

30. IL SIGNIFICATO DEL CICLO ESOERITROCITICO DEI PLASMODI.

In osservazioni compiute nel 1893 Golgi ⁽⁸⁾ interpretava le fasi del *P. immaculatum* osservabili nei leucociti e nelle cellule dei tessuti degli organi interni come forme di sviluppo progressivo e per primo metteva in rapporto tale reperto con le recidive e con la resistenza dei parassiti ai medicinali.

Dopo Golgi l'idea di uno sviluppo dei plasmodi in cellule diverse dai globuli rossi non ebbe seguito e non furono segnalati reperti di questa natura fino al 1930 anno nel quale Huff ⁽¹³⁾ rendeva note le sue prime osservazioni sul ciclo del *P. elongatum*. Egli metteva in evidenza che questo plasmodio si rinveniva comunemente negli eritroblasti e solo raramente negli eritrociti maturi, che il pigmento poteva essere assente e che le forme di moltiplicazione erano abbondanti nei tessuti ematopoietici e rare nel sangue circolante. Era questa la prima segnalazione di un plasmodio con caratteri biologici notevolmente diversi da quelli fino ad allora considerati specifici per i *Plasmodiidae*.

Nel 1931 James ⁽¹⁶⁾ riprendeva un'ipotesi di Grassi del 1900 ⁽³⁾ sulla probabile esistenza di un ciclo intermedio tra gli sporozoiti e le forme endoeritrocitiche e la fondeva con le suddette osservazioni di Golgi, enunciando così la teoria secondo la quale deve verificarsi un ciclo intermedio tra sporozoiti e forme dei globuli rossi con sede nelle cellule del reticolo endotelio.

Nel 1934 Raffaele ⁽²⁵⁾ osservò nel *P. elongatum* i reperti già descritti da Huff e sotto l'influenza della teoria di James li interpretò come un ciclo che si svolgeva nelle cellule del reticolo endotelio.

Nel 1935 Huff e Bloom ⁽¹⁴⁾ precisarono la natura di tutti i tipi di cellule parassitate dal *P. elongatum* e stabilirono che il ciclo di questo plasmodio non si svolge nelle cellule dell'apparato reticolo endoteliale,

Dalla prolusione al corso di Malariologia, letta nella R. Università di Roma il 25 gennaio 1940-XVIII.

ma in tutti i tipi di cellule del sangue e progenitrici di cellule del sangue. Infatti nei conteggi eseguiti da Huff e Bloom risultava che le percentuali delle diverse cellule parassitate erano le seguenti: eritroblasti policromatofili 40,9 %, eritroblasti basofili 29,2 %, emocitoblasti 20,5 %, macrofagi 3,7 %, normoblasti 2,4 %, monociti 1,3 %, plasmacellule 1,1 %, trombociti 1 %, eritrociti 0,1 % e inoltre rarissime cellule della serie granulocitica. Di tutte queste cellule solo i macrofagi e per qualche autore anche i monociti possono essere ascritti all'apparato reticolo endoteliale, un totale cioè di circa il 5 % delle cellule parassitate. Huff e Bloom insistevano sul fatto che il *P. elongatum* parassitava nella grandissima maggioranza cellule della serie eritroblastica. Gli stessi autori osservavano inoltre che il *P. elongatum* si sviluppava nelle plasmacellule, elementi unanimemente considerati come non fagocitari, il che costituiva una prova che si trattava di sviluppo progressivo e non di fagocitosi. Concludendo le osservazioni di Huff e Bloom dimostravano che il *P. elongatum* attaccava una grande varietà di cellule di cui solo una minima parte possono essere ascritte all'apparato reticolo endoteliale (*).

Nel 1936 Raffaele ⁽²⁶⁾ segnalava la presenza di forme schizogoniche apigmentate in cellule del fegato e della milza di canarini inoculati con sporozoiti di *P. relictum*.

Nel 1937 James e Tate ⁽¹⁸⁾ osservavano forme schizogoniche apigmentate di *P. gallinaceum* in numerose cellule dell'apparato reticolo endoteliale e specialmente nelle cellule endoteliali dei capillari cerebrali.

