

3. GIUSEPPE RUSSO e FRANCO GRAZIOSI. — Sul potere patogeno sperimentale dell'*Aspergillus nidulans*.

Riassunto. — Gli AA., dopo una rapida rivista critica dei casi d'infezione naturale e sperimentale riportati nella letteratura come dovuti all'*A. nidulans*, descrivono gli esperimenti da loro condotti con l'inoculazione endovenosa nei piccioni di determinati quantitativi di conidi di un ceppo di *A. nidulans* di origine saprofitica, coltivato in terreno naturale, dove aveva conservato tutte le caratteristiche iniziali.

Gli AA., stabilito un metodo semplice di dosimetria per determinare il quantitativo di conidi da iniettare di volta in volta ai vari animali, hanno osservato che le dosi comprese tra uno e cento milioni di conidi, inoculati per via endovenosa, provocano, in forma più o meno grave, in tutti i piccioni trattati una sintomatologia caratteristica, consistente principalmente in incoordinazione dei movimenti dell'animale, paresi spastica, fino alla paralisi completa.

All'esame istopatologico del fegato e dei polmoni degli animali trattati si riscontrano caratteristiche lesioni micosiche, di tipo necrotico quando erano nello stato iniziale e di tipo granulomatoso, fino a costituire dei veri e propri tubercoli, quando il micete aveva avuto il tempo di svilupparsi con invasione dei tessuti viventi e le lesioni erano in uno stato più avanzato.

Risulta pertanto provato nel piccione il potere patogeno dell'*A. nidulans* inoculato per via endovenosa. L'inoculazione per via intramuscolare non sembra abbia il potere di provocare la malattia.

Résumé. — Les AA., après une rapide revue critique des cas d'infection naturelle et expérimentale signalés dans la littérature comme dus à l'*A. nidulans*, décrivent les expériences qu'ils ont effectuées par inoculation intraveineuse à des pigeons de quantités déterminées de conidies d'une souche d'*A. nidulans* d'origine saprophytique cultivée dans un milieu naturel, où il avait conservé toutes ses caractéristiques initiales.

Les AA., après avoir établi une méthode simple de dosimétrie pour déterminer la quantité de conidie qu'il faut injecter de fois à autre aux divers animaux, ont remarqué que les doses de conidies comprises entre un et cent million, inoculées par voie intraveineuse provoquent, sous une forme plus ou moins grave, dans tous les pigeons traités, une symptomatologie caractéristique, consistant surtout dans une incoordination des mouvements de l'animal et une parésie spastique, jusqu'à la paralysie complète.

A l'examen histopathologique du foie et des poumons des animaux traités, on a constaté des lésions caractéristiques mycotiques, du type nécrotique lorsqu'elles étaient à l'état initial, et du type granulomateux, jusqu'à

constituer de véritables tubercules, lorsque le mycète avait eu le temps de se développer en envahissant les tissus vivants et que les lésions se trouvaient dans un état plus avancé.

La preuve a été ainsi donnée, chez le pigeon, du pouvoir pathogène de l'*A. nidulans* inoculé par voie intraveineuse. L'inoculation par la voie intramusculaire paraît ne pas avoir le pouvoir de provoquer la maladie.

Summary. — After a brief review of cases reported in the literature of natural and experimental infections with *A. nidulans* the authors describe experiments on the intravenous inoculations of pigeons with a known number of conidia of a saprophytic strain of *A. nidulans*. The strain was cultured on a natural medium where it preserved all its initial characteristics. The authors have developed a simple quantitative method of counting number of conidia to be injected. They have shown that intravenous inoculation of one to one hundred million conidia produces in all pigeons characteristic symptoms of a more or less severe form. These symptoms consist in incoordination of movements, spastic paresis and in the most drastic form, complete paralysis. Histopathological examination of the liver and the lungs of the animals shows characteristic lesions, which are of the necrotic and granulomatous type in the initial stages of the infections, but have the appearance of true tubercles in the later stages when the fungus has had time to develop after its invasion of the tissues.

Thus, the pathogenic action of *A. nidulans* in pigeons after intravenous inoculation has been proved. Intramuscular inoculation does not appear to produce the disease.

Zusammenfassung. — Nach einer raschen kritischen Durchsicht der in der Literatur wiedergegebenen natürlichen und experimentellen Infektionsfälle durch *A. nidulans*, beschreiben die VV. die von ihnen bei Tauben gemachten Versuche, durch Inokulation bestimmter Mengen Konidien eines Stammes *A. nidulans*, saprophitischen Ursprungs, die auf natürlichem Boden kultiviert wurden wo sie alle ihre anfänglichen Charakteristiken beibehalten haben.

