ALBERTO MISSIROLI

51. DIAGNOSI DIFFERENZIALE DEI PARASSITI MALARIGENI NEI PREPARATI COLORATI.

Alcuni ritengono che la ricerca e la classificazione dei parassiti malarici nell'uomo non richieda una particolare perizia. Forse questo giudizio è esagerato perchè in verità non sono molti quelli che conoscono tutti gli accorgimenti per ottenere un buon preparato, e che hanno tanta conoscenza della morfologia dei parassiti da poter procedere sempre ad un giudizio esatto.

Come giustamente osserva Wenyon, è facile indentificare certi stadî di sviluppo dei parassiti malarigeni; così quando si riscontra il *P. vivax* in un globulo rosso ingrandito con granuli di Schüffner ed il caratteristico pigmento giallo-bruno, si procede facilmente alla diagnosi; analogamente il reperto di semilune o di forme mature di *P. malariae*, in cui si osserva un parassita ricco di pigmento che riempie il globulo rosso non ingrandito, non permette confusione con altra forma parassitaria: ma in altri stadî, specialmente quando si tratta di fare la diagnosi dall'esame di un parassita solo, si possono trovare difficoltà insormontabili. Così una forma giovane di *P. malariae* può essere facilmente confusa con forme adulte di *P. immaculatum* quando queste ultime — ciò che accade di rado — si riscontrino nel sangue periferico. In questi casi dubbi, se vi è possibile, è bene di non arrischiare la diagnosi ma di ripetere l'esame a distanza di qualche ora, ciò che renderà possibile spesso di trovare qualche forma più caratteristica che permetta di precisare il vostro giudizio.

Questa cautela non sembrerà superflua a chi ha un po' di esperienza in proposito e conosce la frequenza con cui vengono commessi errori diagnostici anche da abili ricercatori.

A questo proposito James dopo aver affermato che gli errori diagnostici dei parassiti malarigeni nella moderna letteratura sono troppo numerosi per essere citati, riferisce due interessanti esempi nella letteratura di 25 anni fa: nel primo articolo di Leishman sull'applicazione della

colorazione di Romanowsky alla diagnosi microscopica della malaria, è facile osservare dalla descrizione e dall'illustrazione, che l'A. identificò e descrisse come parassita della quartana ciò che era un parassita della terzana maligna; ed a loro volta Stephens e Christophers, nel loro primo rapporto sull' infezione malarica dei bambini indigeni dell' Africa Centrale inglese, commisero precisamente l'errore inverso.

Ciò vi convincerà come la diagnosi microscopica della malaria esiga la più accurata osservazione ed un giudizio ben meditato.

Dovendo procedere all'esame di un parassita in un preparato colorato, voi dovete prendere in considerazione i seguenti caratteri:

1) la forma e la grandezza del parassita;
2) i caratteri del citoplasma e del nucleo;
3) i caratteri del pigmento;
4) le alterazioni prodotte nel globulo rosso.

Si deve però tener presente che nei preparati colorati le dimensioni dei globuli rossi e, forse in ugual misura, quelle dei parassiti, non coincidono con quelle degli esami a fresco, poichè l' essiccamento del preparato e la fissazione successiva con alcool metilico, conducono ad una retrazione del globulo rosso, per cui i suoi diametri appaiono diminuiti. Misurando una serie di globuli rossi in un preparato a fresco ed in uno colorato dello stesso individuo, notai una diminuzione del diametro dei globuli rossi del preparato colorato, come si può desumere dalla tabella sotto trascritta:

MISURA DEL DIAMETRO DI 100 GLOBULI ROSSI A FRESCO.

Misura in micromillimetri	μ — 6.4	μ — 7.20	μ — 8	μ — 8.8	μ — 9.6
Numero dei globuli rossi . . .	14	0	65	20	1

MISURA DEL DIAMETRO DI 100 GLOBULI ROSSI DELLO STESSO INDIVIDUO NEL PREPARATO COLORATO CON LIQUIDO DI GIEMSA.

Misura in micromillimetri	μ — 6.4	μ — 7.20	μ — 8	μ — 8.8	μ — 9.6
Numero dei globuli rossi . . .	17	19	56	5	3

Calcolando che il parassita malarigeno si riduca in ugual misura del globulo rosso, i suoi rapporti col globulo rosso, per quanto riguarda le dimensioni, rimarrebbero però costanti negli esami a fresco e negli esami del preparato colorato.

Esaminando un preparato colorato voi prenderete in considerazione subito la forma del parassita: c'è una forma che è comune alle tre specie dei parassiti malarigeni, cioè la *forma anulare*, con cui le forme asessuate di tutti e tre i parassiti iniziano il loro sviluppo.

Nei primi stadî la grandezza di questi anelli dipende naturalmente dalla grandezza dei merozoiti da cui derivano, e siccome i merozoiti di *P. immaculatum* sono più piccoli di quelli di *P. malariae* e di *P. vivax*, ne deriva che le più piccole forme anulari apparterranno al *P. immaculatum*. (Tav. III, fig. 1).

La misura media del diametro dei *merozoiti* delle tre specie è la seguente:

P. immaculatum	μ 0,7
P. vivax	μ 1,5
P. malariae	μ 1,75

A sua volta la grandezza media dei merozoiti è in rapporto con la grandezza degli schizonti da cui derivano e col numero dei merozoiti a cui questi dànno luogo. Gli schizonti adulti del *P. immaculatum* misurano appena un diametro di μ 4,5-μ 5, per cui occupano appena i due terzi del globulo rosso e dànno luogo in media a 16-22 merozoiti.

Esaminando alcune rosette nel sangue periferico noi abbiamo constatato da 10 a 13 merozoiti mentre nel midollo osseo ne contammo da 8 a 21.

Se ora esaminiamo lo schizonte adulto del *P. vivax* troviamo che misura un diametro di μ 9-μ 12; è perciò più grande di un globulo rosso normale, ed il numero dei merozoiti derivanti dalla segmentazione del parassita terzanario adulto oscilla, secondo alcuni ,fra 15-20, e fra 16-23 secondo nostre ricerche.

Se passiamo ad esaminare lo schizonte adulto del *P. malariae*, si riscontra che esso riempie quasi totalmente il globulo rosso, che spesso è più piccolo del normale, perciò il suo diametro raramente supera i μ 6,5. Il numero dei merozoiti è appena la metà di quelli che derivano

dalla segmentazione degli schizonti dei parassiti della estivo-autunnale e della terzana benigna, cioè da 6-12, e perciò si comprende come il diametro dei merozoiti quartanari sia notevolmente superiore a quello delle altre due specie parassitarie.

Da ciò deriva che gli anellini più piccoli che voi potrete trovare sono quelli della terzana maligna, che possono misurare fino a 1/5-1/6 del diametro del globulo rosso. Questi piccoli anelli, detti anche *piccoli anelli dell'estivo-autunnale*, sono caratteristici poichè si riscontrano raramente nella terzana benigna e mai nella quartana, dove i più piccoli parassiti, quando hanno invaso il globulo rosso, sono già grandi come i medi anelli dell'estivo-autunnale.

I piccoli anelli dell' estivo-autunnale sono caratterizzati da una notevole quantità di cromatina, mentre il citoplasma si presenta ancora assai ridotto.

Si osserva alle volte che il citoplasma occupa due terzi dell'anello, mentre l'altro terzo è occupato dalla cromatina disposta in forma di sbarretta che, vista a forte ingrandimento, si presenta costituita di 3-4 granuli ben distinti.

Di solito in questi casi la parte dell'anello costituita dal citoplasma è sottile e di spessore uniforme. Altre volte invece il citoplasma presenta la forma di un anello ispessito nella porzione opposta al nucleo od in una delle porzioni lateralmente al nucleo, che appare costituito di un grosso granulo di cromatina.

In questo stadio i *piccoli anelli* dell'estivo-autunnale non presentano pigmento. Dovremo però, a questo riguardo, avvertire che nei preparati colorati non è sempre facile vedere il pigmento anche nei grandi anelli della terzana benigna, e che, come dimostrarono Marchiafava e Bignami, qualche volta si può riscontrare nella malaria perniciosa parassiti che durante l'intero sviluppo non presentano pigmento.

Durante questa fase di sviluppo è facile trovare dei piccoli parassiti aderenti alla superficie periferica del globulo rosso, che vengono denominati *forme accollate*, e che da alcuni sono ritenute come caratteristiche dell'estivo-autunnale. (Tav. III, fig. 2).

In verità queste forme accollate si trovano di preferenza nell'estivo-autunnale, ma si riscontrano anche nella terzana e nella quartana, non mai però in numero così notevole come nell'estivo-autunnale. Per cui se

si constata la presenza di un piccolo anello contemporaneamente ad una forma accollata, si ha una ragione di più per affermare che si tratti di parassiti di estivo-autunnale.

La diagnosi differenziale fra gli anellini della terzana maligna e i piccoli anellini della terzana benigna sarà agevolata prolungando la colorazione con la soluzione di Giemsa o di Leishman per 45-60 minuti, come ha suggerito James di recente.

Con tale metodo si può dimostrare come i piccoli parassiti della terzana benigna, che si riscontrano durante il brivido, ed aventi un diametro di μ. 1,6-2,4, inducano subito un'alterazione del globulo rosso, che si presenta con pochi, fini granuli di Schüffner disseminati nel globulo rosso, che si colora tutto di una tinta rossastra.

L'impiego di questo metodo è particolarmente utile per diagnosticare le infezioni miste, poichè potremo così discernere gli anelli della terzana benigna da quelli della terzana maligna nello stesso striscio, in qualsiasi stadio del loro sviluppo.

