

18. RICERCHE DI MICROSCOPIA ELETTRONICA. - I. STUDIO MORFOLOGICO DI RICKETTSIA PROWAZEKI.

La prima descrizione dell'agente del dermatifo risale al 1916 ed è dovuta a Rocha-Lima (¹) il quale trovò il parassita nel tubo digerente di pidocchi alimentatisi su individui infetti di tifo petecchiale e lo denominò *Rickettsia prowazeki* in onore di due ricercatori morti per infezione di laboratorio.

Numerosi studiosi confermarono in seguito il reperto di Rocha-Lima e la descrizione del parassita da lui data, poco o nulla modificata, viene riportata ancor ora dai più recenti trattati, come da quello di Gildemeister e Haagen (²).

Secondo Rocha-Lima la tipica forma della *Rickettsia* è quella ellittica. Al momento della suddivisione essa si allunga e quindi si scinde in due nuovi brevi elementi. Durante la suddivisione è particolarmente ben visibile una sottile membrana che avvolge il micro-organismo e che si strozza per ultima, dando così alla *Rickettsia* per qualche tempo il suo caratteristico aspetto a manubrio. Questa forma, che in realtà costituisce soltanto uno stadio transitorio del ciclo vitale della *Rickettsia*, si ritrova però con discreta frequenza nell'intestino del pidocchio, tanto che molti descrivono la *Rickettsia* come un micro-organismo a manubrio, considerando questa come la forma tipica del germe.

Dopo Rocha-Lima molti studiosi si sono occupati dell'interessante capitolo delle *Rickettsiosi*, ma in complesso nessuno ha portato nel campo della morfologia, contributi degni di nota.

In un recente lavoro, però, Sikora (³) ha ripreso l'argomento e dopo aver disegnato alla camera lucida un considerevole numero di *Rickettsie* appartenenti a parecchie specie, ha creduto di poterle allineare secondo un determinato schema in modo da raffigurare tutto il ciclo vitale del parassita.

La forma tipica della *Rickettsia* sarebbe, secondo Sikora, quella di un semplice granulo nudo, sprovvisto di un vero succo protoplasmatico e corrispondente in ciò ad un corpuscolo elementare di virus. Ad un certo

momento questo granulo si circonderebbe di protoplasma, s'allungherebbe e si scinderebbe in due, così da dare una forma bipolare, simile a quella delle pasteurelle. Al centro del germe si differenzerebbe a questo punto un terzo granulo che si suddividerebbe in due, e a questa scissione farebbe seguito quella di tutto il micro-organismo, sì che da esso deriverebbero due nuovi germi bipolari.

Questa sarebbe la modalità normale di suddivisione della Rickettsia; eccezionalmente la suddivisione potrebbe avvenire anche senza la formazione del granulo intermedio.

Da alterazioni nel processo riproduttivo (rapida suddivisione dei granuli senza conseguente scissione del protoplasma) possono, particolarmente in alcune specie di Rickettsie, originarsi catenelle più o meno lunghe di micro-organismi.

Le ricerche di Sikora presenterebbero, se confermate, un notevole interesse. Non si può negare che le forme da lei descritte non si vedano nei preparati di Rickettsie, però il voler ordinare tali forme in una determinata serie evolutiva può naturalmente prestarsi a critiche tanto più che, date le dimensioni molto piccole di tali micro-organismi è estremamente difficile riconoscere ed interpretare esattamente minute particolarità di struttura.

Abbiamo voluto riprendere in considerazione il problema morfologico delle Rickettsie, studiandole oltre che col comune microscopio ottico, anche con quello elettronico.

All'esposizione dei risultati conseguiti conviene premettere alcuni cenni di tecnica e alcune considerazioni sulla valutazione comparativa dei reperti ottenuti.

Nel confrontare i reperti morfologici che si ottengono usando i due tipi di microscopio, bisogna tener bene presente che, a parte il diverso ingrandimento, essi non possono essere identici e ciò perchè i principi su cui si basano i due tipi di microscopio sono sostanzialmente differenti.