Die Verfasser haben vorerst eine einfache Dosierungsmethode zur Bestimmung der Konidienmengen, welche jeweils den verschiedenen Tieren injiziert werden mussten, festgestellt und dann beobachtet, dass zwischen 1 und 100 Millionen Konidien enthaltene Dosen, intravenös inokuliert, bei allen Tauben, in mehr oder weniger starker Form, eine kennzeichnende Symptomatologie hervorrufen, die hauptsächlich in Ataxie und spastischer Parese bis zu vollständiger Paralyse besteht.

Die histopathologische Prüfung der Leber und der Lungen der behandelten Tiere zeigt kennzeichnende mycositiche Verletzungen, die im Anfangsstadium von nekrotischem Typus sind und weiterhin von granulomatösem Typus, bis sie ganz richtige Tuberkeln formen, wenn das Mycet genügend Zeit hatte, sich durch Eindringen in die lebenden Gewebe zu entwickeln und die Verletzungen schon vorgeschritten sind.

Dadurch wird die Pathogenität des intravenös inokulierten *A. nidulans* erwiesen. Die intramuskuläre Inokulation scheint nicht fähig zu sein, die Krankheit hervorzurufen.

Le specie del genere *Aspergillus* sono largamente diffuse in natura e numerosi sono i processi patologici dell'uomo e degli animali nei quali esse sono state riscontrate. Tra le forme cliniche dell'aspergillosi sono più comuni quelli della pelle e delle unghie, le polmonari e le otomocosi.

Probabilmente nella maggior parte dei casi il reperto degli aspergilli rappresenta solo il casuale isolamento di contaminanti che non hanno alcuna relazione con il processo infettivo. E' fuori dubbio però che nei casi certi di aspergillosi, particolarmente in quelli in cui sono invasi i tessuti viventi, l'organismo che si riscontra usualmente è l'*Aspergillus fumigatus*.

Riguardo l'*Aspergillus nidulans*, invece, sono molto scarse nella letteratura le notizie relative alle infezioni naturali che esso può determinare nell'uomo e negli animali, nonchè quelle relative al suo potere patogeno in condizioni sperimentali.

Infatti LANGERON ⁽¹⁾, trattando delle aspergillosi, include questo micete tra i saprofiti occasionali, malgrado sia, come l'*Aspergillus fumigatus*, che è ritenuto sicuramente dotato di potere patogeno, un fungo termofilo; carattere questo che, secondo la maggior parte degli AA., sarebbe in rapporto con il potere patogeno. Langeron riferisce inoltre che è stato individuato un solo caso di micetoma nell'uomo provocato dall'*A. nidulans*.

BRUMPT ⁽²⁾, trattando con maggiore ampiezza dell'*A. nidulans*, descrive lo stesso caso come « micetoma a grani bianchi di NICOLLE e PINOY » ⁽³⁾ dal nome degli AA. che lo hanno studiato per primi. Il caso fu osservato in una tunisina di circa quarant'anni, che si era ferita nella pianta del piede durante la raccolta dell'orzo, e studiato microscopicamente e culturalmente.

(1) LANGERON M., Précis de Mycologie, Paris, Masson (1945).

(2) BRUMPT E., Précis de Parasitologie, v. II, Paris, Masson (1936).

(3) NICOLLE C. e PINOY E., Compt. Rend. Acad. Sci. 144, 396 (1907); Arch. de Parasit. 10, 437 (1906).

L'*A. nidulans* è stato anche isolato da otomicosi e faringomicosi [SIEBENMANN, SWAN-BURNETT e WREDEN (4)] e nel pus di una osteoperiostite della mascella di origine dentaria [CHIURCO (4^a)].

PINOY e MASSON (5) riportano un micetoma da *A. nidulans* var. *Cesari* riscontrato nel polmone di un asino, ma THOM e CHURCH (6) ritengono che questo aspergillo sia da riportarsi all'*Aspergillus fumigatus*.

PUESTOW (7) riporta un micetoma umano con lesioni a carico delle braccia e della testa, in cui il solo organismo isolato era l'*A. nidulans*; però nell'essudato e nei preparati istologici non furono trovate forme miceliali e l'inoculazione nella cavia con pus delle lesioni o con culture dell'aspergillo isolato diede risultato negativo.

OTA (8), WEILL e GAUDIN (9), infine, attribuiscono alcune lesioni attorno le unghie delle mani e dei piedi all'*A. nidulans*.

Riguardo al potere patogeno sperimentale dell'*A. nidulans*, EIDAM (10), che per primo lo ha individuato, riferisce che le spore inoculate per via endovenosa in grandissima quantità provocano la morte nel coniglio; anche LINDT (11) e HEIDER (12) sono giunti alle stesse conclusioni, mentre le spore iniettate in piccola quantità risulterebbero innocue.