Nella fase di sviluppo successivo i parassiti sono grandi da un terzo ad un quarto del diametro del globulo rosso e prendono il nome di *medi anelli dell'estivo-autunnale*. In questo stadio presentano granuli finissimi di pigmento, disposti per lo più sul margine periferico o sparsi nel citoplasma, ove naturalmente sono meno visibili di quelli situati alla periferia.

I *medi anelli* dell'estivo-autunnale appaiono sempre dentro il globulo rosso in forma di anelli sottili, delicati, intensamente colorati. (Tav. III, figg. 5-6).

Mentre nello stadio precedente i giovani parassiti si vedono spesso come infossati od incastonati nell'orlo dell'emazia, nello stadio successivo pigmentato i parassiti sono tutti endoglobulari, la qual cosa dimostra che i giovani plasmodi, dopo essere rimasti per qualche tempo aderenti all'emazia, presto vi penetrano ed il loro sviluppo continua solo dopo tale penetrazione.

I medi anelli dell'estivo-autunnale presentano le stesse caratteristiche morfologiche dei piccoli anelli; si tenga presente l'osservazione di Bignami e Bastianelli secondo cui non sempre il citoplasma presenta la forma di un cerchietto regolare, ma mostra spesso deformazioni e prolungamenti, ciò che si vede specialmente se si essica presto il preparato; allora l'essiccamento colpisce e fissa i parassiti durante il movimento ameboide.

Da ciò deriva l'osservazione di forme parassitarie giovani, senza vacuolo, costituite da un filamento di citoplasma diritto o ripiegato in varie guise, con un nucleo ben sviluppato situato all'estremità o nel mezzo del filamento citoplasmatico, in cui la cromatina nucleare assume varie disposizioni. (Tav. III, fig. 7).

Tali forme sono comunissime nella terzana benigna, meno comuni nell'estivo-autunnale, e più rare nella quartana. L'osservazione di queste forme ha condotto a indubitabili errori diagnostici fra ricercatori di grande valore, poichè si osservano nei primi stadî di sviluppo del parassita, quando senza speciali accorgimenti, è difficile mettere in evidenza le modificazioni del globulo rosso che possano aggiungere un nuovo criterio per formulare il nostro giudizio.

Così Stephens (1914) diede il nome di *Plasmodium tenue* ad un parassita malarigeno trovato in un preparato mandato dall'India, caratterizzato da marcate forme ameboidi e dalla notevole quantità di cromatina irregolarmente disposta, corrispondente alla forma che ho descritto sopra.

Malgrado che Sinton abbia riferito di casi di malaria in India che presentano regolarmente la forma descritta da Stephens, tuttavia si deve ancora ritenere che il *P. tenue* non sia che uno stadio ameboide di uno dei tre noti parassiti malarigeni. (Tav. III, figg. 12-13; Tav. I, fig. 8).

Da alcuni vengono ritenute come caratteristiche dell'estivo-autunnale, alcune forme in cui si osservano dei granuli di cromatina, ciascuno disposto ai poli opposti dell'anello, ed altre forme in cui l'anello citoplasmatico si presenta come interrotto e porta a ciascuno dei due estremi un granulo di cromatina; però tali forme si riscontrano in minor numero ancora nella terzana benigna. (Tav. III, fig. 4).

Le infezioni molteplici dello stesso corpuscolo rosso sono frequenti in questo stadio e sono assai più comuni nell' estivo-autunnale che nelle altre specie di malaria.

Nei casi gravi o nelle forme primitive di estivo-autunnale, si possono trovare da due fino a sei e più parassiti nello stesso globulo rosso; i parassiti sono sempre separati l'uno dall'altro, ma se si trovano aderenti, ciacuno conserva la sua individualità. Nei casi in cui si rinvengano parassiti in vario grado di sviluppo, come nelle febbri gravi, possono coesistere nello stesso globulo rosso parassiti giovani e forme avanzate nel loro sviluppo od anche vicino alla scissione.

Col successivo sviluppo dei parassiti il numero dei globuli rossi contenenti più di un parassita diminuisce, così che si deve pensare che con l'aumento del volume dei parassiti il globulo rosso finisca col frammentarsi. (Tav. III, fig. 11).

Nell'estivo-autunnale, circa 18-24 ore dopo l'accesso, noi troviamo *i grandi anelli dell'estivo-autunnale* che possono raggiungere il diametro di 4-4,5 micromillimetri, vale a dire che possono raggiungere, e qualche volta superare, la metà del diametro di un globulo rosso. (Tav. III, figure 9-10).

In questo periodo i preparati di estivo-autunnale presentano parassiti di tutte le grandezze: piccoli, medi e grandi; ciò è dovuto al fatto che nell'estivo-autunnale la schizogonia non si manifesta con la stessa uniformità come per le altre specie di parassiti.

Difatti nelle infezioni recenti lo sviluppo dei parassiti della terzana benigna avviene con una certa uniformità nei riguardi del tempo, per cui ad un dato momento possiamo trovare, ad esempio, quasi tutti i parassiti in via di moltiplicazione, e qualche ora più tardi quasi tutti i parassiti in forma anulare.

Questa uniformità di sviluppo di regola scompare nelle recidive, per cui il reperto dell'esame del sangue può in questi casi presentare accanto a forme giovanissime schizonti già maturi.

Un reperto uniforme in una infezione di *P. vivax* depone perciò in favore di una infezione recente.

Se esaminiamo il sangue di un ammalato di febbre terzana benigna in cui l'accesso febbrile sia insorto nelle prime ore del mattino, noi potremo trovare, durante il brivido, rari *piccoli anelli* con diametro inferiore a micromillimetri 2, che hanno già determinato alterazioni del globulo rosso, per cui con appropriati metodi di colorazione, già descritti, possiamo mettere in evidenza tenui granulazioni di Schüffner.

Se l'accesso termina verso mezzogiorno, noi troveremo già durante le prime ore del pomeriggio *i medi anelli della terzana benigna*, i cui diametri misurano circa μ 2,5 ciascuno, vale a dire circa la terza parte di quello di un globulo rosso normale. (Tav. I, figg. 3-4).

Sul finire dell'accesso febbrile gli anelli della terzana benigna sono dunque già grandi come *i medi anelli dell'estivo-autunnale*.

Ciò dimostra quanto rapido sia lo sviluppo del parassita terzanario, e per quale motivo sia raro il reperto dei piccoli anelli della terzana benigna.

In questo stadio le forme anulari della terzana benigna o non contengono pigmento o pochissimi granuli. Però mentre la fase apigmentata nei parassiti della terzana maligna ha una lunga durata, invece nei parassiti terzanari la pigmentazione avviene rapidamente e dopo 6-8 ore dalla fine dell'accesso troviamo forme anulari ed ameboidi che già presentano finissimi granuli di pigmento. Successivamente dopo 10-12 ore appaiono *i grandi anelli della terzana benigna* (Tav. I, fig. 9), che hanno un diametro di μ 3,5-μ 4-5; per cui il diametro dei grandi anelli dell'estivo-autunnale può soltanto raggiungere *raramente* quello dei grandi anelli *meno sviluppati* della terzana benigna.

La forma degli anelli della terzana benigna corrisponde in gran parte ai caratteri di quelli della terzana maligna; il citoplasma circonda il vacuolo in forma di anello, che si presenta generalmente ispessito nella porzione opposta al nucleo, il quale appare di solito sotto forma di un grosso granulo di cromatina, e raramente sotto forma di sbarretta o di segmento di cerchio. Qualche volta, come si è detto, si possono osservare due granuli distinti di cromatina che possono essere situati uno vicino all'altro od ai poli opposti all'anello.

Dopo 6-8 ore dalla cessazione dell'attacco noi troveremo la massima parte dei giovani parassiti sotto forma di anelli regolari, ma attesa la vivace attività ameboide che si manifesta rapidamente in questa specie parassitaria, noi possiamo trovare anche forme assai irregolari. (Tav. I, figg. 3-6-7).

Il numero dei grandi anelli con diametro di μ 4,5 è generalmente assai scarso perchè quando i parassiti hanno raggiunto tali dimensioni assumono più lentamente la forma di riposo, per cui nei preparati colorati presentano in gran parte il *tipico aspetto ameboide* dei parassiti della terzana benigna.

In questo stadio la piccola massa citoplasmatica, che rappresenta il parassita, manda sottili propaggini in ogni direzione le quali si spingono non di rado fino alla periferia del globulo rosso che viene solcato in varie direzioni. (Tav. I, fig. 10).

Da questo svolgimento di propaggini non di rado risulta quasi l'apparenza di un irregolare sistema di trabecole che suddividono la sostanza globulare, delle quali trabecole sfugge qualche volta perfino la connessione.

Si tenga presente che il pigmento tende di regola ad accumularsi verso le estremità di solito lievemente ingrossate di queste propaggini, per cui si ha alle volte l'apparenza che nel globulo rosso esistano parecchi parassiti; a dare la quale apparenza naturalmente contribuisce anche il diverso livello in cui si trovano le trabecole di congiunzione fra le singole parti del parassita. (Tav. I, fig. 13).

Certo si possono trovare entro lo stesso globulo rosso due e più parassiti, ma è meno frequente di quanto il detto modo di presentarsi possa far credere ad un inesperto.

Passando a discorrere della quartana dirò subito come i più piccoli anelli abbiano un diametro di μ 2,5 ed i più grandi raggiungono μ 3, così che nella quartana può dirsi che non troviamo che anelli medi.

Morfologicamente gli anelli della quartana sono simili agli anelli medi della terzana benigna, da cui sarebbe impossibile differenziarli per i soli caratteri morfologici.