Il microscopio ottico mette in evidenza diversità cromatiche, se si tratta di osservare preparati colorati, ovvero la distribuzione degli indici di rifrazione dei vari componenti l'oggetto osservato, se si tratta di preparati a fresco non colorati.

Il microscopio elettronico mette, invece, in evidenza la distribuzione della densità nell'oggetto osservato. Differenze di densità non devono necessariamente coincidere con differenze di indice di rifrazione; così ad esem-

pio il nucleo, ben visibile col microscopio ottico non è necessariamente visibile anche col supermicroscopio. Inoltre, mentre in batteriologia i reperti ottenuti col microscopio ottico su strisci essiccati e colorati possono essere sempre controllati ed esattamente valutati con l'osservazione dei germi viventi in goccia pendente o in campo scuro, ciò non è possibile col supermicroscopio, strumento col quale si possono per ora osservare soltanto germi morti ed essiccati. A questo proposito bisogna ancora rilevare che mentre nella comune tecnica batteriologica è tollerata l'osservazione dei germi essiccati e fissati con mezzi grossolani (calore), e ciò perchè, dati gli ingrandimenti relativamente limitati che si possono raggiungere col microscopio ottico, le alterazioni dovute all'essiccamento e alla fissazione non hanno una grande importanza, questo non si può dire per il microscopio elettronico, che dà ingrandimenti molto maggiori. Qui le alterazioni dovute all'essiccamento e alla fissazione assumono un notevole risalto, comparabile a quello che esse avrebbero nella tecnica istologica. Ciò non deve però svalutare a priori l'immagine supermicroscopica; non si deve dimenticare che anche in istologia l'osservazione di preparati essiccati può dare immagini nitide e di notevole valore (p. e. strisci di sangue).

Gli oggetti che si osservano al supermicroscopio devono essere purificati quanto più è possibile. Bisogna separarli da ogni sostanza eterogenea e specialmente dai sali presenti nel liquido di sospensione e dalle proteine. Ciò è particolarmente difficile quando si debbono preparare per l'osservazione germi, quali le Rickettsie, incapaci di crescere sui comuni terreni culturali e che si debbono perciò ottenere da tessuti viventi e quindi ricchissimi di proteine, sali ed elementi cellulari.

Le Rickettsie da noi osservate sono state ottenute sia dall'intestino del pidocchio che dal sacco vitellino dell'embrione di pollo sperimentalmente infettato, come anche dai polmoni di topini e di conigli infettati per via respiratoria.

La tecnica di preparazione è stata in tutti i casi la seguente:

1. - Il materiale contenente Rickettsie è stato triturato e sospeso in soluzione fisiologica;

2. - Subito dopo le Rickettsie sono state fissate usando sia l'acido osmico, sia la formalina al 10 %, o il fenolo all'1 %. Abbiamo eseguito la fissazione non solo per misura di sicurezza, ma anche per evitare il più possibile alterazioni dei germi durante le manipolazioni seguenti;

3. - Dopo un breve intervallo le Rickettsie sono state ripetutamente lavate con acqua distillata, sterile, e più volte e a lungo centrifugate a 10.000 e a 1000 giri sì da separarle per quanto possibile da ogni elemento e sostanza eterogenea. Col materiale così ottenuto si sono allestiti preparati tanto per il microscopio ottico che per quello elettronico.

Rileviamo fin da questo momento che la morfologia delle Rickettsie è nelle sue grandi linee costante, qualunque sia l'organismo in cui esse si sono sviluppate. Si rileva soltanto che, come era del resto già noto, mentre nell'intestino del pidocchio le Rickettsie sono quasi sempre molto brevi, tra quelle sviluppatesi nei polmoni sono abbastanza frequenti forme più allungate, bacilliformi. Nell'embrione di pollo poi, specie se lo sviluppo del germe non è stato molto abbondante, si trovano alle volte forme molto lunghe, filamentose. Accanto a queste non mancano però pressochè mai le tipiche forme brevi.

