati.

In Tabella 5 è riportato un tentativo di confronto tra la sensibilità, la specificità, i tempi di esecuzione e i costi per singolo test delle tecniche sopra illustrate, secondo l'esperienza maturata presso l'ISS.

Tabella 5. Confronto tra sensibilità, specificità, tempi di esecuzione e costi per singolo test delle diverse tecniche disponibili per la diagnosi di malaria

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi	Sensibilità	Specificità	Tempo di esecuzione	Costo in lire*
Diagnosi emoscopica	Economica, di facile e rapida esecuzione	Necessita di personale specializzato e di microscopio. La diagnosi di esclusione richiede tempo	10-20 par./ μ l	variabile, legata alla capacità del microscopista	20 min/2,5 h	500
Test immunocromatografici	Non richiedono attrezzature specifiche. Facile e rapida esecuzione	Reazione crociata con fattori reumatoidi (solo alcuni). Ancora molto costosi	50-200 par./ μ l	>90% per P.f.- minore per altri plasmodi	10 min	3.000/ 28.000
QBC	Estremamente sensibile. Esecuzione in tempi brevi	Richiede attrezzatura specifica e operatori addestrati. Diagnosi non P. f. molto complessa	<10 par./ μ l	P.f./non P.f.	15-20 min	4.500
Immuno-fluorescenza	Facile esecuzione. Evidenza contatti pregressi col plasmodio	Richiede un microscopio a fluorescenza. Specifica solo per P. f. Interpretazione dei risultati non univoca	elevata	bassa	1,5 h	7.500
Test molecolari	Estremamente sensibili e specifici. Consentono indagini complesse	Richiedono laboratori attrezzati. Tecniche ancora poco riproducibili, non standardizzate e costose	Singolo genoma	100%	4/6 h	15.000

*Gli importi per singolo test sono stati calcolati senza tenere conto dei costi delle apparecchiature utilizzate e dei costi del personale; P.f.: *P. falciparum*; par.: parassita.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO E PREVENZIONE

La valutazione del rischio malarico

Da un punto di vista epidemiologico il rischio (r) di contrarre l'infezione malarica è determinato dai seguenti fattori :

1. s = percentuale di zanzare infettanti (indice sporozoitico)
2. ma = numero di punture di *Anopheles* per uomo per notte
3. t = tempo di esposizione del soggetto in giorni

legati dalla seguente relazione:

$$r = 1 - (1 - s)^{ma \cdot t}$$

Tale rischio varia secondo le condizioni epidemiologiche; ad esempio in molte zone rurali africane è vicino a 1 (= certezza di contrarre la malaria) anche per un tempo di permanenza molto breve. Intervenendo nella fase di contatto tra uomo e vettore si agisce sul parametro "ma", il cui valore, come si può osservare dalla formula, è determinante in quanto influenza il rischio malarico in modo esponenziale.

Va anche sottolineato che, per meglio valutare il rischio malarico, è importante conoscere il ritmo di aggressività del vettore. Le zanzare del genere *Anopheles* sono attive prevalentemente durante le ore crepuscolari e notturne, con picchi di attività variabili a seconda della specie. Ad esempio le specie appartenenti al complesso *Anopheles gambiae*, che in Africa comprende i più importanti vettori di malaria, presentano un picco massimo di attività intorno alle prime ore della notte, mentre il potenziale vettore italiano, *Anopheles labranchiae*, è attivo principalmente nelle prime ore della sera.

Incidenza della malaria nei viaggiatori italiani

Una valutazione diversa del rischio malarico è stata effettuata in un recente studio del laboratorio di Parassitologia dell'ISS, calcolando l'incidenza della malaria negli italiani che hanno viaggiato in zone di endemia tra il 1993 e il 1997 (Tabella 6). Per chi ha visitato l'Africa l'incidenza media è risultata dell'1,4 per 1000. Questo valore appare 10-20 volte più basso per chi si è recato in Asia (0,11/1000) e 30-40 volte più basso per chi ha viaggiato in America Centrale e Meridionale (0,04/1000).

Tuttavia, nella stima dell'incidenza si dovrebbe tenere conto che il rischio di contrarre la malaria in un certo continente varia ampiamente da Stato a Stato. All'interno dei singoli stati, poi, il rischio malarico è legato alla località, al tipo di viaggio e alla stagionalità della trasmissione. In Tabella 7 è riportato un tentativo di calcolo dell'incidenza della malaria nei viaggiatori che hanno visitato alcuni paesi endemici nel 1997.

Queste considerazioni, insieme all'attuale situazione epidemiologica della malaria nel mondo e alla crescente difficoltà di effettuare una chemiopprofilassi soddisfacente, rendono necessario, per i viaggiatori che si recano in paesi ad endemia malarica, l'adozione anche di mezzi di protezione individuale al fine di ridurre il contatto uomo-vettore.

Tabella 6. Incidenza della malaria in viaggiatori italiani in zone di endemia (1989-1997)

	Africa				Asia				America Centro-Sud			
	viaggiatori		casi malaria 1000	Inc./ 1000	viaggiatori		casi malaria 1000	Inc./ 1000	viaggiatori		casi malaria 1000	Inc./ 1000
	nel continente	in paesi con malaria			nel continente	in paesi con malaria			nel continente	in paesi con malaria		
1989	751.164	147.131	329	2,2	613.355	166.392	20	0,12	451.880	218.462	15	0,07
1990	801.769	153.546	298	1,9	632.352	168.103	29	0,17	449.819	315.321	16	0,05
1991	709.142	142.404	238	1,7	574.364	177.067	26	0,15	461.802	306.696	11	0,04
1992	920.418	189.138	251	1,3	770.978	210.891	14	0,07	573.488	415.773	20	0,05
1993	991.327	251.555	352	1,4	907.509	214.686	22	0,1	773.952	510.741	24	0,05
1994	1.051.592	183.618	439	2,4	962.916	242.789	16	0,07	864.336	555.723	13	0,02
1995	1.190.241	211.361	323	1,5	963.212	260.202	21	0,08	1.156.048	589.442	18	0,03
1996	2.446.122	246.924	319	0,7	2.633.918	321.328	35	0,1	1.261.460	586.595	17	0,03
1997	2.287.000	400.449	356	0,9	2.801.675	319.543	49	0,15	1.235.871	649.596	17	0,03
TOT.	11.148.775	1.926.126	2.905	1,5	11.120.481	2.081.001	232	0,11	6.093.656	4.148.349	151	0,04