Però nella quartana il *reperto di anelli tipici è così raro che praticamente tale difficoltà diagnostica non esiste*; ciò devesi al fatto che i parassiti della quartana, sopratutto nei primi stadî, tendono forse di preferenza a svilupparsi negli organi ematopoietici. Se si aggiunge che questo parassita in ogni stadio del suo sviluppo ha tendenza a dare forme compatte più o meno allungate ed a nastro, e che perciò in ogni caso il vacuolo nutritizio tende a sparire dopo 8-10 ore dalla fine dell'accesso febbrile, si comprende facilmente la difficoltà di trovare forme anulari in circolo.

Quando vi trovate di fronte ad una forma anulare i caratteri del citoplasma e del nucleo non sono sufficienti a condurvi alla diagnosi, eccettuato il caso in cui la presenza di uno o due granuli, ben evidenti, di pigmento nero non vi confermi la diagnosi di quartana.

Esaminando invece *la grandezza dei singoli anelli*, voi potrete trarre qualche criterio diagnostico. Se vi trovate, per esempio, in presenza di piccoli anelli con diametro inferiore a μ 1,6, o di grandi anelli con diametro superiore a μ 4, nel primo caso si tratterà, con ogni probabilità,

dei piccoli anelli dell'estivo-autunnale, e nel secondo caso di grandi anelli della terzana benigna.

Esaminando la tabella che riporto appresso si vedrà come si possano trovare piccoli anelli del diametro di μ 1,6 anche nella terzana benigna, vale a dire con un diametro appena uguale a quello dei merozoiti, ma ciò è una eventualità non comune e difatti mentre in dieci preparati di estivo-autunnale trovammo 32 piccoli anelli, invece esaminando 28 preparati di terzana benigna potemmo trovarne appena sei.

Quando si tratti di *medi anelli* l'esame della forma e della grandezza non vi fornirà alcun criterio per differenziare una specie parassitaria dall'altra.

Nella tabella che qui riporto troverete elencato il numero delle forme anulari e le loro dimensioni, ritrovate in un numero determinato di preparati scelti a caso fra molti preparati esistenti presso il nostro laboratorio.

Gli anelli medi, fra μ 2,4 e μ 3,2, costituiscono la maggioranza degli anelli della terzana benigna e dell'estivo-autunnale, però nell'estivo-autunnale la maggioranza degli anelli medi è rappresentata da quelli col diametro di μ 2,4, invece nella terzana benigna la maggioranza degli anelli medi misurano un diametro di μ 3,2.

I *grandi anelli* sono invece una caratteristica della terzana benigna, perchè non ne troviamo che 1 % nell'estivo-autunnale e sono assenti nella quartana.

In quest'ultima specie, cioè nel *P. malariae*, l'esame di circa 77 preparati non ci condusse a trovare che 4 anelli medi, la qual cosa vi dice che quando troverete anelli piccoli e grandi non può trattarsi di quartana, e vi dice ancora come il reperto di forme anulari sia poco frequente nella quartana, per cui se troverete molte forme anulari nello stesso preparato potrete ritenere ciò come un criterio per escludere la quartana.

GRANDEZZA DELLE FORME ANULARI DEI PARASSITI MALARIGENI NEI PREPARATI COLORATI.

Diametro in micromillimetri del parassita	μ 1.6	μ 2.4	μ 3.2	μ 4	μ 4.8	N. dei preparati esaminati
N. delle forme di *P. immaculatum* .	31	52	20	1	0	10
N. delle forme di *P. vivax*	6	33	47	14	7	28
N. delle forme di *P. malariae* . .	0	0	4	0	0	77

La difficoltà diagnostica più grave la troverete alla presenza di *anelli medi*, comunissimi nella terzana maligna e frequenti nella terzana benigna; quindi se vi troverete soltanto di fronte a rari anelli medi, per giungere alla diagnosi non vi rimane che studiare *le modificazioni morfologiche a cui è andato incontro il globulo rosso invaso dai parassiti.*

L'esame del pigmento non può fornirvi alcun criterio poichè durante questo stadio anulare della terzana maligna e della terzana benigna il pigmento appare in finissimi granuli, che nei preparati colorati — previa fissazione in alcool per un periodo superiore ad un minuto — non si vedono o difficilmente se ne può studiare i caratteri.

Occorre quindi vedere quali alterazioni dei globuli rossi, rilevabili nei preparati colorati, siano peculiari delle singole specie parassitarie.

Una delle proprietà più caratteristiche dei parassiti della terzana benigna, particolarmente riferentesi ai loro rapporti con la sostanza del globulo rosso, è la grande rapidità con cui, per la trasformazione dell'emoglobina in melanina, ha luogo lo scoloramento della sostanza globulare medesima. Già nelle ore del mattino del giorno di perfetta apiressia i corpuscoli rossi ospitanti un parassita si differenziano dagli altri pel considerevole pallore della sostanza globulare relativa, il quale pallore, per la progressiva distruzione dell'emoglobina, va rapidamente aumentando fino a che alcune ore prima della febbre, la sostanza globulare si presenta in forma di un'areola così pallida che appena può essere distinta.

I globuli rossi invasi dai parassiti a poco a poco aumentano di volume fino a raggiungere un diametro inferiore al doppio di un globulo rosso normale. Queste alterazioni del globulo rosso sono evidenti anche nei preparati colorati, poichè i globuli invasi da parassiti terzanari, che si presentano idropici e scoloriti all'esame a fresco, manifestano minore affinità per le sostanze coloranti per cui appaiono scoloriti.

Tali alterazioni sono chiaramente manifeste quando il parassita ha raggiunto le dimensioni dei *grandi anelli*, e sono accennate durante la fase dei medi anelli, per cui questi caratteri costituiscono di regola un buon criterio diagnostico.

Non dobbiamo però dimenticare che negli stati anemici gravi, determinati spesso rapidamente dalla terzana maligna, possiamo trovare cor-

puscoli rossi ingranditi (macrociti) che presentano parassiti anulari, e che quando un corpuscolo rosso è invaso da due o tre parassiti dell' estivo-autunnale, coll'aumentare del loro volume aumenta anche quello del globulo rosso, finchè si frammenta. (Tav. III, fig. 11).

Tali possibilità vanno tenute presenti nel valutare nella giusta misura i caratteri relativi all'aumento del volume del corpuscolo rosso parassitato.

I globuli rossi anzichè aumentare di volume possono andare incontro al raggrinzimento con modificazioni di colore dell' emoglobina. Questa alterazione si manifesta nel suo più alto grado nei così detti globuli rossi ottonati, descritti da Marchiafava e Celli, che si trovano nelle febbri estivo-autunnali, e solo eccezionalmente, come hanno notato Bignami e Bastianelli, nella terzana benigna.

Il globulo rosso si rimpiccolisce, si raggrinza e prende un colorito oro vecchio od ottone, per cui tali globuli rossi furono detti *ottonati*.

I *globuli rossi* ottonati si sogliono vedere nell'apiressia che precede un nuovo accesso febbrile quando tutti o quasi tutti i parassiti estivo-autunnali che si trovano nel sangue circolante sono finemente pigmentati alla periferia, o, negli stadî più avanzati, quando il pigmento tende a raccogliersi nel centro.

In secondo luogo si possono trovare dopo la somministrazione della chinina, ed in questo caso si presentano ottonati anche molti globuli rossi contenenti parassiti giovani.

Nei preparati colorati voi potrete notare soltanto che il volume del globulo rosso è normale o subnormale, ma sfuggono naturalmente i caratteri relativi al colore ottonato.

Io non ho considerato il caso di un anello della quartana perchè il globulo rosso durante lo stadio anulare presenta alterazione di forma e di colore appena percettibili. Difatti nella quartana i globuli rossi invasi dai parassiti conservano il loro caratteristico colore giallo-verdognolo fino all'ultima fase, e cioè anche quando i globuli rossi non sono rappresentati che da un sottile strato che appare soltanto leggermente più pallido. Nei preparati colorati si osserva che nei globuli rossi che ospitano forme parassitarie ameboidi, già prossime alla segmentazione, la sostanza globulare si colora meno intensamente dei globuli normali; in questo stadio

il globulo rosso appare leggermente ridotto nel suo volume, *ciò che può considerarsi una caratteristica dei parassiti quartanari.*

I parassiti malarigeni determinano non soltanto modificazioni del volume e del colore del globulo rosso invaso, ma anche particolari modificazioni nella sua struttura chimico-fisica, per cui con le comuni sostanze coloranti si riesce a mettere in evidenza alcuni *granuli diffusi nella parte residua del globulo rosso, in numero, forma e grandezza differenti, a seconda della specie parassitaria che invade il globulo rosso.*

Secondo Bechhold, Bechhold e Kraus, Salen, che hanno eseguito una analisi prevalentemente ultramicroscopica delle emazie, queste risultano di uno stroma reticolare delicato, non propriamente solido, costituito da un proteide in stato di imbibizione, forse un nucleo-proteide, insolubile in acqua ed in soluzione fisiologica (una specie di ragnatela, dice Bechhold), che però non riempirebbe l'interno del globulo, ma sarebbe disposto solo alle periferia, come la rete di un pallone. Le maglie del reticolo sarebbero ripiene di lipoidi, la lecitina e la colesterina, di cui la prima in stato di imbibizione, la seconda (che non è idrofila) sciolta nella prima, in modo da formare una miscela otticamente omogenea.

L'involucro delle emazie sarebbe dunque dato da tre costituenti: il proteide, la lecitina (in stato ambedue di imbibizione), la colesterina. L'interno conterrebbe una soluzione densa di emoglobina e sali.

Tutto ciò che altera la soluzione di emoglobina, oppure probabilmente tutto ciò che turba i rapporti fra lecitina e colesterina, o modifica lo stato di imbibizione del proteide colla lecitina, può condurre alla formazione di questa nuova sostanza sotto forma di granuli che noi riusciamo a mettere in evidenza coi nostri metodi di colorazione.