Subito dopo Brumpt ⁽¹⁾ confermava i reperti di James e Tate e osservava che le forme in questione si presentavano tanto dopo inoculazione di sporozoiti che dopo inoculazione di sangue.

Successivamente simili forme apigmentate sono state segnalate da Kikuth e Mudrow ⁽¹⁹⁾ nel *P. cathemerium*, da Manwell ⁽²³⁾, ⁽²⁴⁾ nel *P. circumflexum*, e da Hegner e Wolfson ⁽¹⁰⁾, ⁽¹¹⁾, ⁽¹²⁾ nel *P. nucleophilum*.

(*) In ricerche compiute mentre il presente lavoro era in corso di stampa ho potuto dimostrare che la presenza di parassiti di *P. elongatum* nei macrofagi è dovuta a un fenomeno di fagocitosi e non a sviluppo progressivo del plasmodio nella cellula. Su questo argomento verrà pubblicato un lavoro in questi stessi Rendiconti. Si può di conseguenza ritenere accertato che il *P. elongatum* non è capace di svilupparsi in nessuna cellula dell'apparato reticolo endoteliale.

Le forme riferibili al ciclo schizogonico esoeritrocitico nelle suddette specie di plasmodi hanno dato origine a varie discussioni per l'interpretazione da dare al ciclo stesso.

Hegner e Wolfson ⁽¹⁰⁾, ⁽¹¹⁾, basandosi sull'incostanza del reperto del ciclo esoeritrocitico, hanno emesso l'ipotesi che le forme esoeritrocitiche fossero stadi di toxoplasmi in infezioni miste di questi microorganismi e di plasmodi.

Tuttavia molti fatti rendono difficilmente accettabile questa ipotesi: 1) la presenza di forme esoeritrocitiche dopo trasmissione con zanzare; 2) l'impossibilità di osservare i cosiddetti toxoplasmi in animali non infetti da plasmodi e di dissociarli da questi; 3) il fatto che i toxoplasmi si moltiplicano per divisione binaria e non per schizogonia; 4) la costanza del reperto di fasi esoeritrocitiche in determinate fasi dell'infezione da *P. gallinaceum*.

Pertanto il dubbio sollevato da Hegner e Wolfson è stato gradualmente eliminato dal succedersi delle ricerche e gli stessi autori hanno ultimamente riconosciuto ⁽¹²⁾ che la massima parte dei fatti sono contro la loro ipotesi.

Brumpt ⁽¹⁾ aveva fermato l'attenzione sul fatto che nei polli che venivano a morte per infezione da *P. gallinaceum* la presenza di forme esoeritrocitiche non era costante e che spesso avveniva che polli con 90-95 % di globuli rossi infetti risultassero privi di forme esoeritrocitiche. Ne aveva dedotto la possibilità che il ciclo schizogonico esoeritrocitico non apparteneva al ciclo normale del parassita, ma che fosse espressione di un isotropismo accidentale determinato da un'azione sfavorevole del sangue su merozoiti usciti dagli eritrociti che cercassero così di svilupparsi in cellule endoteliali.

Chortis ⁽²⁾, ⁽³⁾, colpito dagli stessi fenomeni osservati da Brumpt, giunse alla medesima opinione di questo autore, aggiungendo che l'isotropismo accidentale poteva essere favorito da una menomata resistenza dell'apparato reticolo endoteliale dell'animale infettato.

Le interpretazioni di Brumpt e di Chortis erano giustificate dal fatto che questi autori osservavano in prevalenza polli infettati con sangue e morti allo stadio acuto.

Come hanno dimostrato le successive ricerche di James ⁽¹⁷⁾, di Jacobi ⁽¹⁵⁾ e ricerche non ancora pubblicate di Mosna, nei polli inoculati

con sangue infetto le forme esoeitrocitiche compaiono generalmente solo dopo 20-30 giorni dall'inoculazione per cui nei polli che muoiono durante l'attacco primario non si ha il tempo necessario per la loro produzione. Nel periodo suddetto però la comparsa di forme esoeitrocitiche è pressochè costante (90-100 % dei casi) per cui il ciclo esoeitrocitico non può essere ritenuto un fenomeno accidentale.