Tabella 7. Calcolo dell'incidenza della malaria nei viaggiatori italiani che hanno visitato alcuni Paesi di endemia malarica nel 1997

Stato	Viaggiatori (n.)	Incidenza/1000
Africa	400.449	0,9
Kenia	92.053	0,09
Senegal	54.044	1,9
Etiopia	38.049	0,2
Nigeria	33.841	2,3
Tanzania	26.486	1,3
Ghana	23.248	6
Costa d'Avorio	18.476	3,7
Madagascar	6.080	6,5
Asia	319.543	0,15
India	77.086	0,7
Sri Lanka	34.279	0,03
Indonesia	19.596	0,25
America	649.596	0,03
Brasile	293.955	0,007
Venezuela	87.322	0,01
Perù	18.266	0,1
Costa Rica	1.406	2,1
Haiti	2.906	1,0
Messico	87.074	0,01

Interruzione del contatto vettore-uomo

Le zanzare sono attratte dall'uomo seguendo degli stimoli che variano secondo la distanza, percepiti da organi di senso posti sulle antenne. L'odore individuale, costituito da varie sostanze emesse con la sudorazione, viene percepito per primo (20-30 m di distanza), seguito dalla CO₂

(10-20 m) emessa con la respirazione; a distanza ravvicinata la zanzara è guidata da stimoli visivi, dall'umidità e dal calore emanato dal corpo umano.

L'interruzione del contatto tra vettore e uomo si può ottenere in modi diversi: adottando comportamenti atti ad evitare la puntura degli anofeli, in tal caso si parlerà di profilassi comportamentale; frapponendo barriere meccaniche (reti o zanzariere) o chimiche (repellenti) tra la zanzara e il suo ospite, parleremo allora rispettivamente di profilassi meccanica e chimica. L'adozione contemporanea di barriere meccaniche-chimiche è realizzabile mediante l'impregnazione di tessuti con insetticidi o repellenti.

Bisogna infine ricordare che attualmente non esiste un unico mezzo di protezione adatto ed efficace nelle diverse situazioni epidemiologiche, urbane e rurali, che può incontrare un turista o un lavoratore nel corso dei suoi viaggi: la scelta dovrà essere individuale e adeguata alla diverse realtà locali.

Protezione individuale dalle punture di zanzara

La profilassi comportamentale va sempre effettuata in zona di endemia malarica, anche a supporto di profilassi con farmaci. Gli adeguati comportamenti possono essere integrati con mezzi meccanici e/o chimici.

Ad esempio, soggiornando all'aperto dopo il tramonto in zona di endemia malarica, è opportuno utilizzare indumenti di colore chiaro, con maniche lunghe e calze spesse; le zanzare infatti sono attratte dai colori scuri su cui è anche più difficile individuarle. Le rimanenti parti esposte possono essere protette con repellenti, mentre l'ambiente può essere bonificato con l'impiego di spirali fumigene o altri emanatori di insetticidi.

Al momento di dormire vanno preferite camere con aria condizionata o comunque dotate di reti alle finestre. In mancanza di queste si può fare ricorso alle zanzariere da letto, possibilmente impregnate con insetticidi. La stanza può essere inoltre disinfestata con nebulizzazioni di insetticidi o utilizzando elettroemanatori di insetticidi.

Mezzi meccanici e chimici per la protezione dalle zanzare

Per la protezione durante la notte esiste in commercio un vasto campionario di mezzi di protezione da utilizzare ma la scelta dovrà essere fatta tenendo conto delle abitudini di vita individuali, del tipo di viaggio e delle possibilità di utilizzo.

I mezzi più usati sono elencati di seguito:

– Zanzariere

Se ne conosce l'uso fin dall'antichità. Vanno montate con opportuni supporti sopra il letto, con gli orli inferiori rimboccati sotto il materasso. Le zanzariere sono realizzate in cotone o poliestere multifilo, quest'ultimo è decisamente più resistente e più idoneo ad una eventuale impregnazione della zanzariera stessa con insetticidi. I requisiti ottimali sono:

1. base rettangolare (le dimensioni standard sono: altezza 150 cm, lunghezza 180-200 cm e larghezza variabile tra 70 e 190 cm);
2. 156-196 maglie/pollice² (corrisponde a circa 36 maglie/cm²);
3. multifilo da 100 deniers (unità di resistenza dei fili);
4. colore chiaro per reperire facilmente zanzare rimaste intrappolate;
5. dimensioni maggiori del letto.

I limiti delle zanzariere sono quelli di proteggere l'individuo solo durante il sonno, di ridurre la ventilazione e di aumentare il rischio per le persone che dormono in prossimità senza protezione.

– *Reti e tende*

Vanno applicate a porte e finestre. Sono utilizzate principalmente da famiglie e comunità, o comunque per proteggere piccoli ambienti (capanne, roulotte, bungalow, barche, tende da campo). Le reti possono essere realizzate sia in metallo che in plastica; le tende sono realizzate con tessuti di vario tipo, naturali o sintetici, e vanno impregnate con insetticidi, come descritto più avanti.

– *Spirali fumigene*

Sono costituite da un supporto di materiale a lenta combustione contenente 2-3 g/kg di piretro o piretroidi ed hanno le seguenti caratteristiche:

1. il calore libera il principio attivo che diffonde
2. la durata è 7-10 ore con una moderata ventilazione
3. vanno utilizzati solo all'aperto o in ambienti molto ventilati

– *Elettroemanatori a piastrina*

La piastrina è costituita da materiale inerte su cui viene assorbito 0,2-0,1 mg/m² di piretro o piretroidi. Il principio attivo viene diffuso nell'aria mediante riscaldamento, ponendo la piastrina su un apposito fornello elettrico. Hanno le seguenti caratteristiche:

1. la durata è di 8 ore circa;
2. il rilascio non è uniforme essendo massimo nelle prime ore;
3. il viraggio al bianco dell'indicatore blu indica la fine dell'effetto;
4. vanno utilizzate solo in ambienti ventilati.

– *Elettroemanatori a carica liquida*

Sono costituiti da liquidi contenenti estratto di piretro o piretroidi (1-1,4%) che evaporano con il calore di una resistenza elettrica. Esistono anche modelli portatili a batteria. Hanno le seguenti caratteristiche:

1. l'azione repellente-insetticida comincia a manifestarsi circa 1/2 ora dopo l'accensione;
2. la durata è anche di un mese o oltre se utilizzati nelle sole ore notturne;
3. sono quasi inodori;
4. debbono essere utilizzati solo in ambienti ventilati.