La diversità dei mezzi di fissazione usati non sembra influire sostanzialmente sull'aspetto della Rickettsia. Si può tutt'al più notare che i germi fissati con l'acido osmico hanno un aspetto un po' più tozzo di quelli fissati con il formolo e che la loro sostanza centrale ha limiti piuttosto sfumati.

Con l'osservazione ottica a fresco, o in preparati colorati col Giemsa o col bleu di metilene, le Rickettsie non mostrano speciali particolarità di struttura, all'infuori del noto aspetto bipolare (fig. 1), o alla presenza di granuli negli elementi allungati (fig. 2). Le forme molto lunghe, proprie dell'uovo, sono di rado omogenee, più spesso in esse si alternano zone chiare ad altre più intensamente colorate, a piccoli granuli scuri, senza però che quasi mai il filamento assuma nettamente l'aspetto di una catenella di elementi (fig. 3). Con altri coloranti, col violetto di genziana ad esempio, le Rickettsie hanno un aspetto più grossolano e non mostrano alcuna particolarità di struttura interna (fig. 4).

Abbiamo voluto studiare anche il comportamento delle Rickettsie di fronte al reattivo di Feulgen, e abbiamo potuto constatare che esse non si colorano con la fucsina. Ciò significa che in esse o non esistono per nulla formazioni riferibili ad un nucleo, o che la cromatina vi è presente in uno stato di dispersione tale, da non dare la reazione di Feulgen.

Ad ogni modo i granuli e gli addensamenti che si vedono nelle Rickettsie non possono essere interpretati quali equivalenti nucleari.

Osservata al microscopio elettronico la *Rickettsia* non differisce gran che da quello che è l'aspetto tipico di un bacillo in stadio « secondario » così come è stato descritto da Ruska (*) e Piekarski (**). E' presente una sottile, ma ben netta membrana, la quale sembra mancare o è per lo meno, poco evidente soltanto in alcune delle forme molto allungate. Nell'interno si nota una massa opaca, la quale non presenta mai fini particolarità di struttura. In qualche caso, specie nelle forme più piccole, l'opacità è omogenea, più spesso la densità appare maggiore ai poli del micro-organismo. In ciò il quadro supermicroscopico coincide, per quanto sia meno netto, con quello delle *Rickettsie* osservato al microscopio ottico. Nelle *Rickettsie* più lunghe la massa interna è quasi sempre abbastanza omogenea.

Fra la massa opaca centrale e la membrana appare uno spazio pressochè trasparente e senza struttura. Non è escluso che tale spazio sia un artefatto di tecnica e che si formi in realtà in conseguenza dell'essiccamento del germe, quando il suo protoplasma si stacca dalla membrana e coarta al centro.

Le varie forme ed aspetti che la *Rickettsie* possono presentare sono raffigurati nelle fotografie annesse al lavoro.

Le forme più semplici di *Rickettsie* sono quelle rotondeggianti o ovoidali, a massa centrale omogenea e capsula bene evidente (figg. 5, 6, 7, 8). Accanto a queste si vedono spesso forme più allungate, con addensamento polare della massa centrale, forme che probabilmente preludono alla scissione. L'addensamento polare è particolarmente evidente nelle *Rickettsie* provenienti dall'intestino di pidocchio, nelle quali la massa centrale ha spesso contorni piuttosto irregolari (fig. 9). In alcune forme, specie in quelle fissate con acido osmico, lo spazio esistente fra la membrana e la massa centrale, alle volte a contorni sfumati (fig. 12), è piuttosto ridotto e la *Rickettsia* assume un aspetto più tozzo (fig. 13). Piuttosto rare sono le forme a catenella, costituite da parecchi elementi brevi, saldati fra loro dalla membrana o talvolta anche da filamenti della massa centrale (fig. 14).