Si deve quindi ritenere per erronea l'ipotesi di Chatton, secondo cui i granuli di Schüffner sarebbero una conseguenza dell' attività ameboide dei parassiti e rappresenterebbero le orme stampate dai pseudopodi nei loro vivaci movimenti.

Nè si può accettare l'ipotesi di J. G. Thomson e A. Robertson, che si tratti di prodotti granulari degenerativi simili ai granuli basofili che appaiono sovente nelle emazie, poichè i granuli basofili delle emazie non sono prodotti degenerativi, ma residui della sostanza basofila del primitivo citoplasma linfoide eritroblastico.

A seconda della specie parassitaria che invade il globulo rosso, noi potremo destinguere:

a) granuli di Schüffner, caratteristici della terzana benigna;
b) macchie di Maurer, caratteristiche della terzana maligna;
c) granuli di Ziemann, caratteristici della quartana.

Quando ci troviamo di fronte ad un *anello medio*, le caratteristiche granulazioni del globulo rosso possono fornire una preziosa indicazione per precisare la specie parassitaria.

Però occorre notare che è difficile mettere in evidenza i granuli di Ziemann e che molte volte non si riesce a colorare le macchie di Maurer, quindi questo carattere ha più valore quando è positivo che quando è negativo.

James raccomanda la tecnica di Shute per colorare i granuli di Ziemann, ma anche eseguendo rigorosamente i dettagli raccomandati da Shute, si riesce difficilmente a colorare i granuli di Ziemann.

Per eseguire la colorazione, James raccomanda di mettere 4 gocce della soluzione Leishman sullo striscio per 10 secondi e aggiungere 12 gocce di acqua distillata; si mescola poscia dolcemente inclinando il vetrino ora da una parte, ora dall'altra. Non si usano mai bacchette di vetro per mescolare l'acqua colla sostanza colorante perchè possono portare impurità nocive alla colorazione.

La durata del periodo di colorazione varia a seconda che si voglia studiare la morfologia dei parassiti o le alterazioni dei corpuscoli rossi invasi, perchè i parassiti si colorano molto più rapidamente che non i granuli che appaiono nei corpuscoli rossi. Prolungando la colorazione col metodo suddetto o col metodo di Giemsa per 20 minuti, si otterrà una buona colorazione dei parassiti o dei granuli di Schüffner. Volendo, viceversa, mettere in evidenza i tenui granuli di Schüffner che compaiono nei corpuscoli rossi contenenti le forme più giovani di terzana benigna, o i granuli di Ziemann nelle infezioni quartanarie, o le macchie di Mauer dei parassiti della estivo-autunnale, dovremo prolungare la colorazione per 45-50 minuti, cambiando il liquido colorante dopo 25 minuti.

Nella pratica corrente si è scelto un compromesso fra una buona colorazione dei parassiti ed una buona colorazione dei prodotti delle alterazioni del globulo rosso e si prolunga la colorazione per 30 minuti.

Forme giovani ameboidi.

Come è noto, i parassiti malarigeni, ed in special modo il *P. immaculatum* ed il *P. vivax,* sono dotati di vivaci movimenti-ameboidi fino dai primi stadî del loro sviluppo.

Come sapete dall'esatta descrizione di Marchiafava e Bignami, i parassiti giovani, senza pigmento, dell' estivo-autunnale rinvenuti nei preparati a fresco, si presentano come piccole massoline protoplasmatiche, bianchiccie, fornite di vivaci movimenti ameboidi, che si compiono alla temperatura ambiente.

Allo stato di riposo hanno una forma rotondeggiante, e da questa forma passano agli aspetti più svariati, emettendo prolungamenti sottili e diafani che talora si ramificano e poi si retraggono, mentre ne sono emessi dei nuovi da altri punti della periferia. Alla temperatura ordinaria dell'estate questi movimenti si seguono a distanza da 20 a 40 minuti.

Quando il parassita cessa di muoversi, gli pseudopodi di regola sono contratti specialmente nelle forme più giovani, esso prende così una forma circolare, e appare nella parte periferica più bianchiccio che non nella parte centrale.

In questo stadio, ricorrendo ai metodi comuni di colorazione, i giovani parassiti appaiono sotto forma tipica di anelli, che può considerarsi come lo stato di riposo del parassita.

Nelle fasi successive i movimenti ameboidi del parassita dell'estivo-autunnale si mantengono molto vivaci fino a che non si iniziano alcune modificazioni che conducono poi alla moltiplicazione del nucleo.

A loro volta le *forme giovani senza pigmento dei parassiti della terzana benigna* sono mobilissime; le forme in movimento mandano sottili propaggini che possono ramificarsi in ogni direzione raggiungendo spesso la periferia del globulo. Nelle forme di sviluppo più avanzate il parassita mantiene la sua mobilità, ma gli pseudopodi sono emessi e retratti con maggior lentezza, per cui nei nostri preparati il parassita è spesso fissato dall'essiccamento prima di assumere la forma circolare di riposo, e può quindi assumere nei preparati colorati le forme più bizzarre.

Anche nel parassita della terzana benigna la mobilità diminuisce man mano che il parassita si avvicina alla segmentazione.

Se esaminiamo invece i *piccoli parassiti quartanari,* troviamo che sono rappresentati da piccoli corpi ameboidi, perfettamente simili a quelli terzanari, eccettuato che si presentano dotati di minore mobilità.

Durante tutto il periodo di apiressia i parassiti quartanari vanno notevolmente aumentando di volume ed i movimenti si fanno sempre più torpidi, ragione per cui i parassiti non tendono a prendere forme irregolari e bizzarre come fanno i parassiti terzanari.

Se in questo stadio di sviluppo dei parassiti malarigeni, corrispondente ai piccoli e medi anelli, si fissa il preparato durante la vivace attività ameboide del parassita, prima cioè che raggiunga la forma anulare di riposo, si possono osservare nei preparati colorati di terzana maligna e di terzana benigna e, più di rado nella quartana, le forme più svariate.

Si possono trovare in questi casi, tanto nei preparati di terzana benigna che nei preparati di estivo-autunnale, parassiti che si presentano costituiti da un filamento di citoplasma diritto o ripiegato in varie guise, con un nucleo ben sviluppato, situato all'estremità, o nel mezzo del filamento in cui la cromatina è variamente disposta (Tav. I, fig. 5; Tav. II, fig. 3; Tav. III, fig. 7).

In questo stadio di sviluppo il pigmento non è ancora comparso o si presenta in fini granuli mascherati dalle sostanze coloranti, le modificazioni dei globuli rossi invasi sono ancora molto tenui, e rilevabili solo con prolungate colorazioni.

Se un globulo rosso è invaso in questo stadio da più parassiti dell'estivo-autunnale, si può vedere a fresco che durante l'attività ameboide i pseudopodi dei vari parassiti si intrecciano *pur conservando ogni parassita la propria individualità,* che appare chiara nei successivi movimenti ameboidi, per cui i prolungamenti, che prima si intrecciano, si retraggono mentre altre propaggini emergono da altri punti del corpo citoplasmatico.

Fissando questi parassiti in tale stadio di attività ameboide, risulta un intreccio di filamenti citoplasmatici che fecero erroneamente pensare ad alcuni che potesse verificarsi in circolo la coniugazione di due forme anulari. (Tav. III, fig. 13).

Piccole forme compatte rotondeggianti.

Misurano un diametro di μ 2-μ 2,5, si riscontrano nella terzana benigna e nella quartana, ed eccezionalmente nell'estivo-autunnale, nel sangue periferico.

Il parassita presenta fini granuli di pigmento ed è costituito da una massa citoplasmatica compatta, senza vacuolo, di forma rotondeggiante, più o meno irregolare; il nucleo è rappresentato da un grosso granulo di cromatina circondato da un alone chiaro che rappresenta la zona del succo nucleare, situato per lo più un po' eccentricamente.

Tali forme, che probabilmente rappresentano un primo stadio dello sviluppo dei gametociti, non presentano alcun carattere differenziale che permetta di diagnosticare la specie parassitaria che rappresentano, ove non si possano dimostrare le alterazioni specifiche dei globuli rossi.

Forme ameboidi compatte medie e grandi.

Proseguendo nel loro sviluppo i parassiti della terzana benigna nel giorno che s'interpone fra due accessi, si presentano sotto forma di corpi ameboidi notevolmente ingranditi e sono dotati di movimenti molto meno vivaci. In questa fase il vacuolo tende a ridursi finchè, nella fase che precede la segmentazione, il parassita assume una forma compatta, che potremo facilmente distinguere da forme consimili della terzana maligna e della quartana, per le maggiori dimensioni del parassita terzanario, pel colore del pigmento e per le alterazioni del globulo rosso (ingrandimento, scoloramento, granuli di Schüffner). (Tav. I, figg. 13-14-15).

In questo stadio la diagnosi di terzana benigna s'impone e non è possibile confondere questo parassita con le fasi di sviluppo delle altre specie parassitarie.

Sono state descritte forme compatte ameboidi senza alterazioni del globulo rosso (ingrandimento, granuli di Schüffner), ciò che non ci fu mai possibile osservare.

Si trovano nella terzana benigna delle forme compatte, rotondeggianti od ovali, che misurano un diametro da 2 a 4 μ, con nucleo ben sviluppato, circondato da un alone chiaro, situato ora alla periferia, ora

al centro del parassita; queste forme compatte, ricche di pigmento, non possono confondersi con le forme compatte della terzana maligna e della quartana, per la costante presenza di granuli di Schüffner e per la finezza ed il colore dei granuli di pigmento.

In questo stadio di sviluppo può invece apparire la difficoltà di differenziare i parassiti dell'*estivo-autunnale* da quelli della *quartana*.