– *Repellenti*

Si definiscono repellenti quei preparati che, applicati sulla cute dell'ospite vertebrato o sugli indumenti, creano barriere chimiche che allontanano gli insetti. Più specificamente i repellenti sono sostanze che evocano un complesso di risposte comportamentali, attraverso meccanismi non ancora del tutto noti a carico degli organi sensoriali degli insetti, il cui risultato finale è semplicemente quello di prevenire la puntura. Secondo alcuni autori i repellenti agiscono bloccando i pori dei sensilli antennali, impedendo così la percezione di segnali attrattivi provenienti dall'ospite, secondo altri essi causerebbero

un'alterazione del meccanismo sensoriale attivando simultaneamente differenti tipi di chemiorecettori che disorientano l'insetto nell'attività esplorativa e discriminativa dell'ospite.

I repellenti possono essere applicati direttamente sulla cute, sugli indumenti, o usati per impregnare zanzariere o tende. La percentuale di eliminazione del repellente applicato sulla cute dipende da vari fattori, quali assorbimento, strofinamento, temperatura, sudore, ecc. I prodotti attualmente disponibili e applicabili sulla cute sono normalmente efficaci per un tempo limitato e devono pertanto essere riapplicati più volte per mantenere la loro efficacia.

Tra i numerosi repellenti cutanei sperimentati nel tempo, solo pochissimi si sono affermati nell'uso pratico grazie alla loro efficacia protettiva e accettabilità. Tra questi vanno ricordati soprattutto il ben noto N,N-dietiltoluammide o DEET, principio attivo di molti prodotti in commercio (5-30% di principio attivo), il dimetil-ftalato (DMP), il 2-etil-1,3-esanediolo (EHD), il 1-(3-cicloesen-1-carbonil)-2-metilpiperidina (CYM), il 1-(3-cicloesen-1-carbonil)-piperidina (CYP) e il benzilbenzoato, efficaci in genere contro zanzare, tafani, zecche e pulci, ma non contro insetti con pungiglione, quali api e vespe. I repellenti in commercio hanno un'azione residua che difficilmente, nelle condizioni normali, supera le 3-4 ore; sperimentazioni recenti con formulazioni a lento rilascio di DEET hanno evidenziato una efficacia protettiva più lunga (6-8 ore) contro le punture di zanzare. Di più recente sintesi è il KBR [1-(1-methyl-propoxycarbonyl)-2-(2-hydroxyethyl)-piperidine] che assicura una protezione simile a quella del DEET per un numero variabile di ore, a seconda del formulato impiegato.

I più comuni prodotti presenti in commercio sono formulati come lozioni, stick, spray, creme, fazzolettini, braccialetti, ecc.; quelli che assicurano migliore protezione, dovuta alla buona dispersibilità sulla pelle, sono le lozioni e le creme.

Per evitare le punture degli anofeli, il repellente va applicato durante il periodo di attività trofica delle zanzare, cioè dal tramonto all'alba. Il prodotto va cosparso sulle gambe, particolarmente dalle caviglie alle ginocchia, sulle braccia, sul collo, sulla nuca e su altre parti scoperte del corpo, evitando accuratamente gli occhi e le mucose. La zona frontale dovrebbe essere trattata con una dose minima onde evitare il trasporto agli occhi mediante il sudore che, in climi tropicali, può essere abbondante.

Sono state segnalate reazioni allergiche e tossiche in seguito ad uso eccessivo e prolungato di repellenti per applicazione topica, specialmente in lattanti e bambini. L'ingestione di repellenti può essere fatale.

Anche alcuni insetticidi esplicano un'attività repellente o irritante: tra questi citiamo i piretroidi di sintesi che causano un effetto irritante nell'insetto in seguito al contatto.

Impregnazione di materiali con insetticidi o repellenti

Gli stessi repellenti per applicazione cutanea e alcuni piretroidi di sintesi (quali la permetrina e la deltametrina) possono essere adoperati per impregnare indumenti contro zanzare e altri artropodi ematofagi, ottenendo una lunga azione residua. Per il DEET la dose d'impiego per l'impregnazione di indumenti è di 20 g/m², ottenuta con l'impiego di una emulsione contenente il 10-20% di repellente. Data la bassa dose d'impiego e il contatto indiretto con la pelle non vi sono pericoli di tossicità per l'uomo. L'attività repellente di indumenti così trattati raggiunge la durata di 1-2 settimane, anche dopo 4-5 lavaggi. La permetrina può essere impiegata per impregnare gli indumenti alla dose di 1 g/m² partendo da una formulazione liquida (6-8%) emulsionabile in acqua. Questo tipo di trattamento assicura una protezione contro gli insetti ematofagi di alcuni mesi anche dopo ripetuti lavaggi.

Per l'impregnazione di zanzariere o tende in tessuti vari, vengono utilizzati soprattutto piretroidi che hanno il vantaggio di avere una bassa tossicità orale acuta (LD50>4.000-10.000 mg/kg) e una dermale bassissima per i vertebrati. I più utilizzati sono:

- deltametrina alla dose di 25 mg/m² (LD50 orale ratto 135-5.000 mg/kg; LD50 dermale 2.000 mg/kg); una zanzariera di 15 m² necessita di 3 g di permetrina;
- permetrina alla dose di 0,2-0,5 g/m² (LD50 orale ratto 430-4.000 mg/kg; LD50 dermale 750-2.500 mg/kg);
- d-phenotrin alla dose di 0,5 g/m² (LD50 orale ratto 10.000 mg/kg; LD50 dermale 5.000 mg/kg).

L'efficacia dell'impregnazione, durando qualche mese, può coprire anche lunghi periodi di soggiorno all'estero. I vantaggi dell'impregnazione sono:

1. estensione della protezione dell'individuo all'alterazione del comportamento delle zanzare che entrano in contatto con l'insetticida;
2. effetto insetticida nei primi giorni dovuto alla diffusione nell'aria del principio attivo;
3. azione di disturbo sulle zanzare che riduce l'aggressività su coloro che dormono in zone adiacenti privi di protezione.

Il poliestere e il nylon sono migliori substrati del cotone per l'impregnazione con piretroidi. Per mantenere l'efficacia nel tempo, la reimpregnazione deve essere ripetuta ogni 3-6 mesi.