Le forme lunghe, presenti quasi esclusivamente nell'embrione di pollo, presentano una massa centrale quasi sempre omogenea con rari accenni a strozzature (fig. 15, 17), notevolmente opaca (fig. 15). Talvolta essa mostra accenni di segmentazione (fig. 16). Non si vede però, se non in rari casi (fig. 14, 19), quell'alternarsi di zone chiare con zone e granuli scuri così

frequente a trovarsi nelle Rickettsie colorate e osservate al microscopio ottico (fig. 2, 3).

La membrana è per lo più molto nettamente delineata ed il distacco dalla massa centrale è alle volte all'estremità del germe molto notevole (fig. 20). Nelle forme molto lunghe la membrana è alle volte poco o nulla visibile (fig. 21).

Molto interessante è lo studio delle forme in divisione. La divisione è preceduta da un allungamento della Rickettsia. Ad un certo punto si manifesta nella massa opaca uno strozzamento, che è centrale nelle forme più brevi, per lo più eccentrico in quelle lunghe. Lo strozzamento s'accentua sempre più, talvolta la massa centrale s'addensa ai poli, infine, quando le due masse sono unite appena da un filamento, inizia la strozzatura della capsula (figg. 5, 16, 25), finchè i due nuovi elementi si staccano completamente l'uno dall'altro (fig. 24).

Più di rado la strozzatura della capsula precede (fig. 16) o accompagna (fig. 12) lo strozzamento della massa centrale.

In casi del tutto eccezionali si hanno aspetti che ricordano la modalità di suddivisione che Sikora ritiene normale per le Rickettsie, la comparsa cioè di un ammasso intermedio che si suddivide in seguito sì da dare due elementi ad aspetto bipolare (fig. 27).

Strano è poi l'aspetto della Rickettsia raffigurata al n. 29. Qui da un elemento di notevole lunghezza si è differenziato e si sta staccando un piccolo elemento sferico, morfologicamente molto simile ad una spora.

Di elementi simili se ne vedono con una certa frequenza aderenti al corpo delle Rickettsie di maggiori dimensioni. Il loro diametro per lo più supera il diametro delle Rickettsie a cui aderiscono (fig. 18), il loro significato è molto incerto.

In complesso il processo abituale di suddivisione delle Rickettsie sembra essere notevolmente semplice e non ci è stato possibile al riguardo di confermare le osservazioni di Sikora.

Le nostre osservazioni ci permettono d'affermare che, per lo meno dal punto di vista morfologico, le Rickettsie non differiscono dai comuni schizomiceti, e simile a questi è anche il loro processo riproduttivo. E' da notare però, che esse presentano sempre l'aspetto così detto, « secondario » che Ruska sostiene essere soltanto uno stadio transitorio nella biologia degli schizomiceti.

Nelle Rickettsie non si vedono quasi mai le forme cosiddette « primarie », uniformemente omogenee e non molto opache e meno ancora le forme « terziarie » con strutture e differenziazioni interne.

Se veramente fosse confermato che tali diversi aspetti non sono altro che fasi di un ciclo vitale, le Rickettsie si differenzerebbero in ciò dal gruppo degli Schizomiceti.

Del resto, anche le particolari affinità tintoriali delle Rickettsie o per lo meno di quella *proWazeki* e la loro modalità di sviluppo non permettono di aggregarle senz'altro ad un gruppo di altri micro-organismi. Si deve presumibilmente considerarle costituire un gruppo a sè stante, per quanto sistematicamente vicino a quello degli Schizomiceti.

RIASSUNTO

Gli AA. studiano la morfologia di *Rickettsia prowazeki*, usando come mezzo di osservazione il microscopio elettronico accanto a quello ottico. I reperti ottenuti fanno ritenere che tale micro-organismo debba presumibilmente essere considerato come appartenente ad un gruppo a sè stante, sistematicamente affine agli Schizomiceti.