Come è noto, nelle forme più avanzate dei parassiti dell'estivo-autunnale, prossimi alla schizogonia, il vacuolo scompare ed il parassita risulta costituito da un nucleo piuttosto grande, circondato da una zona chiara, probabilmente costituita dal succo nucleare e di uno strato di citoplasma pigmentato, specialmente alla periferia.

Da questo momento il parassita tende ad accumularsi negli organi interni, ove continua ad aumentare di volume, ed il pigmento, che dapprima si presentava in granuli fini, tende a raccogliersi in granuli più grandi e finalmente in un accumulo di granuli o in un blocchetto, situato al centro del corpo parassitario, od in un punto della periferia del corpo stesso. (Tav. III, figg. 14-15).

Il volume dei parassiti in questo stadio di sviluppo varia tra la metà ed un quarto del globulo rosso, non di rado è anche più grande: il volume medio è di circa un terzo del globulo rosso, ma se ne trovano anche di notevolmente più piccoli, come si vede in alcune perniciose, tanto che se ne possono trovare anche due o tre nello stesso globulo rosso (Marchiafava e Bignami).

Tali forme, come si è detto, si riscontrano di rado nel sangue periferico, ove appaiono di regola nei casi perniciosi e più di rado in casi senza caratteri di perniciosità quando si ha un'intensa moltiplicazione dei parassiti.

Si riscontrano invece abbastanza frequentemente nelle infezioni prodotte dalle varietà tropicali di *P. immaculatum* in casi che decorrono senza alcun carattere di perniciosità.

Quando nella febbre estivo-autunnale si riscontrano in circolo numerosi parassiti compatti, alcuni dei quali ricchi di pigmento disposto alla periferia, altri con pigmento reccolto in due o tre grossi granuli, può riuscire difficile la diagnosi differenziale coi *parassiti quartanari*.

È noto difatti che durante il periodo di apiressia i *parassiti quartanari* diventano sempre meno mobili, per cui nei preparati mostrano una

forma più o meno rotondeggiante; di mano in mano che il parassita cresce, il pigmento si fa sempre più abbondante e si presenta in granuli neri piuttosto grossi, mentre il globulo rosso ospite conserva il suo volume normale o tende a rimpiccolirsi. (Tav. I, figg. 6-7).

In questo stadio di sviluppo, se non si trovano nei preparati altre forme che possano chiarire la diagnosi differenziale, noi non abbiamo altro sussidio, in un preparato colorato, che di mettere in evidenza le macchie di Maurer od i granuli di Ziemann.

Difatti la forma e la grandezza del parassita, il colore dei granuli di pigmento e la loro grandezza, i caratteri del nucleo, il volume del globulo rosso invaso, non presentano in questo stadio netti caratteri differenziali che permettano di fare la diagnosi precisa dall'esame di un preparato colorato.

Se si riscontrano dei parassiti che presentino il pigmento in un solo blocchetto, sono parassiti dell'estivo-autunnale, perchè nella quartana ciò si osserva soltanto nell'ultimo stadio della fase di moltiplicazione. Così se si ritrovano parassiti ricchi di pigmento sotto forma di grossi bastoncelli raccolti alla periferia del corpo parassitario, si potrà arguire che trattasi di parassiti quartanari, ma in certi casi sarà necessario, come ho già detto, mettere in evidenza, con colorazioni prolungate, le macchie di Maurer od i granuli di Ziemann, a seconda che si tratterà di forme appartenenti ai parassiti della terzana maligna od a quelli della quartana.

Studiando il parassita della *terzana benigna* in successivi passaggi interumani per la cura della paralisi progressiva, ho osservato che il parassita perde alcuni dei suoi caratteri peculiari, e cioè diminuisce la tendenza a far ingrandire il globulo rosso, e la scissione della cromatina negli schizonti avviene precocemente, dando luogo a 8-12 merozoiti.

Caratteri differenziali fra schizonti e gametociti.

Nella febbre estivo-autunnale la caratteristica forma semilunare dei gametociti non ammette confusioni con gli schizonti in qualsiasi stadio del loro sviluppo.

I caratteri differenziali fra i macrogametociti dell' estivo-autunnale saranno messi bene in evidenza usando la colorazione di Romanowsky,

ottenuta mescolando nel rapporto di 1:10 le due soluzioni inizialmente raccomandate da Giemsa: l'una di Azur II al 0,8 °/₀₀ e l'altra di eosina B extra al 0,05 °/₀₀.

Colorando per 30 minuti con tale metodo si vedrà come nei *macrogametociti* la cromatina nucleare si presenti in una piccola massa compatta, circondata in tutto od in parte dal pigmento raccolto nella zona centrale della semiluna.

Usando le soluzioni di Giemsa, di Leishman, di Wright, succede spesso di colorare in rosso-violetto anche parte del citoplasma dei macrogametociti per cui riesce difficile differenziarli dai microgametociti, nei quali la cromatina nucleare si presenta in fini granuli sparsi sopra una vasta zona che appare colorata in rosso.

Si possono trovare, per quanto raramente, forme semilunari in circolo, non ancora mature, caratterizzate nei *gametociti femminili* dal pigmento sparso nel protoplasma e dalla cromatina nucleare che si presenta meno compatta, situata spesso verso un'estremità; riesce invece più difficile distinguere i microgametociti non maturi, pel fatto che, anche nel loro ultimo stadio di sviluppo, la cromatina ed il pigmento si presentano diffusi in un'ampia zona del citoplasma.

Studiando qualche striscio di midollo osseo — di cui trovate un disegno fedele nelle nostre tavole — appare la difficoltà di distinguere le forme giovanili, che diverranno schizonti, da quelle che diverranno gametociti.

Nel midollo osseo si trovano semilune in tutti gli stadi di sviluppo con forte prevalenza delle forme giovani; nella milza si rinvengono anche semilune giovani, ma le forme più piccole non sono presenti in gran numero che nel midollo delle ossa.

Questa osservazione di Bignami e Bastianelli è stata riconfermata da noi nelle molte autopsie che abbiamo potuto seguire. È giusto dunque ritenere che le semilune si formino nel midollo delle ossa.

Sullo sviluppo delle semilune le ricerche moderne non hanno aggiunto nulla a quanto si sapeva dagli studi di Bignami e Bastianelli.

Secondo questi autori le forme più piccole, che possiamo dire con certezza che appartengono alla fase semilunare, contengono già molto pigmento quando il loro volume è poco maggiore di quello dei piccoli anelli. (Tav. III, figg. 20, 21, 22, 23).

In queste forme giovani il pigmento è disseminato in forma di aghi dal tipico aspetto di quelli che si vedono nelle semilune adulte, ed in quantità assai superiore a quella contenuta negli schizonti di ugual volume, senza la tendenza a riunirsi a blocchetto.

Le giovani semilune presentano una forma rotondeggiante, allungata, triangolare e possiedono un piccolo nucleo situato all'una od all'altra estremità. Spesso in questo stadio la sostanza cromatica si dispone in forma di sottili bandellette, intensamente colorate, lungo la periferia del citoplasma da uno o da tutti e due i lati.

La cromatina delle giovani semilune si distingue per essere meno compatta e costituita da fini bastoncelli più o meno lontani l' uno dall'altro.

Evidentemente alla fase pigmentata delle giovani semilune deve precedere una fase senza pigmento, ma non sappiamo se questa fase sia identica a quella non pigmentata dei piccoli anelli.

Come ho detto, le forme semilunari giovani appaiono raramente in circolo ed ho visto che la loro interpretazione presenta difficoltà anche per chi ha una certa pratica nella ricerca di parassiti malarici nel sangue. Sarà bene quindi studiare a lungo qualche striscio di midollo osseo per rendersi conto di tutte le forme che possono presentare le semilune nel loro sviluppo.

Le semilune che si sviluppano nel midollo osseo continuano un certo grado di sviluppo nel sangue periferico. Già Golgi (1885), studiando il ciclo di sviluppo del *P. immaculatum*, ammise che nelle semilune si distinguevano successivi stadi di sviluppo.

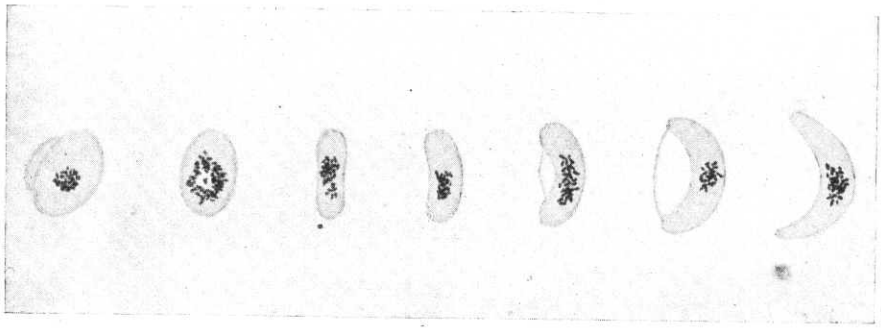
« ..... io ammetto che le fasi di successivo sviluppo siano rappresentate dalle forme globose, ovali, allungate, più o meno semilunari ecc. (tutte pigmentate) che in ordine successivo si vedono riprodotte nelle figure... ».

Thomson e Robertson (1935), hanno avuto occasione di osservare nel sangue periferico di un indigeno dell' Africa Occidentale tutti gli stadi delle semilune che si osservano comunemente nel midollo osseo ed hanno potuto descrivere il completo sviluppo dei gametociti di *P. immaculatum* nel sangue periferico.

Numerose osservazioni compiute nel nostro laboratorio studiando paralitici infettati con ceppi tropicali di *P. immaculatum* hanno messo in

evidenza che nel sangue periferico si possono trovare tutte le forme di sviluppo delle semilune, da quella globosa a quella allungata semilunare. Non sorprenderà quindi se, esaminando preparati provenienti da regioni tropicali, osserverete simili reperti.