Chemioprofilassi della malaria

La prevenzione della malaria, in attesa di un vaccino che appare ancora lontano da un impiego pratico, si basa su due principi fondamentali: l'adozione di norme comportamentali individuali e l'assunzione di farmaci (chemioprofilassi). Della primo tipo si è già parlato estesamente; della chemioprofilassi va detto subito che non esiste uno schema unico, valido per tutti, dovunque ci sia malaria. Gli schemi profilattici vanno valutati caso per caso tenendo conto dei seguenti punti (41):

1. *Entità del rischio malarico.* Come già detto, nella valutazione dell'entità del rischio in una zona di endemia bisogna tenere conto che questo può variare notevolmente all'interno del paese, tra zone urbane e zone rurali, con l'altitudine e seguendo il ritmo delle stagioni. Ad esempio, nella maggior parte delle capitali degli Stati africani e asiatici non vi è trasmissione di malaria, così in molti circuiti turistici lungamente sperimentati. Altri fattori importanti dei quali occorrerebbe tenere conto sono il tipo di viaggio e la durata dell'esposizione al rischio malarico.
2. *Scelta del farmaco.* Il farmaco antimalarico deve essere appropriato per la zona in cui il viaggiatore si reca. Ceppi di *P. falciparum* resistenti alla cloroquina e ad altri farmaci sono stati segnalati ormai da decenni in molte zone di endemia. Queste sono state divise dall'Organizzazione Mondiale della Sanità in 3 fasce, denominate rispettivamente A, B e C (41).

La fascia A comprende quasi esclusivamente alcuni Paesi situati ai limiti settentrionali dell'areale di diffusione della malaria (Messico e Centramerica, Turchia, Paesi Transcaucasici della ex Unione Sovietica, Medio Oriente e parte della penisola arabica), dove *P. vivax* è predominante: farmaco di scelta è la cloroquina.

La fascia B comprende il sub-continente Indiano e tutti i paesi insulari dell'Oceano Indiano: profilassi consigliata con cloroquina e proguanil.

La fascia C comprende tutti gli altri Paesi malarici (l'intera Africa, il Sud America, il Sud-Est Asiatico e la Nuova Guinea): farmaco di scelta è la meflochina, con esclusione dell'area di confine Cambogia-Thailandia-Myanmar, dove è consigliata la dossiciclina (41).

3. *Durata della profilassi.* L'assunzione di farmaci antimalarici a dose singola settimanale deve essere iniziata, almeno 1 settimana prima del viaggio (per consentire il raggiungimento di una idonea concentrazione plasmatica) ed essere poi proseguita con regolarità durante tutto il periodo di soggiorno nell'area a rischio malarico e per quattro settimane dopo averla lasciata. La profilassi con farmaci da assumere a cadenza giornaliera va iniziata un giorno prima. Gruppi a rischio sono le donne in gravidanza e i bambini, a cui vanno prescritti farmaci e posologie specifiche.
4. *Possibili effetti collaterali e controindicazioni dei farmaci prescritti.* Nessun farmaco è esente da effetti collaterali, pertanto la chemiopprofilassi non dovrebbe essere prescritta se non strettamente necessaria; la profilassi con meflochina dovrebbe essere iniziata preferibilmente 2 settimane prima della partenza per evidenziare eventuali effetti collaterali e poter considerare possibili alternative.

I farmaci attualmente raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per la profilassi antimalarica sono quattro; le rispettive posologie in relazione al peso corporeo e/o all'età sono riportate in Tabella 8.

Tabella. 8. Posologie per la chemiopprofilassi antimalarica raccomandate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2000

Principio attivo (farmaco)	Peso (kg)	Età (anni)	Compresse/settimana (n.)
Cloroquina <i>compresse 150 mg base</i>	5-6	<4 mesi	1/4
	7-14	4-24 mesi	1/2
	15-18	3-4	3/4
	19-35	5-10	1
	36-50	11-13	2
	>50	>14	2
Meflochina (Lariam)	<5	<3 mesi	non raccomandato
	5-12	3-23 mesi	1/4
	13-16	2-3	1/3
	17-24	4-7	1/2
	25-35	8-10	3/4
	36-50	11-13	1
	>50	>14	1
			Compresse/giorno (n.)
Proguanil (Paludrine)	5-8	<8 mesi	1/4
	9-16	8-36 mesi	1/2
	17-24	4-7	3/4
	25-35	8-10	1
	36-50	11-13	1e1/2
	>50	>14	2
Dossiciclina	<25	<8	controindicato
	25-35	8-10	1/2
	36-50	11-13	3/4
	>50	>14	1

Clorochina (CHL)

La clorochina è uno schizonticida ematico rapido. Raccomandata per le aree dove *P. vivax* è la specie predominante (Algeria, Marocco, Iraq, Siria, Turchia, Azerbaijan, Nord-Iran e Cina, eccetto la Cina del Sud, inclusa l'isola di Hainan) e dove *P. falciparum* è ancora sensibile alla clorochina. La clorochina è somministrata in profilassi alla dose unica settimanale di 5 mg di sostanza base/kg di peso corporeo ossia 300 mg (di sostanza base)/settimana. Le compresse in commercio in Italia contengono 150 mg di sostanza base come cloridrato. Questo farmaco è usualmente ben tollerato; le poche persone, che manifestano spiacevoli effetti collaterali come disturbi gastro-intestinali, lo possono tollerare meglio assumendo il farmaco durante il pasto e suddividendo la dose in due somministrazioni settimanali. La somministrazione di clorochina è controindicata in caso di nota ipersensibilità individuale, in soggetti con storia di epilessia o affetti da psoriasi.

Clorochina + Proguanil (C+P)

Questa associazione di farmaci è raccomandata per la profilassi in aree dove sono riportati bassi livelli di resistenza di *P. falciparum* alla clorochina. Può esser impiegata anche in aree dove sono riportati alti livelli di resistenza di *P. falciparum* alla clorochina; se il viaggiatore non tollera meflochina o dossiciclina, oppure in aree dove è segnalata resistenza di *P. falciparum* alla clorochina, ma l'assunzione della meflochina è controindicata, come ad esempio durante le fasi iniziali di gravidanza. Lo schema di profilassi prevede una dose unica settimanale di 300 mg (sostanza base) di clorochina più una dose di 200 mg al giorno (3 mg/kg) di proguanile idrocloruro, schizonticida tissulare primario, cioè attivo nella fase pre-eritrocitaria epatica. Eventuali disturbi gastrointestinali causati da Clorochina + Proguanil possono essere ridotti assumendo i farmaci ai pasti e/o suddividendo in due somministrazioni settimanali la dose di clorochina.