Secondo alcuni autori tra cui Raffaele ⁽²⁵⁾ e Kikuth e Mudrow ⁽²⁰⁾, ⁽²¹⁾ il ciclo esoeitrocitico è un ciclo monogonico primario intermedio tra gli sporozoiti inoculati dalla zanzara e il ciclo che si verifica nei globuli rossi.

Questa interpretazione avrebbe come presupposto una costante transitorietà del ciclo stesso. Se infatti le forme esoeitrocitiche rappresentassero esclusivamente stadi di sviluppo diretto degli sporozoiti e forme di passaggio tra questi e le forme endoeitrocitiche il ciclo esoeitrocitico dovrebbe scomparire non appena tutti gli sporozoiti si fossero sviluppati.

Al contrario gli stadi esoeitrocitici si osservano nelle infezioni croniche di lunga durata, poichè sono state osservate da James ⁽¹⁷⁾ nel *P. galinaceum* in un pollo morto dopo 8 mesi dall'inizio dell'infezione.

Inoltre le forme esoeitrocitiche si rinvencono dopo inoculazione di sangue infetto per un numero illimitato di passaggi. Nel Laboratorio di Malariologia dell'Istituto di Sanità Pubblica un ceppo di *P. gallinaceum* passato da pollo a pollo per inoculazione di sangue conserva dopo oltre due anni la proprietà di produrre costantemente forme esoeitrocitiche.

Naturalmente di fronte a questi fatti non era più il caso di parlare di sviluppo diretto di tutte le forme esoeitrocitiche dagli sporozoiti, e perciò la teoria è stata modificata ⁽²⁷⁾, ⁽²²⁾ aggiungendo la supposizione che gli sporozoiti formino due tipi di merozoiti denominati rispettivamente istotropi ed emotropi che si perpetuerebbero in due distinte serie di generazioni successive: mentre i merozoiti istotropi avrebbero la proprietà di invadere tanto le cellule dei tessuti che i globuli rossi, i merozoiti emotropi potrebbero invadere i soli eritrociti. Secondo questa teoria modificata, la produzione di forme esoeitrocitiche nelle trasmissioni con sangue infetto sarebbe dovuta alla presenza di merozoiti istotropi nel sangue circolante.

In esperimenti non ancora pubblicati ho potuto stabilire i fatti seguenti. Ho eseguito una serie di passaggi successivi di *P. gallinaceum* da pollo a pollo inoculando ogni volta sangue periferico al primo giorno di comparsa dei parassiti, quando cioè non era mai possibile riscontrare forme esoeitrocitiche negli organi interni del pollo datore di sangue che veniva ucciso subito dopo il passaggio. Se le forme esoeitrocitiche derivassero esclusivamente da precedenti forme esoeitrocitiche, prelevando il sangue all'inizio dell'infezione quando le forme esoeitrocitiche non si sono ancora prodotte, esse dovrebbero essere eliminate fin dal primo passaggio. Invece nei polli tenuti per controllo di ogni passaggio che subivano un'infezione endoeitrocitica sufficientemente prolungata le forme esoeitrocitiche erano regolarmente presenti dopo 20-30 giorni dall'inoculazione. Ho per ora compiuto sei passaggi e l'esperimento continua.

In un'altra serie di ricerche ho osservato che trattando con medicinali antischizontici polli inoculati con sangue infetto da *P. gallinaceum* il periodo di incubazione si prolunga. Così, nei polli trattati per sei giorni nel periodo di incubazione con 2 cg. quotidiani di italcina l'infezione compariva in media dopo 13-15 giorni mentre nei controlli compariva dopo 7 giorni. Dopo 24 giorni dall'inoculazione i controlli uccisi presentavano tutti forme esoeitrocitiche mentre i polli trattati ne erano privi nella proporzione dell'80 %. Nei polli trattati che vennero sacrificati al 31° giorno le forme esoeitrocitiche erano invece presenti in tutti i polli che avevano dimostrato una prolungata infezione endoeitrocitica. Poichè è noto da altri esperimenti che le forme esoeitrocitiche non vengono distrutte dai medicinali antischizontici, il fatto che nei polli trattati le forme esoeitrocitiche sieno comparse con un ritardo equivalente al ritardo osservato per le forme endoeitrocitiche e sieno comparse esclusivamente nei polli che hanno presentato un'infezione endoeitrocitica sufficientemente prolungata, dimostra la diretta dipendenza delle forme esoeitrocitiche dalle forme endoeitrocitiche negli animali inoculati con sangue infetto. Risultati identici sono stati ottenuti in ricerche in corso di Villalobos nello stesso laboratorio.