SUMMARIUM

Auctores, cum *Rickettsiae prowazeki* explorassent morphologiam, idque microscopiis et electronico et optico adhibitis, argumenta reppererunt quibus credibile sit, Rickettsiam illam sui cuiusdame generis esse, quod genus ordine et ratione sit Schizomycetis adfinae.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Batteriologia e di Fisica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DA ROCHA-LIMA, « Zur Aetiologie des Fleckfiebers », B. kl. W., 567 (1916).
 - (2) GILDEMEISTER E., HAAGEN E. e WALDMAN O., « Handbuch der Viruskrankheiten » (1939).
 - (3) SIKORA H., « Zur Morphologie der Rickettsien », Z. Hyg., 124, 250 (1942).
 - (4) RUSKA H., « Morphologische Befunde bei der bakteriophagen Lyse », Arch. für Virusforschung, 2, 345 (1942).
 - (5) PIEKARSKI G., « Cytologische Untersuchungen an Paratyphus und Colibakterien », Arch. für Mikrobiol., 8, 428 (1937).
-
-
-

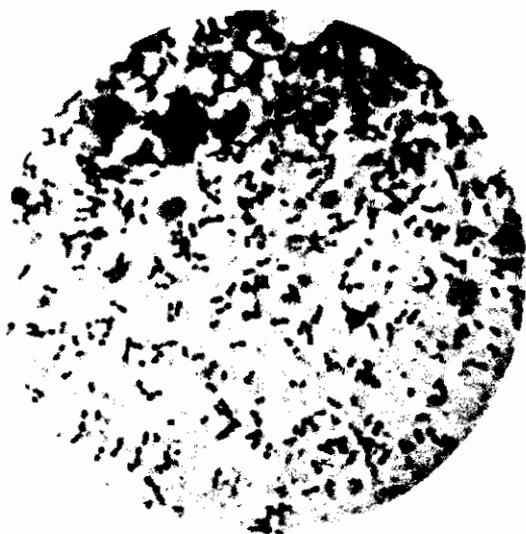


Fig. 1. - Da embrione di pollo, colorazione Giemsa
1800 X (microscopio ottico).

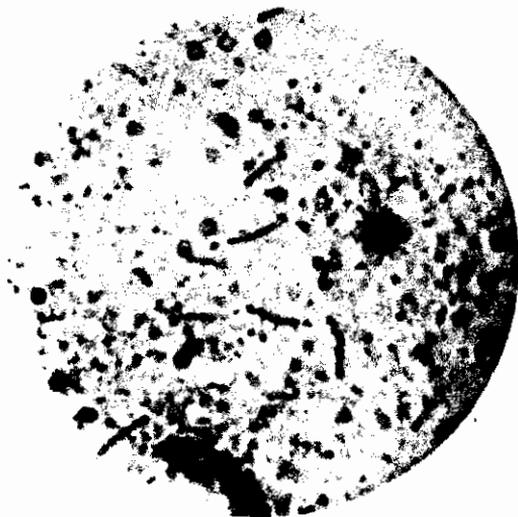


Fig. 2. - Da embrione di pollo, colorazione Giemsa
1800 X (microscopio ottico).



Fig. 3. - Da embrione di pollo, colorazione Giemsa 1800 \times (microscopio ottico).



Fig. 4. - Da embrione di pollo, colorazione violetto genziana 1800 \times (microscopio ottico).



Fig. 5. - Da polmone di topino, fissazione formolo
13.600 \times (microscopio elettronico).

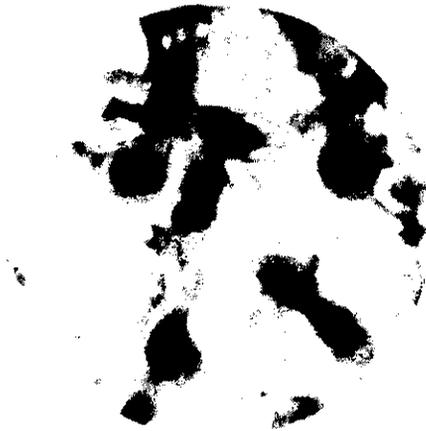


Fig. 6. - Da polmone di topino, fissazione formolo
13.600 \times (microscopio elettronico).