Meflochina (MEF)

La meflochina è un efficace schizonticida ematico raccomandato per aree dove vi è resistenza di *P. falciparum* alla clorochina e alle associazioni sulfonamide/pirimetamina. Essa è anche molto attiva contro *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. In Italia è in commercio sotto forma di compresse contenenti 274 mg di idrocloruro, equivalente a 250 mg di meflochina base. Viene somministrata in profilassi antimalarica alla dose settimanale di 5 mg/kg, equivalente a 250 mg di sostanza base alla settimana. All'inizio del trattamento possono presentarsi effetti collaterali come vertigini o disturbi gastrointestinali per poi risolversi spontaneamente. Coloro che continuano a manifestare intollerabili effetti collaterali devono considerare l'eventualità di optare per uno schema profilattico alternativo. La sospensione del trattamento si impone quando si presentano disordini neurologici o psichiatrici in soggetti con controindicazione. Tali reazioni hanno, peraltro, la caratteristica di manifestarsi per lo più precocemente (dopo la prima dose), cosicché la loro eventuale comparsa e la loro entità possono essere verificate già in patria, se l'assunzione viene iniziata due settimane prima della partenza. La meflochina è controindicata in soggetti con nota allergia al farmaco o a farmaci a struttura chimica analoga (chinino, chinidina), in gravidanza, in bambini al di sotto dei 5 kg di peso o età inferiore ai 3 mesi, soggetti con preesistenti disturbi neurologici o psichiatrici, storia di epilessia, o gravi disordini psichiatrici, soggetti trattati con meflochina o sostanze analoghe nelle precedenti 4 settimane, persone che richiedono un fine coordinamento dei movimenti e discriminazione spaziale (ad

esempio piloti). La somministrazione contemporanea di meflochina con anti-aritmici, beta-bloccanti, calcio-antagonisti, antidepressivi triciclici e fenotiazine potrebbe in teoria contribuire all'allungamento dell'intervallo QTc. Nei tre mesi seguenti l'assunzione di meflochina dovrebbe essere evitato il concepimento. Se la meflochina non può essere assunta perché controindicata o non tollerata, le alternative possono essere o dossiciclina o cloroquina+proguanil. Quest'ultimo schema ha minore efficacia protettiva in certe zone.

Dossiciclina (DOX)

Raccomandata per aree dove è segnalata resistenza multipla ai farmaci (nord della Thailandia, aree di confine con Myanmar e Cambogia) e nel caso in cui, pur essendo presenti alti livelli di resistenza di *P. falciparum* alla cloroquina, sia controindicata o non tollerata la meflochina. Sotto forma di capsule o compresse contenenti 100 mg di dossiciclina sale idrocloruro, viene prescritta in profilassi alla dose giornaliera di 100 mg, 1,5 mg di sale/kg di peso corporeo/giorno. La dossiciclina è controindicata nei bambini al di sotto degli 8 anni, in gravidanza e durante l'allattamento al seno. La dossiciclina può causare fotosensibilizzazione cutanea e aumentare il danno da esposizione ai raggi solari. L'ulcerazione esofagea può essere ridotta ingerendo il farmaco con abbondante liquido e l'irritazione gastro-intestinale, comune alle tetracicline, essere ridotta assumendo il farmaco ai pasti principali.

Infine, diversamente dal passato, non si ritiene oggi consigliabile l'uso profilattico delle associazioni di pirimetamina con sulfamidici, nemmeno in zone ad alta clorochino-resistenza, in quanto i potenziali rischi tossici di tali farmaci possono superare gli attesi benefici profilattici.

ANOFELISMO RESIDUO IN ITALIA

I vettori di malaria in Italia

Quando la malaria era ancora endemica in Italia, i vettori provati erano 3: *Anopheles labranchiae* e *Anopheles sacharovi*, ambedue appartenenti al complesso *Anopheles maculipennis*, e *Anopheles superpictus* (34). *Anopheles labranchiae* era il vettore principale lungo le fasce costiere dell'Italia centro-meridionale, della Sicilia e della Sardegna, occupando nelle due isole anche zone collinari interne. *Anopheles sacharovi*, era presente lungo le pianure costiere dell'Italia continentale e della Sardegna, giocando però un ruolo di vettore principale solo nella parte nord-orientale del Paese, dove *Anopheles labranchiae* era assente. *Anopheles superpictus* agiva come vettore secondario nelle regioni meridionali e in Sicilia.

Distribuzione e densità dei potenziali vettori

Dopo la drastica riduzione subita durante le grandi campagne con il DDT, molte specie anofeliche endofile hanno gradualmente rioccupato le loro nicchie, fino a raggiungere, in molti casi, i valori di densità presenti prima degli interventi; altre sono praticamente scomparse. Dei 3 potenziali vettori italiani solo *An. labranchiae*, e *An. superpictus* sono ancora presenti in densità epidemiologicamente rilevanti in alcune aree del nostro paese (43).

Per quel che riguarda l'Italia settentrionale, e in particolare le Regioni nordoccidentali (Veneto ed Emilia Romagna) dove era presente *An. sacharovi*, gli ultimi esemplari del vettore sono stati rinvenuti negli anni '60 e non ci sono state ulteriori segnalazioni (44).

Invece aree con densità anofeliche epidemiologicamente importanti sono ancora presenti in Toscana, limitatamente alla provincia di Grosseto, in Calabria, Puglia, Sicilia e Sardegna, dove permangono caratteristiche idrogeologiche o ambientali idonee allo sviluppo dei vettori (45), come di seguito riportato:

– Toscana

An. labranchiae è presente come specie anofelica dominante in tutta la Maremma Toscana. Densità elevate del vettore (anche con punte di centinaia per ricovero animale) sono presenti nelle aree circostanti i comprensori risicoli situati nei comuni di Grosseto (Principina - S. Carlo) e Orbetello (S. Donato). Altrove, dove l'anofele sfrutta focolai naturali o semi-naturali, le densità sono dell'ordine di poche unità o poche decine, ma comunque sufficienti ad innescare episodi di trasmissione della malaria come accaduto nel 1997 nell'entroterra di Castiglione della Pescaia (7).