Queste mie esperienze dimostrano che tra le forme esoeitrocitiche e le forme endoeitrocitiche esistono stretti rapporti di interdipendenza per cui le prime possono originarsi dalle seconde. Non è quindi sostenibile la teoria dell'esistenza di merozoiti isotropi differenziati dai mero-

zoiti emotropi. Anche James (¹⁷) ha recentemente espresso la stessa opinione.

Concludendo, come già facevo osservare nel 1938 (⁴), (⁵) il problema del significato del ciclo esoeритроcitico è del tutto indipendente dal problema relativo alla sede e alle modalità di sviluppo degli sporozoiti. Il problema se gli sporozoiti si sviluppino liberi o in cellule dei tessuti o altrove non è un problema che, qualunque possa essere la sua soluzione, sia in grado di ipotecare l'interpretazione del ciclo esoeритроcitico. Infatti la persistenza del ciclo esoeритроcitico nel corpo del vertebrato e il suo svolgimento parallelo e interdipendente col ciclo endoeритроcitico dimostrano che il ciclo esoeритроcitico ha un significato biologico ben più generale che quello di un fenomeno transitorio legato a una determinata fase del ciclo di sviluppo del plasmodio.

In precedenti lavori (⁴), (⁵), (⁶), (⁷) ho richiamato l'attenzione sulla possibilità che il significato reale del ciclo esoeритроcitico che si osserva in alcune specie di plasmodi sia da ricercarsi nel grado di adattamento tra parassita e ospite raggiunto da ciascuna specie. Il ciclo esoeритроcitico, cioè, sarebbe il documento delle tappe compiute nei lenti processi evolutivi che hanno condotto alla differenziazione degli emosporidi dai coccidi.

Secondo questa interpretazione la capacità presentata da un dato plasmodio di invadere nel vertebrato cellule diverse dai globuli rossi è una capacità insita nella natura della specie e non attributo particolare di uno stadio determinato (sporozoiti).

I fatti fondamentali che appoggiano questa interpretazione sono i seguenti:

a) Differenze di grado di intensità di sviluppo del ciclo esoeритроcitico nelle diverse specie di plasmodi. Infatti accanto a specie che hanno un ciclo esoeритроcitico assai sviluppato (*P. gallinaceum*, *P. cathemerium*, *P. elongatum*) si osservano specie in cui il ciclo esoeритроcitico è scarsissimo (*P. relictum*) e specie in cui il ciclo esoeритроcitico non è osservabile dopo le più accurate ricerche.

b) Differenze di sede di sviluppo del ciclo esoeритроcitico nelle diverse specie di plasmodi. Infatti il *P. relictum* si sviluppa a preferenza in cellule del fegato e della milza, il *P. cathemerium* e il *P. gallinaceum* si sviluppano costantemente anche nelle cellule endoteliali dei capillari

cerebrali, e il *P. elongatum*, a differenza di tutte le altre specie, si sviluppa soprattutto nelle cellule ematopoietiche.

c) Persistenza del ciclo esoeритроcitico nel vertebrato. Infatti le forme del ciclo esoeритроcitico si osservano nelle infezioni croniche da *P. cathemerium*, da *P. gallinaceum* e da *P. elongatum*. Per le infezioni da *P. relictum* non si hanno dati sicuri a causa dell'estrema rarità delle forme esoeритроcitiche presentate dalla specie.

Tutti questi fatti dimostrano che ogni specie di plasmodio ha un comportamento suo proprio nei riguardi dell'esistenza, del grado di sviluppo e della sede del ciclo esoeритроcitico nell'ospite vertebrato.

Se ora si esamina l'intero gruppo degli emosporidi si osserva che sono stati descritti per le diverse specie i seguenti tipi fondamentali di comportamento:

1) Specie in cui il ciclo schizogonico è solo esoeритроcitico (*Haemoproteus*).

2) Specie in cui il ciclo schizogonico avviene nell'interno di cellule ematopoietiche e in minima percentuale nei globuli rossi (*P. elongatum*).