Tenendo presente la descrizione dei caratteri differenziali dei macrogametociti e microgametociti della terzana benigna, non troverete notevole difficoltà nel differenziali; può viceversa riuscire difficile distinguere lo *schizonte adulto*, in cui non è ancora iniziata la divisione nucleare, dal *macrogametocito* non ancora maturo, poichè nei due casi la cromatina è lassa, si presenta cioè suddivisa in granuli e filamenti non compatti.



Sviluppo delle semilune nel sangue periferico secondo Golgi (1885).

In questo caso i caratteri del pigmento più abbondante e più grossolano nei gametociti, può orizzontare verso la diagnosi.

La stessa difficoltà può apparire nella quartana nel differenziare i macrogametociti in via di sviluppo da uno schizonte adulto; anche qui potrà essere di aiuto nella diagnosi conoscere che i gametociti non si presentano mai sotto forma di nastro, come si osserva spesso negli schizonti, e che di regola la cromatina negli schizonti inizia la sua segmentazione prima che il parassita occupi interamente il globulo rosso.

Parassiti del ciclo sessuato.

J. D. Thomson, studiando la formazione dei gameti dell'estivo-autunnale, mise in evidenza una membrana che circonda i gametociti. Nei gametociti femminili dell'estivo-autunnale questa membrana sembra molto resistente, come una membrana cistica, ed il gametocito ne uscirebbe, al momento della maturazione, da un'apertura di questa membrana.

La membrana cistica descritta da J. D. Thomson, non è una membrana propria, ma una avventizia fornita dal globulo rosso (Wenyon).

Nella Tav. IV, fig. 1, si osserva un gametocito dell'estivo-autunnale che flagella. Lateralmente si vedono due piccole masse più chiare, che rappresentano i residui del globulo rosso da cui è fuoriescito il gametocito.

Questa osservazione risulta meglio dimostrata dalla fig. 8 della medesima Tav. IV, che rappresenta il microgametocito della terzana benigna ancora avvolto dal residuo del globulo rosso. Confrontando il microgametocito maturo dell'estivo-autunnale e quello della terzana benigna (Tavola IV, figg. 1-8) si vedrà come il microgametocito maturo dell'estivo-autunnale sia più piccolo di quello della terzana benigna e come a loro volta i microgameti dell' estivo-autunnale siano più esili di quelli della terzana benigna.

Il vermicolo della terzana benigna è notevolmente più grande di quello dell'estivo-autunnale, come si può osservare dalla Tav. IV, figg. 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 10.

Conseguentemente anche lo stadio iniziale di sviluppo nello spessore della parete intestinale, appare più grande. (Tav. IV, figg. 12, 12, 13 e 14).

Come aveva già descritto Grassi i vermicoli trasformati di recente, o in via di trasformarsi in oocisti, possono presentare due nuclei che si colorano differentemente.

La fig. 10 della Tav. IV presenta un vermicolo con tre masse nucleari distinte.

Nei vermicoli per solito il pigmento si raccoglie nella parte posteriore e raramente si presenta scarso e diffuso nel citoplasma come nella fig. 9.

Abbiamo già parlato dei caratteri differenziali delle oocisti delle varie specie parassitarie, ma dobbiamo avvertire che praticamente non sempre appaiono così marcati da poter costituire un sicuro criterio di diagnosi.

Parassiti negli organi interni.

Nella tavola VI abbiamo riprodotto alcuni preparati prelevati da casi di febbri perniciose. Seguendo il consiglio di Marchiafava e Bignami farete l' esame a fresco comprimendo una piccolissima parte di corteccia

cerebrale fra il portaoggetti ed il coprioggetti e successivamente farete l'esame nei preparati colorati ottenuti strisciando una particella di corteccia cerebrale. Si potranno così osservare nei capillari del cervello numerosi parassiti generalmente contro i globuli rossi che stipano il lume dei piccoli vasi. I parassiti si possono trovare nelle varie fasi del loro sviluppo, oppure si osserva il predominio di una di queste fasi o anche l'esistenza di una sola. Nel preparato disegnato nella fig. 1 troviamo parassiti con blocchetto di pigmento o senza, nella fig. 2 prevalgono i parassiti con blocchetti di pigmento e nella fig. 4 troviamo soltanto rosette.

Come si è detto, molto frequentemente si trovano parassiti in tutti gli stadi della loro vita: così che è dato di potere in un solo capillare dimostrare tutto il ciclo di vita del parassita. Il numero dei parassiti talora è così grande che riesce difficile di trovare un solo globulo rosso normale. Salvo casi gravissimi in cui quasi tutti i globuli rossi sono infetti, generalmente le arteriole e venuzze sono meno ricche di parassiti che i capillari. In casi *veramente eccezionali* si può seguire tutta l'evoluzione del parassita dal parassita endoglobulare alla scissione senza che abbia avuto luogo la formazione del pigmento. Ma questi casi, come dicevamo, sono veramente eccezionali e molti, che si sono occupati di malaria, non li hanno mai veduti. Il reperto più frequente è quello di trovare insieme i parassiti pigmentati e non pigmentati nelle varie fasi di vita mentre una di queste prevale. Allora *le forme adulte pigmentate e le sporulazioni occupano di preferenza i capillari mentre nelle venuzze e nelle arteriole si vedono per lo più prevalere le forme giovani*: è degno di nota il fatto che le forme parassitarie si trovano *specialmente addossate alla parete vasale*. In alcuni casi non occorre di vedere grande quantità di parassiti: ma si vedono però le tracce di una pregressa invasione parassitaria nei blocchetti di pigmento degli endoteli rigonfi o pigmentiferi, e dei leucociti pigmentati.

La descrizione ora fatta corrisponde ai casi di perniciosa cerebrale specialmente comatosa. Nelle altre perniciose, come la colerica, l'algida ecc. nel cervello, sogliono in genere, trovarsi pochi globuli rossi parassitiferi e mancare le alterazioni degli endoteli (Marchiafava e Bignami).

L'esame microscopico della milza presenta i parassiti in vari stadi di sviluppo. Se l'infezione dura da qualche giorno si rilevano le forme semilunari anche quando non si trovano nel sangue circolante.

Per l'esame del midollo osseo si preleva il materiale per lo striscio dalle ossa corte e piatte, per esempio dalle costole, in cui il midollo presenta un colore rosso-bruno come quello della milza.

Nei preparati colorati si osservano fagociti ricchi di pigmento e globuli rossi contenenti parassiti. Si possono riscontrare negli strisci di midollo osseo le fasi successive di sviluppo delle semilune, ciò che non si osserva in generale negli altri organi, per cui si ritiene che lo sviluppo delle semilune avvenga esclusivamente o in gran prevalenza nel midollo osseo, come l'organo che a questo sviluppo meglio si conviene.

Plasmodium ovale.

Agli agenti etiologici conosciuti della malaria umana è stato aggiunto un nuovo parassita, il *Plasmodium ovale* Stephens (1922) che James studiò accuratamente in successivi passaggi dall'uomo agli anofeli e viceversa.

Nei preparati colorati questo parassita si presenta generalmente con forme compatte, rotonde od ovali, le rosette presentano 8-12 merozoiti, i gametociti sono scarsi, i corpuscoli rossi invasi assumono di regola la forma ovale, raggiungono spesso una grandezza che di poco sorpassa quella normale e presentano le granulazioni di Schüffner.

Considerando la morfologia dei vari ceppi di *Plasmodium vivax* provenienti da regioni diverse, noi trovammo che variavano per grandezza, per numero dei merozoiti, per la proprietà di produrre una differente quantità di gametociti, per la resistenza al trattamento curativo, e che tali caratteri permanevano passando il parassita dall'uomo all'anofele e viceversa. Così il ceppo di *Plasmodium vivax* Madagascar, usato per la malaria indotta, si presentava in ogni stadio di sviluppo più piccolo di un ceppo di *Plasmodium vivax* dell'Italia del Sud. A sua volta il ceppo italiano produceva di regola minor numero di gametociti del ceppo del Madagascar.

Si può pertanto dedurre che esistono numerose varietà di *Plasmodium vivax* e che si passa per una serie di forme intermedie dal ceppo italiano al *Plasmodium ovale*. La natura ha gli stessi nostri difetti ed erra come noi seguendo le stesse leggi: i grandi errori sono molto meno

frequenti degli errori medi, per cui le mutazioni ereditarie estreme del tipo specifico normale sono sempre meno numerose dei gradi intermedi.

Siccome l'evoluzione di ogni specie procede per tentativi, così assistiamo ad un continuo fare e disfare: le mutazioni ereditarie avvengono senza direzione e possono risultare utili o dannose alla specie; se sono dannose la selezione le sopprime, se sono utili le estende. Da ciò si deduce il fatto fondamentale che la stabilità delle specie viventi è soltanto relativa.

Nel caso nostro le varietà che hanno maggiore probabilità di sopravvivere saranno quelle dotate delle proprietà di produrre un maggior numero di gametociti, per cui non è verosimile che possa a lungo persistere in natura una varietà, come il *Plasmodium ovale,* caratterizzato dalla scarsa capacità di produrre elementi sessuati.

Concordi osservazioni dimostrano poi che il *Plasmodium vivax,* passato da uomo ad uomo senza alternati passaggi negli anofeli, va incontro a modificazioni morfologiche e biologiche a carattere ereditario; sopra tutto diminuisce la grandezza del parassita, il numero dei merozoiti e quello dei gametociti. Così il *Plasmodium vivax* usato da Wagner-Jauregg nella malaria indotta, ha perduto la proprietà di produrre gametociti e presenta caratteri morfologici che lo avvicinano al *Plasmodium ovale.* Un altro ceppo di *Plasmodium vivax* che io passai ripetutamente nei paralitici senza il tramite delle zanzare, aveva assunto il carattere del *Plasmodium ovale.*

Anche i parassiti vanno dunque incontro alla vecchiaia ed alla morte, ed il prolungato ripetersi di generazioni asessuate induce nei parassiti malarici la comparsa di caratteri ereditari che preludono la loro fine.