– Calabria

I focolai di *An. labranchiae*, sparsi lungo le fasce costiere della regione, sono costituiti principalmente da zone impaludate che si formano alla foce di alcuni fiumi, da canali di bonifica e da invasi artificiali, mentre quelli di *An. superpictus* sono rappresentati da pozze isolate che si formano nel letto dei fiumi durante la magra estiva. In particolare, densità dell'ordine di poche unità o poche decine di esemplari sono state riportate lungo i fiumi Lao, Savuto e Torbido (costa Tirrenica), Crati, Salice, Careri e Bonamico (costa ionica) (43).

– *Puglia*

Mentre *An. sacharovi* sembra essere scomparso o comunque ridotto a densità minime, *An. labranchiae* è ancora presente lungo la fascia costiera del Gargano, dalla foce del fiume Fortore (Lago di Lesina) fino all'area palustre del fiume Candelaro, a sud di Manfredonia. In particolare, focolai larvali di anofeli sono stati rinvenuti in invasi artificiali d'acqua dolce per uso irriguo e in canali di bonifica, con densità di alate dell'ordine di pochi esemplari o poche decine nei ricoveri animali circostanti i focolai (43).

– *Sardegna*

Dopo l'interruzione dei trattamenti antivettoriali (anni '60), *An. labranchiae* ha ripreso a diffondersi fino a raggiungere attualmente, un'incidenza stimata 50 volte superiore a quella degli anni '60, ma ancora notevolmente inferiore a quella del periodo antecedente alla campagna antimalarica (45). La specie è diffusa a macchia di leopardo su tutto il territorio dell'isola in focolai di diversa natura, ma prevalentemente in corsi d'acqua. Nessun esemplare di *An. sacharovi* è stato rinvenuto in tempi recenti (43).

– *Sicilia*

Le inchieste recenti sono limitate alla provincia di Palermo ma, il fatto che *An. labranchiae* sia stata rinvenuta con estrema facilità (a volte anche in densità elevate) ovunque si sia cercato, suggerisce un'ampia diffusione della specie. I focolai larvali sono costituiti da ristagni d'acqua nel letto di corsi d'acqua e da invasi artificiali per la raccolta dell'acqua piovana (43).

– *Altre regioni*

Va aggiunto che popolazioni residue di *An. labranchiae* e *An. superpictus* potrebbero essere ancora presenti lungo le fasce costiere di Abruzzo, Molise, Campania e Basilicata dove tuttavia non sono state segnalate di recente densità epidemiologicamente rilevanti.

Capacità vettrice

L'elevata densità di popolazioni anofeliche riportata in alcune zone del nostro Paese, non costituisce necessariamente condizione di grave pericolo per la ripresa della trasmissione della malaria. Vi sono infatti altri fattori entomologici che debbono essere presi in considerazione per poter valutare il rischio di trasmissione. La capacità vettrice (CV) di una popolazione di zanzare è la misura correntemente impiegata in epidemiologia per valutare tale rischio nelle diverse aree geografiche. Essa esprime il numero di punture potenzialmente infettanti che possono originare in un giorno da un caso di malaria in una data zona o più precisamente da un soggetto portatore di gametociti in grado di infettare tutte le zanzare sensibili che compiono su di esso un pasto di sangue ed è condizionata dai seguenti fattori: antropofilia, longevità, densità del vettore per uomo e durata del ciclo sporogonico del plasmodio nell'anofele.

Valutazioni recenti della CV dei vettori italiani sono disponibili solo per *An. labranchiae* e limitatamente alla Toscana (Grosseto). I valori sono stati calcolati in due aree con densità anofeliche differenti dovute alla diversità e ampiezza dei focolai larvali. Nell'area S. Donato (Orbetello, 1994), la presenza di oltre 150 ettari di risaia aveva consentito al vettore il raggiungimento di densità superiori alle 200 punture per uomo per notte. Nell'entroterra di Castiglione della Pescaia (1998), la presenza di soli focolai naturali (canali di scolmatura)

limitava la densità di *An. labranchiae* a 5-10 punture/uomo/notte. I valori di CV, calcolati sia per *P. falciparum* che per *P. vivax*, sono riportati in Tabella 9. È opportuno notare che questo dato è stato ottenuto con catture di zanzare effettuate su soggetti che si erano esposti senza alcuna protezione alla puntura delle zanzare. Risulta evidente che il dato è puramente teorico in quanto difficilmente, in condizioni normali, un soggetto rimarrebbe esposto alle punture di zanzare così lungamente senza mettere in atto opportune misure protettive.

Tabella 9. CV di *An. labranchiae* per *P. falciparum* e *P. vivax* in provincia di Grosseto

Data	Risaia, 1994 (S. Donato, Orbetello)		Focolai naturali, 1998 (Castiglione della Pescaia)	
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Metà luglio	---	---	---	---
Inizio agosto	7	8	0,8	0,96
Fine agosto	26	32,5	2,9	3,3

*<0,01

Volendo paragonare i valori di capacità vettrice rilevati in Italia con quelli delle zone di endemia malarica bisogna considerare che nelle condizioni iperendemiche altamente stabili di molte zone della savana africana, la CV per *P. falciparum* raggiunge valori superiori a 10 e in alcuni casi superiori a 30. Ma anche un valore di 0,1 (cioè produzione media di una puntura infettante da un caso di malaria ogni 10 giorni) risulta largamente sufficiente a mantenere una condizione iperendemica quando il numero di portatori di gametociti di *P. falciparum* nella popolazione raggiunge il 50%. Il valore critico della capacità vettrice, ovvero la soglia al di sotto della quale la malaria non si mantiene endemica, è stato calcolato per la zona di Garki (Nigeria, Stato di Kano) e corrisponde a 0,022, cioè produzione media di circa 1 puntura infettante ogni 50 giorni a partire da un singolo caso di malaria (46).

Tenendo conto di quanto detto, è evidente che in teoria i valori di CV rilevati in alcune zone dell'Italia sono epidemiologicamente rilevanti e pertanto tali zone risulterebbero recettive.