3) Specie in cui il ciclo schizogonico avviene nell'interno degli eritrociti e nell'interno di cellule dei tessuti (*P. gallinaceum*, *P. cathemerium*, *P. circumflexum*, *P. relictum*, ecc.).

4) Specie in cui il ciclo schizogonico avviene solo nei globuli rossi (numerosa specie del genere *Plasmodium*).

E' generalmente ammesso che gli *Haemosporidiidea* sieno in realtà coccidi adattati a vivere nell'interno dei globuli rossi anzichè nell'epitelio intestinale. Naturalmente tale adattamento è avvenuto con un processo di evoluzione che non è stato necessariamente identico e sincrono per tutte le specie.

E' quindi probabile che le accennate differenze di comportamento nei riguardi della sede del ciclo schizogonico che si osservano nelle varie specie di emosporidi rappresentino l'espressione delle tappe evolutive compiute da ciascuna specie nel processo di adattamento al rispettivo ospite.

Pertanto l'intero gruppo degli emosporidi va considerato come un gruppo zoologico in cui le relazioni tra parassita e ospite sono a un diverso stadio di evoluzione. Naturalmente per evidenti ragioni non è dato a noi di risolvere il problema se e con quali modalità i caratteri presentati

oggi da una determinata specie di emosporidio, sieno suscettibili di ulteriori modificazioni.

Si può finalmente concludere che l'esistenza in diversa misura e con diverse modalità di un ciclo esoeритроcitico in alcune specie di plasmodi dimostra con ogni probabilità la capacità di queste specie di invadere cellule dei tessuti diverse dagli eritrociti ed esprime il grado di adattamento raggiunto nelle relazioni tra ciascuna specie e il relativo ospite nei lenti processi evolutivi che hanno portato alla differenziazione degli emosporidi dai coccidi.

RIASSUNTO

Sulla base delle cognizioni acquisite e di ricerche sperimentali si discutono le interpretazioni emesse circa il significato del ciclo esoeритроcitico dei plasmodi e si giunge alla conclusione che tale ciclo esprime con ogni probabilità il grado di adattamento raggiunto nelle relazioni tra ciascuna specie e il relativo ospite nei lenti processi evolutivi che hanno portato alla differenziazione degli emosporidi dai coccidi.

SUMMARIUM

Traditis cognitionibus et experimentalis exploratione fretus, Auctor interpretationes expendit, quae de plasmodiorum cyclo exoerythrocytico sunt prolatae: unde colligit, eo cyclo admodum probabiliter significari usquequo singulae plasmodiorum species ad suum cuiusque hospitem sese accommodaverint lentis illis decursibus, quibus effectum est, ut Haemosporidiidea a ceteris Coccidiomorphis dissimilia facta essent.

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

BIBLIOGRAFIA

(¹) BRUMPT E., « Schizogonie parfois intense du *Plasmodium gallinaceum* dans les cellules endothéliales des poules », C. R. Soc. Biol., 125, 810-813 (1937).

(²) CHORTIS P., « Su alcuni stadi di sviluppo del *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935 », Riv. Parass., 2, 121-128 (1938).

(³) CHORTIS P., « Sulle alterazioni del sistema reticolo endoteliale nelle infezioni da *Plasmodium gallinaceum* », Riv. Parass., 2, 315-322 (1938).

(⁴) CORRADETTI A., « Una nuova classificazione degli *Haemosporidiidea* basata sull'esistenza di un ciclo schizogonico dei plasmodi nelle cellule dei tessuti », Rend. R. Acc. Naz. Lincei, Classe Sc. Fis. Mat. e Nat., 27, 31-32 (1938).

(⁵) CORRADETTI A., « Osservazioni sul ciclo schizogonico dei plasmodi nelle cellule dei tessuti e proposta di una nuova classificazione degli *Haemosporidiidea* », Riv. Parass., 2, 23-37 (1938).

(⁶) CORRADETTI A., « Tentativo di ricostruzione del ciclo generale dei plasmodi nell'ospite vertebrato », Rend. R. Acc. Naz. Lincei, Classe Sc. Fis. Mat. e Nat., 28, 164-167 (1938).