Fig. 7. - Da polmone di topino, fissazione formolo
13.600 \times (microscopio elettronico).



Fig. 8. - Da embrione di pollo, fissazione formolo
13.600 X (microscopio elettronico) riprodotto a 23.300.



Fig. 9. - Da picocchio, fissazione formolo
19.000 X (microscopio elettronico).



Fig. 10. - Da pidocchio, fissazione formolo
19.000 \times (microscopio elettronico).



Fig. 11. - Da pidocchio, fissazione formolo
19.000 \times (microscopio elettronico).



Fig. 12. - Da polmone di coniglio, fissaz. ac. osmico
18.000 X (microscopio elettronico).

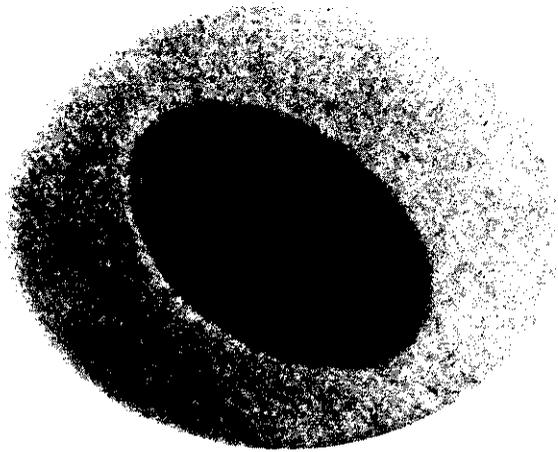


Fig. 13. - Da polmone di topino, fissaz. ac. osmico
30.500 X (microscopio elettronico) riprodotto a 66.000.



Fig. 14. - Da embrione di pollo, fissazione formolo
16.200 X (microscopio elettronico).



Fig. 15. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
18.200 X (microscopio elettronico).

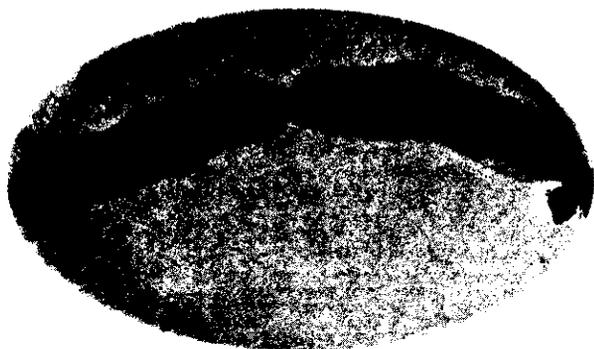


Fig. 16. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
19.000 X (microscopio elettronico).

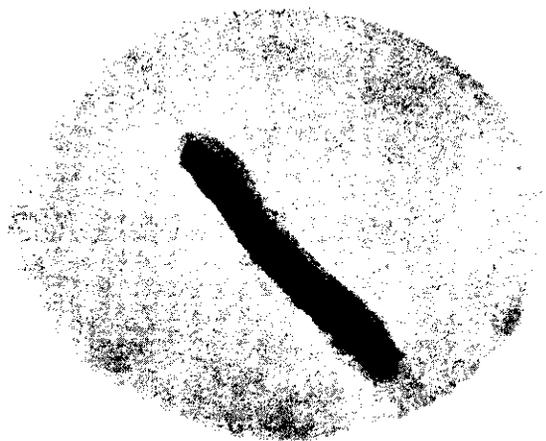


Fig. 17. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
18.000 X (microscopio elettronico).