È presumibile che il lungo succedersi di generazioni asessuate nello stesso organismo e le reciproche reazioni immunitarie determinino mutazioni ereditarie, sopra tutto nelle varietà tropicali di *Plasmodium vivax* caratterizzato per la cronicità delle infezioni cui dànno luogo.

Praticamente noi consideriamo ancora tre sole specie di parassiti: *Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium immaculatum* ed estendiamo le ricerche sopra tutto nelle regioni etiopiche alle varietà morfologiche derivanti da ciascuna specie.

RIASSUNTO

L'A. descrive i caratteri morfologici dei parassiti malarici nei preparati colorati e rileva le caratteristiche che possono servire per distinguere i diversi parassiti. Raccomanda di considerare per ogni preparato la forma e la grandezza del parassita, i caratteri del citoplasma e del nucleo, l'aspetto del pigmento e le alterazioni prodotte nei globuli rossi. Spesso è facile identificare certi stadi di sviluppo dei parassiti malarici, ma qualche volta si può incorrere in gravi errori ove il ricercatore non si circondi di tutte le cautele che l'A. raccomanda.

SUMMARIUM

Parasitorum malariae Auctor describit characteres morphologicos, qui apparent in praeparatis colore infectis; notasque exponit per quas unusquisque parasitorum a ceteris distingui potest. Idem monet ut in singulis praeparatis parasiti forma et amplitudo, cytoplasmatis et nuclei caracteres, pigmenti adspectum, globulorum rubrorum inmutationes attente intueamur. Namque ut saepe stadia quaedam evolutionis parasitorum malariae facile possunt agnosci, ita nonnunquam fit ut graves in errores investigator incidat nisi omnibus se cautionibus accinxerit, quas Auctor commendat.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Malariologia.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

TAVOLA PRIMA.

P. vivax — DA PREPARATI COLORATI COL METODO DI GIEMSA.

(Originali × 1620).

FIG. 1 - Globulo rosso normale.

» 2-3 - « Forme accollate »: il globulo rosso non è ingrandito.

» 4 - Medio anello di *P. vivax*: il globulo rosso ingrandito.

FIG. 5-6 - Forme ameboidi.
» 7-8 - Forma ameboide che ricorda le « forme tenui » di Stephens.
» 9-10-11 } Presenza dei granuli di Schüffner.
» 12-13-14-15 } Schizonti in via di sviluppo.
» 16-17-18-19 - Varie fasi della schizogonia.
» 20-21-22 - Varie fasi dello sviluppo del microgametocito.
» 23 - Microgametocito maturo.
» 24 - Macrogametocito maturo.

TAVOLA SECONDA.

P. malariae — DA PREPARATI COLORATI COL METODO DI GIEMSA.

(Originali × 1620).

FIG. 1 - « Forme accollate ».
» 2 - Medio anello di *P. malariae*.
» 3-4 - Forme ameboidi.
» 5-6-7-8 } Schizonti in via di sviluppo con tipiche forme a nastro.
» 9-10-11-12 }
» 13 - Granuli di Ziemann.
» 14 - Schizonte maturo.
» 15-16-17 } Varie fasi della schizogonia.
» 18-19-20 }
» 21 - Macrogametocito non ancora maturo.
» 22 - Macrogametocito maturo.
» 23 - Microgameto in via di sviluppo.
» 24 - Microgametocito maturo.

TAVOLA TERZA.

P. immaculatum — DA PREPARATI COLORATI COL METODO DI GIEMSA.

(Originali × 1620).

FIG. 1 - Piccoli anelli di *P. immaculatum*.
» 2-3 - « Forme accollate ».
» 4 - Anello a falce con due granuli di cromatina agli estremi.
» 5-6 - Medi anelli di *P. immaculatum*.
» 7 - Piccola forma ameboide.
» 8 - Anello medio con due granuli di cromatina ai poli opposti all'anello.
» 9-10 - Grandi anelli di *P. immaculatum*.
» 11 - Globulo rosso occupato da tre parassiti.
» 12-13 - « Forme tenui » di *P. immaculatum*.

Fig. 14-15 - Forme adulte con blocchetto di pigmento.
» 16-17-18-19 - Varie fasi della schizogonia.
» 20-21-22-23 - Le prime fasi di sviluppo delle semilune nel midollo osseo.
» 24, 26 - Forme successive di sviluppo del macrogametocito.
» 25 - Macrogametocito adulto.
» 27 - Microgametocito non ancora maturo.
» 28 - Microgametocito maturo.

TAVOLA QUARTA.

P. immaculatum — da preparati colorati col metodo di Giemsa.

Sviluppo esogeno del parassita malarigeno.

(Originali × 1620).

Fig. 1 - Microgametocito del *P. immaculatum* che flagella.
» 2-3-4-5-6-7 - Amfionte del *P. immaculatum*: diverse fasi di sviluppo dell'ookinete (vermicolo).
» 8 - Microgametocito del *P. vivax* che flagella.
» 9-10 - Amfionte del *P. vivax*: ookinete (vermicolo).
» 11 - Amfionte del *P. vivax*. Primo stadio dello sviluppo delle oocisti (72 ore).
» 12 - Amfionte del *P. vivax*. Primo stadio dello sviluppo delle oocisti (96 ore).
» 13 - Amfionte del *P. immaculatum*. Primo stadio dello sviluppo delle oocisti (96 ore).
» 14 - Amfionte della estivo-autunnale. Primo stadio dello sviluppo delle oocisti (72 ore).

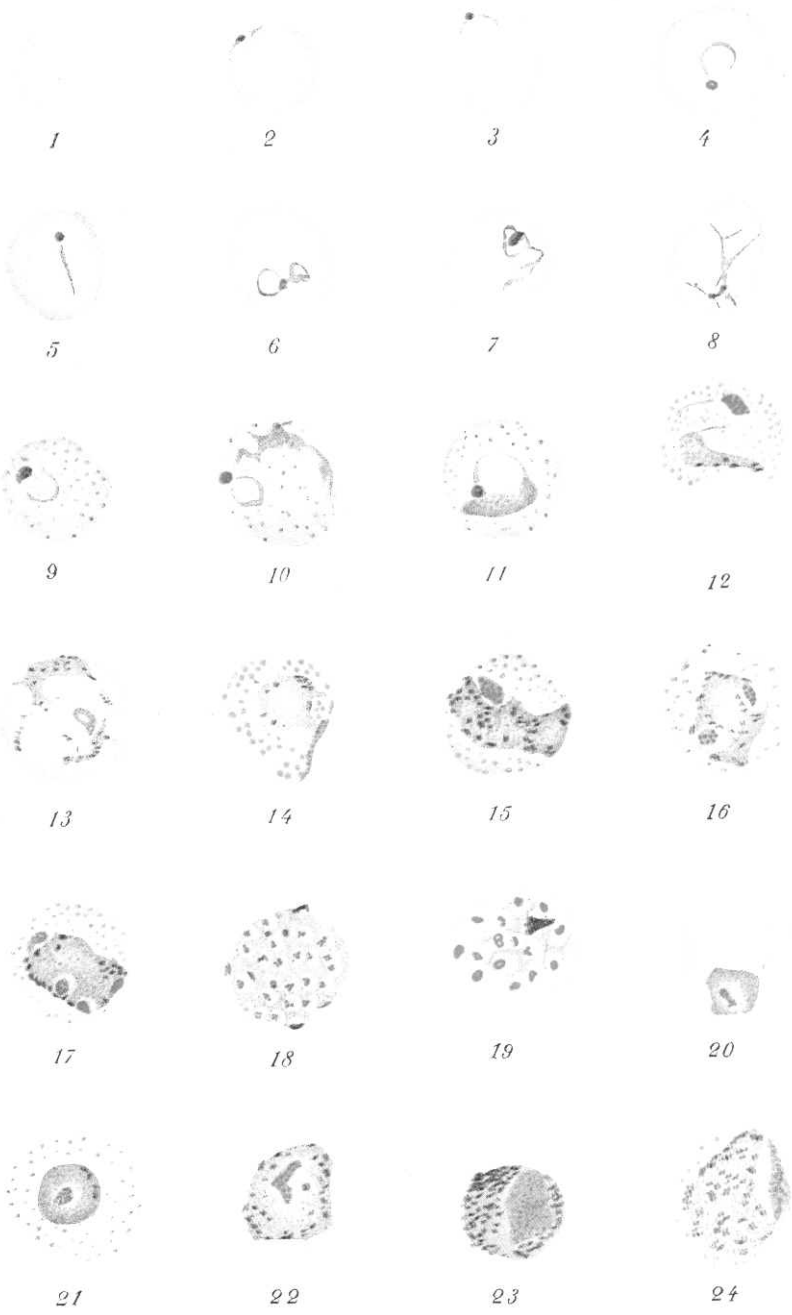
TAVOLA QUINTA.