(⁷) CORRADETTI A., « Sullo sviluppo dei parassiti malarici. Discussione con L. Verney », Riv. Malar., 17 (sez. 2), 3-4 e 363-367 (1938); 18 (sez. 2), 149-154 (1939).

(⁸) GOLGI C., « Sulle febbri estivo-autunnali di Roma », Gazz. Med. di Pavia, 2, nov.-dic. (1893); ristampato in: « Gli studi di Camillo Golgi sulla malaria », Roma, Pozzi, 1929.

(⁹) GRASSI G. B., « Studi di uno zoologo sulla malaria », Atti della R. Acc. dei Lincei, Mem. della Classe di Sc. Fis. Mat. e Nat., serie V, 3, 289-512 (1900); idem, II ed., Tip. Acc. Lincei (1901).

(¹⁰) HEGNER R. & WOLFSON F., « Association of Plasmodium and Toxoplasma-like parasites in birds », Amer. Journ. Hyg., 28, 437-454 (1938).

(¹¹) HEGNER R. & WOLFSON F., « Toxoplasma-like parasites in canaries infected with Plasmodium », Amer. Journ. Hyg., 27, 212-220 (1938).

(¹²) HEGNER R. & WOLFSON F., « The possibility of mixed infections in avian malaria », Acta Conventus tertii de malariae morbis, Pars II, 556-566 (1938).

(¹³) HUFF C. G., « *Plasmodium elongatum* n. sp. an avian malarial organism with an elongate gametocyte », Amer. Journ. Hyg., 11, 385-391 (1930).

(¹⁴) HUFF C. G. & BLOOM W., « A malarial parasite infecting all blood and blood forming cells of birds », Journ. of Inf. Dis., 57, 315-336 (1935).

(¹⁵) JACOBI L., « Beiträge zur Pathologie der Infektion des Huhnes mit *P. gallinaceum* Brumpt », Arch. Exper. Path. und Pharm., 191, 482-491 (1939).

(¹⁶) JAMES S. P., « The use of plasmoquine in the prevention of malarial infections », Proc. K. Akad. Sc. Amsterdam, 34, 1424-1425 (1931).

(¹⁷) JAMES S. P., « The incidence of exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium gallinaceum* in relation to the mode of infection », Trans. R. Soc. Trop. Med., 32, 763-769 (1939).

(¹⁸) JAMES S. P. & TATE P., « New Knowledge of the life-cycle of malaria parasites », Nature, 139, 545 (1937).

(¹⁹) KIKUTH W. & MUDROW L., « Ueber pigmentlose Schizogonieformen bei Vogel malaria », Klin. Woch., 16, 1690-1691 (1937).

(²⁰) KIKUTH W. & MUDROW L., « Malariaübertragungsversuche mit Blut und Organen sporoziteninfizierter Kanarienvögel », Riv. Malar., 17, 1-14 (1938).

(²¹) KIKUTH W. & MUDROW L., « Die Entwicklung der Sporozoiten von *Plasmodium cathemerium* in Kanarienvögel », Cblatt. f. Bakt. Paras. u. Inf. Orig., 145, 81-88 (1939).

(²²) KIKUTH W. & MUDROW L., « Chemoterapeutische Untersuchungen an den endothelialen Formen (E. stadien) des *Plasmodium cathemerium* », Zeitschrift f. Immunitätsf., 95, 285-307 (1939).

(²³) MANWELL R. D., « The identification of the avian malaria », Amer. Journ. of Trop. Med., 18, 565-575 (1938).

(²⁴) MANWELL R. D. & GOLDSTEIN F., « Exo-erythrocytic stages in the asexual cycle of *Plasmodium circumflexum* », Amer. Journ. of Trop. Med., 19, 279-296 (1939).

(²⁵) RAFFAELE G., « Un ceppo italiano di *Plasmodium elongatum* », Riv. Malar., 13, 332-337 (1934).

(²⁶) RAFFAELE G., « Presumibili forme iniziali di evoluzione di *Plasmodium relictum* », Riv. Malar., 15, 318-323 (1936).

(²⁷) RAFFAELE G., « La fase primaria dell'evoluzione monogonica dei parassiti malarici », Riv. Malar., 17, 331-343 (1938).