Infettabilità del vettore

La possibilità che il ciclo sporogonico delle diverse specie plasmodiali si completi all'interno di un vettore è definita suscettibilità. È noto che solo poche specie di zanzare del genere *Anopheles* sono in grado di infettarsi e di trasmettere la malaria; inoltre è stato evidenziato come popolazioni di zanzare della stessa specie possano presentare, per ragioni genetiche, un diverso grado di sensibilità ai plasmodi o risultare completamente refrattarie alla infezione con ceppi di plasmodi appartenenti alla stessa specie plasmodiale ma provenienti da zone geografiche diverse. Poiché i plasmodi malarici sono stati eradicati in Italia da tempo, risulta importante determinare se le nostre zanzare siano ancora sensibili alla infezione con plasmodi provenienti dalle zone ove la malaria è endemica. Le poche evidenze scientifiche disponibili (47, 48) sembrano indicare la refrattarietà del nostro principale vettore *An. labranchiae* ad infettarsi con ceppi afro-tropicali di *P. falciparum*. È invece ormai certo che la specie può trasmettere *P. vivax*, come dimostra l'epidemia avvenuta in Corsica nel 1971 (49), i 5 casi occorsi in Grecia nel 1975-76 (50) e il caso sporadico verificatosi recentemente in provincia di Grosseto (7). La sensibilità di *An. superpictus* per *P. falciparum* di origine africana, non è stata saggiata ma è probabile che questa zanzara sia sensibile appartenendo al sottogenere *Cellia*, lo stesso a cui appartengono i principali vettori africani di malaria.

Tecniche per la valutazione della densità anofelica

Le diverse tecniche per il campionamento delle zanzare *Anopheles* (51) vanno adattate al comportamento dei singoli vettori. Come gran parte degli anofelini, anche le specie italiane hanno abitudini crepuscolari e notturne, ovvero sono attive per la ricerca del pasto di sangue dall'imbrunire all'alba, mentre di giorno riposano in luoghi riparati. *An. labranchiae*, come tutte le altre specie appartenenti al complesso *maculipennis*, e *An. superpictus* sono specie "endofile", cioè che scelgono i siti di riposo al coperto, preferibilmente nei fabbricati stessi dove hanno effettuato il pasto di sangue. Poiché anche specie fortemente antropofile trovano di fatto più facile accesso al bestiame piuttosto che all'uomo, i siti elettivi per la ricerca e la raccolta delle zanzare alate rimangono i ricoveri animali, in particolare quelli che presentino tetti bassi per favorire la raccolta degli anofeli, quali porcilaie, pollai, ecc. piuttosto che ampie stalle. La raccolta degli anofelini adulti avviene per aspirazione degli esemplari a riposo, con l'uso di appositi catturatori a bocca o elettrici; quella delle larve si effettua con appositi "pescalarve" direttamente nei focolai acquatici.

Raccolta degli anofelini adulti

Nelle prime ore della giornata si procede alla cattura esaustiva delle anofeli all'interno dei vari ricoveri animali. Il materiale raccolto viene portato in laboratorio per l'identificazione e la conta. La densità si esprime come numero di anofeli per ricovero animale, o per metro quadro di superficie di tetto o per minuti di cattura (quest'ultima valutazione risulta particolarmente utile in presenza di densità molto elevate e qualora non sia possibile la cattura esaustiva). La stessa tecnica può essere utilizzata per la cattura di anofeli in altri tipi di locali (abitazioni, rimesse, magazzini, ecc.)

Raccolta delle larve di *Anopheles*

La raccolta delle larve va fatta lungo i bordi dei potenziali focolai con un pescalarve standard (in genere da ½ litro). Il numero di pescate da effettuare è relativo all'estensione del focolaio. In caso di pozze, stagni o piccoli invasi artificiali il numero di pescate viene riportato alla superficie saggiata (in metri quadri); in caso di corsi d'acqua, aree palustri e altri focolai estesi, il numero di pescate viene riportato per metri (o passi) di perimetro percorsi. Il materiale raccolto viene portato in laboratorio per l'identificazione e la conta. La densità larvale si calcola come numero totale di larve per pescata o di larve dei vari stadi per pescata.

Valutazione del numero di punture per uomo per notte

Il numero di punture/uomo/notte può essere valutato sia all'esterno (*outdoor*) che all'interno (*indoor*) dei fabbricati. In genere il lavoro si effettua in coppia, dove un soggetto funge da esca e l'altro da catturatore. Si attende che gli anofeli si posino sull'esca e poi si catturano con l'aspiratore. La cattura va iniziata di regola mezz'ora dopo l'imbrunire e terminata mezz'ora prima dell'alba. Per ogni ora, o frazione di ora, si collocano le zanzare raccolte in appositi contenitori. In laboratorio si procede all'identificazione e alla conta del materiale. Il dato raccolto sarà tanto più attendibile quanto maggiore sarà il numero di coppie operanti (almeno due o tre) e di notti di raccolta. Per ricavare il numero di punture/uomo/notte, si divide il numero totale di anofeli raccolti per il numero di coppie operanti.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Malaria 1982-1997. *Weekly Epidemiological Record* 1999;74(32):265-70.
2. Missiroli A. La prevenzione della malaria nel campo pratico. III relazione. *Rivista di Malariologia* 1930;7:425-55.
3. Alessandrini M. *Dai pipistrelli al DDT, un ventennio di lotta antimalarica in provincia di Latina*. Latina: Tipografia artigiana moderna; 1960.
4. Missiroli A. Anopheles control in the Mediterranean area. In: *Proceedings of the 49^o International Congress on Tropical Medicine and Malaria*. Washington, May 10-18, 1948. p. 1666-75.
5. Cefalu M, Gullotta A. Su di un episodio epidemico occorso in fase di eradicazione della malaria in Sicilia. *Rivista di Malariologia* 1959;38:45-70.
6. Lazzara A, Morante V, Priolo A. Microfocolaio residuo di infezione malarica in provincia di Palermo. *Annali di Sanità Pubblica* 1967;28:725-41.
7. Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi, Severini C, Cuccagna P, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M. Introduced malaria in Maremma Italy, decades after eradication. *The Lancet* 1998;351:1246-8.
8. World Health Organization. *Terminology of malaria eradication*. Geneva: WHO; 1963.
9. Bucci A, Casaglia O, Monzali C, Bernardi AM., Sebastiani A. *La malaria in Italia. 1976-1980*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1982. (Rapporti ISTISAN 82/2).
10. Majori G, Sabatinelli G, Cavallini C, Squarcione S. Casistica della malaria di importazione in Italia nel periodo 1985-1989. *Parassitologia* 1990;32:173-4.
11. Sabatinelli G, Majori G, D'Ancona F, Romi R. Malaria epidemiological trends in Italy. *European Journal of Epidemiology* 1994;10:399-403.
12. Romi R, Boccolini D. and Majori G. Malaria surveillance in Italy: 1997 analysis and 1998 provisional data. *Eurosurveillance* 1999;4(718): 85-7.
13. D'Ancona F, Sabatinelli G, Squarcione S, Majori G. Prevenzione della malaria trasfusionale in Italia. *Parassitologia* 1994; 36: 41.
14. Orlando R. Malaria post-trasfusionale. *Recenti Progressi in Medicina* 1990;81:6.
15. Signorelli C, Messineo A. Airport malaria. *The Lancet* 1990;335(8682):164.
16. Sanguigni S, Marangi M, Cancrini G. Aspetti epidemiologici relativi ad un caso di malaria apparentemente autoctono. *Parassitologia* 1990;32:242-3.
17. Scotton PG, Vaglia A, Clari M, Carniato A. Un ennesimo caso di malaria criptica in Italia. *Giornale Italiano di Malattie Infettive* 1996;2:119.
18. Castelli F, Caligaris S, Matteelli A, Chiodera A, Carosi G, Fausti G. Baggage malaria in Italy: cryptic malaria explained? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;87:394.
19. Affronti M, Carella S, Cusumano G, Giannone G, La Manna N, Pezzati R, Piccione E, Ricco Galluzzo G, Salvaggio C. A proposito di malaria. In: *Atti del 2^o congresso nazionale della Società Italiana di Medicina Tropicale*. Bardolino, 79 maggio 1998. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale* 1998: 127.
20. Romi R, Boccolini D, Majori G. La malaria in Italia nel biennio 1999-2000: aggiornamento della casistica nazionale. *Giornale Italiano di Malattie Infettive* 2001;7(3):28-32.