Fig. 18. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
19.000 X (microscopio elettronico).

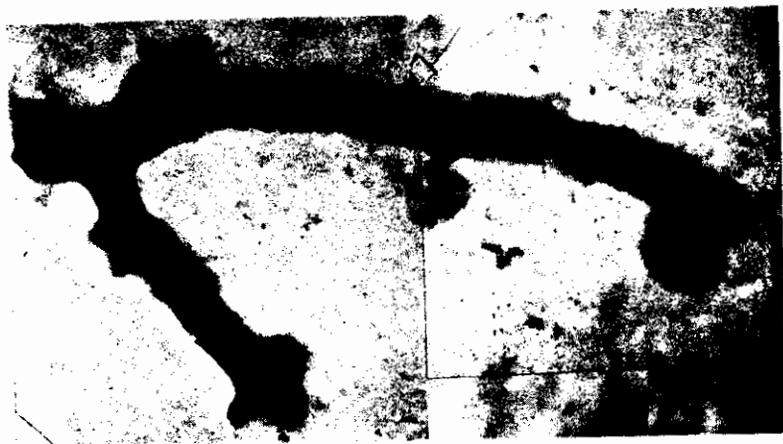


Fig. 19. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
17.200 X (microscopio elettronico).



Fig 20. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
18.200 X (microscopio elettronico).



Fig. 21. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
18.700 \times (microscopio elettronico).



Fig. 22. - Da embrione di pollo, fissazione formolo
 $19.600 \times$ (microscopio elettronico).



Fig. 23. - Da embrione di pollo, fissazione formolo
 $19.200 \times$ (microscopio elettronico)



Fig. 24. - Da embrione di pollo, fissazione formolo
 $19.000 \times$ (microscopio elettronico).

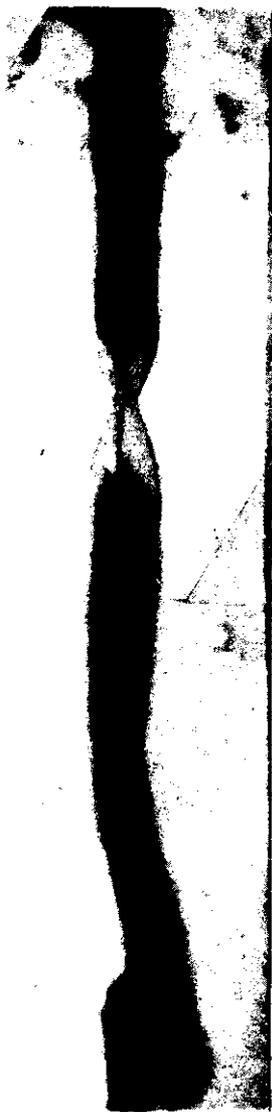


Fig. 25. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
19.000 \times (microscopio elettronico).

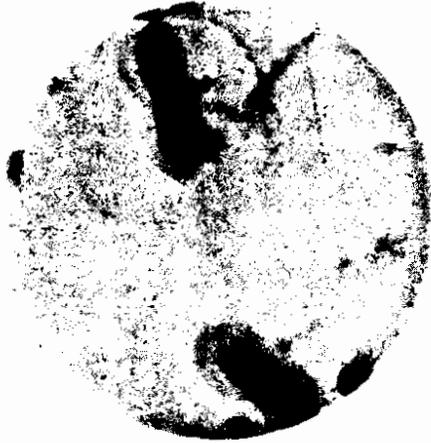


Fig. 26 - Da embrione di pollo, fissazione formolo
16.400 \times (microscopio elettronico).



Fig. 27. - Da pidocchio, fissazione fenolo
19.000 \times (microscopio elettronico) riprodotto a 33.500.



Fig. 28. - Da pidocchio, fissazione formolo
19.000 X (microscopio elettronico).



Fig. 29. - Da embrione di pollo, fissaz. ac. osmico
17.700 X (microscopio elettronico).