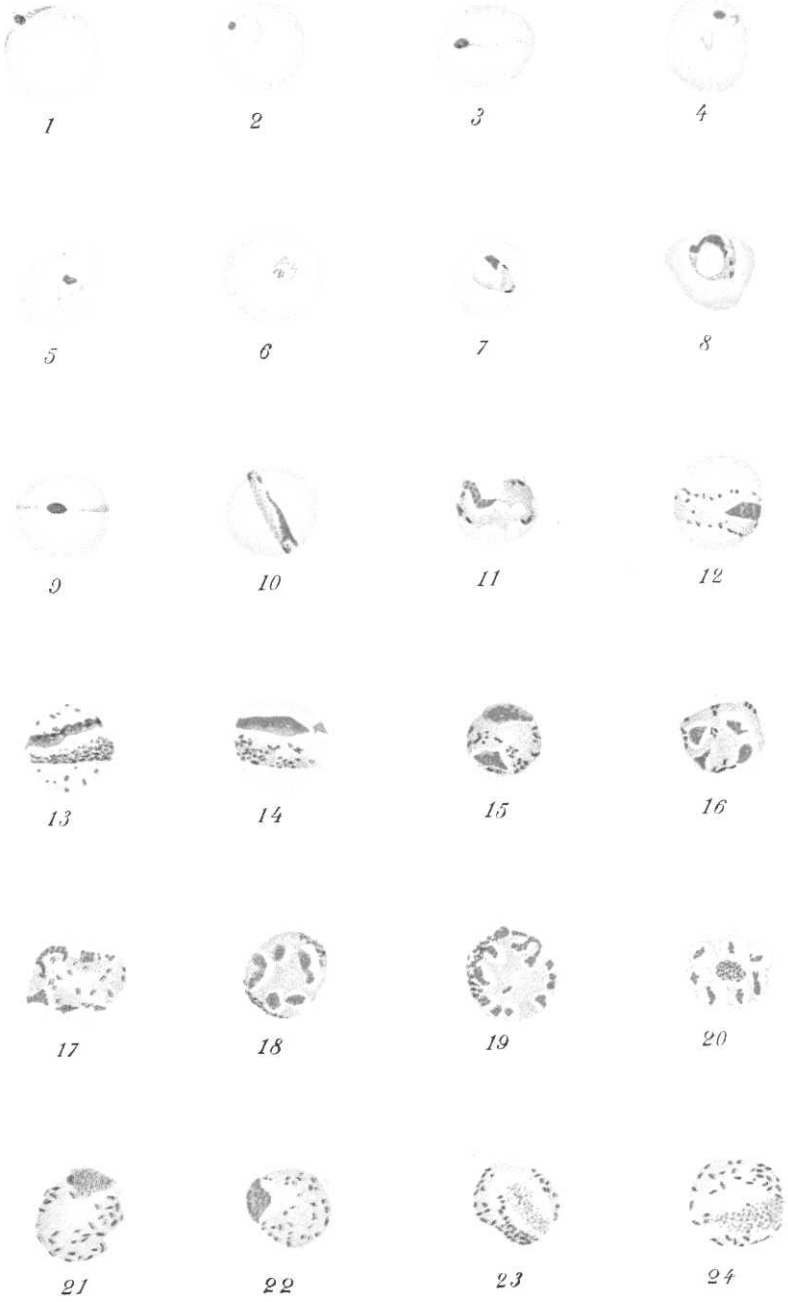
Lo sviluppo esogeno del parassita malarigeno.

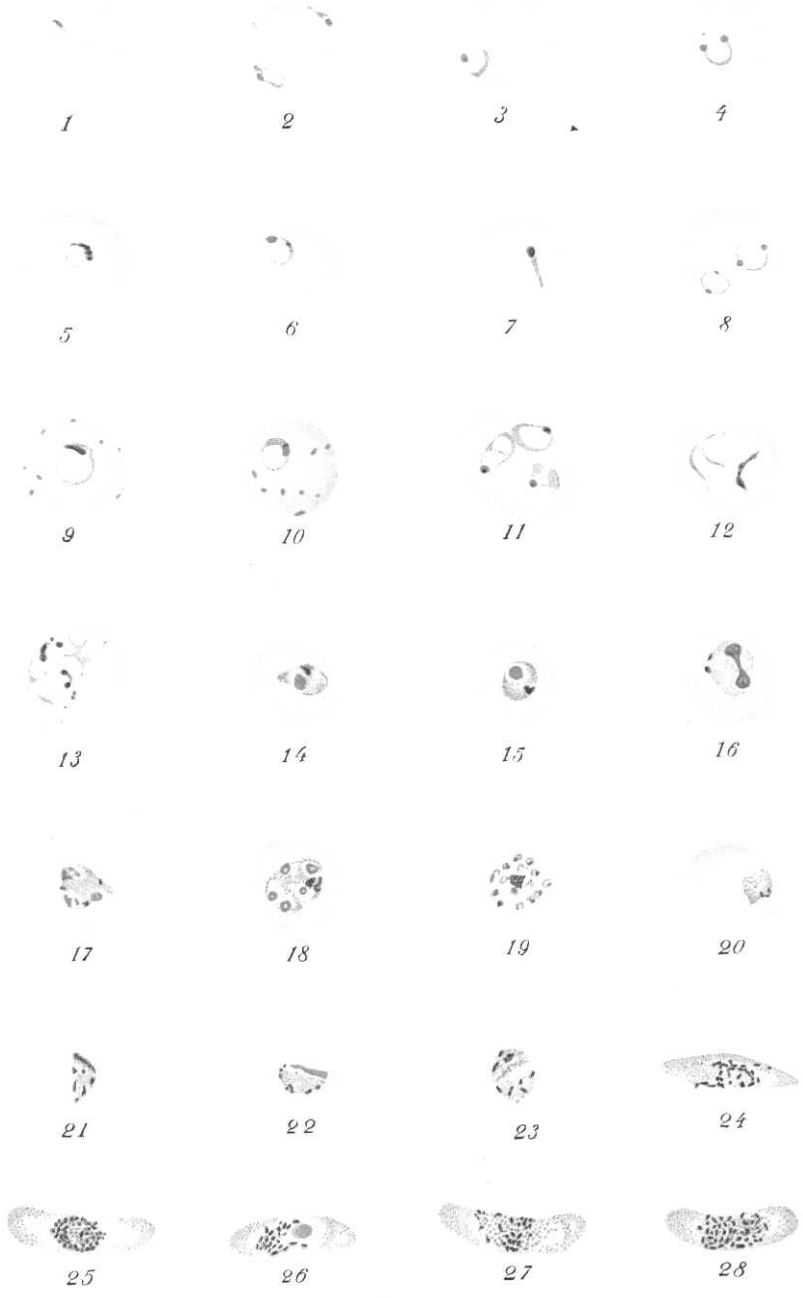
Oocisti.

(Originali × 560).

Fig. 1 - Prima fase della moltiplicazione nucleare.
» 2 - Inizio della divisione del citoplasma.
» 3 - Moltiplicazione del nucleo. I nuclei si portano alla superficie di ciascuna massa citoplasmatica.
» 4 - Continua la divisione nucleare.
» 5-6 - Sviluppo degli sporozoiti.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

1

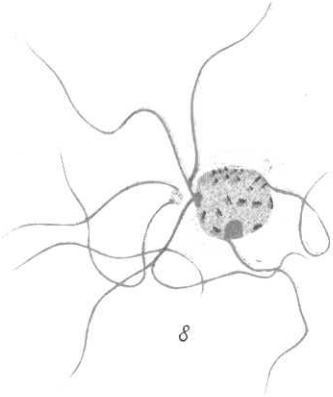
2

3

4

5

6


8

7

10

9

11

12

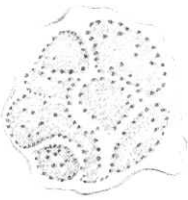
13

14

1

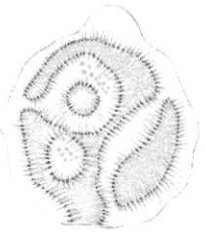
2

3



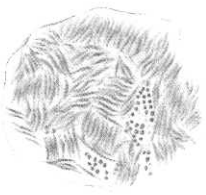
4

5



6

7



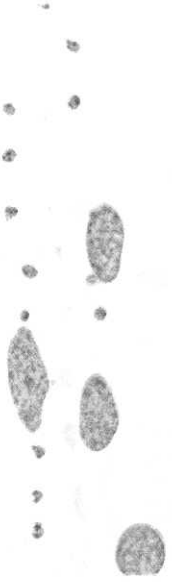
8

9

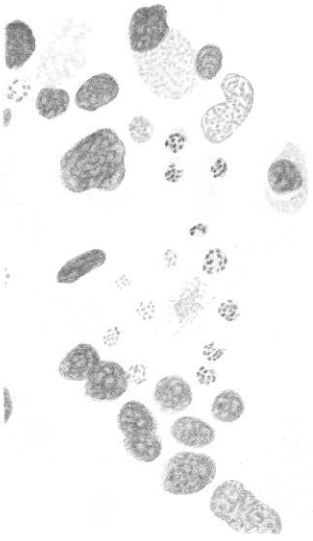
10

11

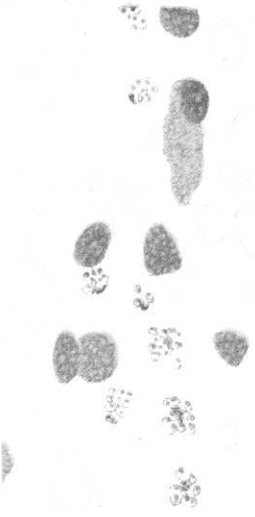
1



2



3



4

Fig. 7 - Oocisti ormai mature. Sporozoiti e corpi residuali.
» 8 - Oocisti mature.
» 9-10 - Sporozoiti nelle ghiandole salivari.
» 11 - Sporozoiti liberi (× 1620).

TAVOLA SESTA.

P. immaculatum NEGLI ORGANI INTERNI, DA PREPARATI COLORATI COL METODO DI GIEMSA.
(Originali × 1650).

Fig. 1-2 - Capillari del cervello pieni di parassiti con blocchetto di pigmento.
» 3 - Striscio di midollo osseo. Forme iniziali di sviluppo delle semilune.
» 4 - Capillare del cervello con numerose rosette.