21. Escalante A, Barrio E, Ayala F. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Molecular Biology and Evolution* 1995;12:616-26.
22. Escalante A, Ayala FI. Phylogeny of the malaria genus plasmodium derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:11373-7.
23. Aikawa M. Fine structure of malaria parasites in the various stages of development. In: Wernsdorfeer WH, Mc Gregor I (Ed.). *Malaria, principles and practice of malariology*. Vol 1. New York: Churchill Livingstone; 1988. p. 97-129.
24. Garnaham PCC. Malaria parasites of man: life-cycles and morphology (excluding ultrastructure). In: Wernsdorfeer WH, Mc Gregor I (Ed.). *Malaria, principles and practice of malariology*. Vol 1. New York: Churchill Livingstone; 1988. p. 61-96.
25. Pan American Health Organization - World Health Organization. *Manual for the microscopic diagnosis of malaria*. Washington: PAHO-WHO 1973. (Scientific publication no. 276).
26. World Health Organization. *Malaria diagnosis. New perspectives*. Geneva: WHO; 2000. WHO/MAL/2000.1091.
27. World Health Organization. *Bench aids for the diagnosis of human malaria*. Geneva: WHO; 1983.
28. Rickman LS, Long GW, Oberst R. Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *The Lancet* 1989;8629:68-71.
29. Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL. Detection of hematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitology Today* 1989;5:132-3.
30. Beadle C, Long GW, Weiss WR, Mc Elroy PD, Maret SM, Oloo AJ, Hoffman SL. Diagnosis of malaria by detection of Plasmodium falciparum hrp-2 antigen with a rapid dipstick antigen capture assay. *The Lancet* 1994;8897:564-8.
31. Shiff CJ, Minjas J and Pemji Z. The ParaSight-f test: a simple rapid manual dipstick test to detect Plasmodium falciparum infection. *Parasitology Today* 1994;10:494-5.
32. Singh N, Valecha N, Sharma P. Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1997;91:396-7.
33. Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodini P, Makler M. Immucapture diagnostic assays for malaria using Plasmodium lactate dehydrogenase (plhd). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999;60:109-18.
34. Bartoloni A, Srohmeyer M, Sabatinelli G, Benucci M, Serni U, Paradisi F. Limiti di utilizzo del saggio immunologico parasight-f per la diagnosi di malaria da plasmodium falciparum in soggetti con fattori reumatoidi. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale* 1997;2:15-9.
35. Weiss J. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1995;8(1):113-30.
36. Morgan UM, Thompson RCA. Molecular detection of parasitic protozoa. *Parasitology* 1998;117:73-85.
37. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal of Parasitology* 1997;27(10):1135-45.
38. Walliker D. The role of molecular genetics in field studies on malaria parasite. *International Journal of Parasitology* 1994;24(6):799-808.
39. Snounou G, Beck HP. The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitology Today* 1998;14(11):462-7.

40. Casaglia O, Zenobi P, Gradoni L, D'Ippolito D, Bucci A. Utilizzazione di antigene eterologo per la titolazione di anticorpi antimalarici: confronto tra elisa e ifa test. *Parassitologia* 1983;25:230-5.
41. World Health Organization. *International travel and health: vaccination requirements and health advice*. Geneva: WHO; 2000.
42. Hackett LW, Missiroli A. The varieties of *Anopheles maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe. *Rivista di Malariologia* 1935;14:45-109.
43. Romi R., Pierdominici G, Severini C, Tamburro A, Cocchi M, Menichetti D, Pili E, Marchi A. Status of malaria vectors in Italy. *Journal of Medical Entomology* 1997;34:263-71.
44. Zamburlini R, Cargnus E. Anofelismo residuo nel litorale altoadriatico a 50 anni dalla scomparsa della malaria. *Parassitologia* 1998;40:431-8.
45. Marchi A, Munstermann LE. The mosquitoes of Sardinia: species records 35 years after the malaria eradication campaign. *Medical and Veterinary Entomology* 1987;1:89-96.
46. Molineaux L, Gramiccia G. *Le projet Garki*. Geneva: World Health Organization; 1980.
47. Zulueta de J, Ramsdale CD, Coluzzi M. Receptivity to malaria in Europe. *Bulletin of WHO* 1975;52:109-11.
48. Ramsdale CD, Coluzzi M. Studies on the infectivity of tropical african strains of *Plasmodium falciparum* to some southern European vectors of malaria. *Parassitologia* 1975;17:39-48.
49. Sautet J, Quilici R. A propos de quelques cas de paludisme autochtone contractée en France pendant l'été. *Presse Médicale* 1971;79:624.
50. Zahar AR. *Vector bionomics in the epidemiology and control of malaria. Part II: the WHO European region and the WHO eastern Mediterranean region*. Vol I. Geneva: World Health Organization; 1990. (Applied field studies). (WHO/vbc/90.2).
51. World Health Organization. *Manual on practical entomology in malaria*. Part II. Geneva: WHO; 1975.

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, settembre 2001 (n. 3) 12° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*