Secondo NICOLLE e PINOY (3) le inoculazioni sottocutanee nella scimmia e nel coniglio non danno alcun risultato, mentre l'inserzione di frammenti di canna intrisi di spore nella pianta del piede del ratto dà luogo a piccole granulazioni parassitarie che si riassorbono rapidamente.

Inoltre Pinoy avrebbe ottenuto, in condizioni particolari, una cultura di *A. nidulans* che inoculata nella pianta del piede di un piccione produsse un micetoma.

Nell'ampia rivista sintetica di URBAIN e GUILLOT (13) sulle aspergillosi aviarie non è fatta alcuna menzione dell'*A. nidulans*, malgrado gli uccelli siano gli animali più sensibili alle aspergillosi e quantunque gli AA. forniscano una estesa elencazione della specie di aspergilli isolati da animali malati o comunque studiati dal punto di vista del potere patogeno sperimentale.

(4 - 4^a) SIEBENMANN, SWAN-BURNETT, WREDEN, CHIURCO, in Brumpt op. cit. p. 2001.

(5) PINOY E. e MASSON P., Bull. Soc. Path. Exot. 8, 11 (1915).

(6) THOM C. e CHURCH M., The Aspergilli, Baltimore, Williams e Wilkins Co. (1926).

(7) PUESTOW K. L., Arch. Derm. Syph., 20, 642 (1929).

(8) OTA M., Ann. Parasit. Hum. Comp., 1, 137 (1923).

(9) WEILL P. E. e GAUDIN L., Arch. Med. Exp. Anat. Path., 28, 463 (1919).

(10) EIDAM E., Beiträg. Biol. Pflanzen, 3, 392 (1883); Rabh. Krypt. Flora Pilze, 2 Aufl. Bd. I, Abt. II, p. 62 (1887).

(11) LINDT W., Arch. Exp. Path. Pharm., 21, 284 (1886).

(12) HEIDER A., Cent. f. Bakt. Orig., 553 (1890).

(13) URBAIN A. e GUILLOT G., Rev. de Pathol. Comp., 38, 929 (1938).

Infine DRAKE ⁽¹⁴⁾ in un suo recente lavoro (apparso quando i nostri esperimenti erano già in via di ultimazione) ha dimostrato il potere patogeno di questo aspergillo se iniettato per via endovenosa nel coniglio; i sintomi osservati a carico del sistema neuro-muscolare, consistenti specialmente nell'incoordinazione dei movimenti del treno posteriore che progredisce fino alla paralisi spastica completa, dipenderebbero, secondo l'A., da una tossina termolabile contenuta nei conidi. Nella cavia l'inoculazione, per via intraperitoneale o sottocutanea, dava risultati poco evidenti. L'A. nega poi ogni principio tossico nel liquido di cultura dell'*A. nidulans* e nei conidi uccisi con il calore.

Il ceppo adoperato in queste ricerche era da molti anni in laboratorio ed aveva perduto la proprietà di produrre periteci; nessuna notizia è riferita circa il numero dei conidi inoculati; inoltre mancano esperimenti sugli uccelli che sono gli animali più sensibili alle aspergillosi.

Da quanto abbiamo esposto risulta che la questione del potere patogeno dell'*A. nidulans* è ancora aperta a discussione. Infatti nella maggior parte dei casi d'infezione naturale o trattavasi di processi superficiali, senza una effettiva invasione di tessuti, o non è stata raggiunta la prova che il micete sia l'organismo causale nella produzione dell'infezione. Come già si è detto avanti, solo il micetoma studiato da Nicolle e Pinoy rappresenta un'infezione umana con invasione dei tessuti. Nella maggior parte degli esperimenti negli animali sono stati inoculati grandi quantità di conidi, con il risultato della morte rapida degli animali stessi per fenomeni embolici; in nessuno di essi è stata raggiunta la dimostrazione che il fungo possenga un potere d'invasione dei tessuti. Solo negli esperimenti del Drake è stato messo in evidenza il potere del micete di svilupparsi nei tessuti viventi.

PARTE SPERIMENTALE

Nei nostri esperimenti, eseguiti allo scopo di studiare il potere patogeno sperimentale dell'*A. nidulans*, abbiamo usato un ceppo isolato di recente da pane ammuffito che presentava tutte le caratteristiche dell'*A. nidulans* (Eidam), che possono così riassumersi: ottimo di sviluppo intorno a 37°; formazione di micelio giovane, bianco su Czapeck, bruno-avano su terreni ricchi di proteine e poveri di carboidrati; conidi verde-giallastri, conferenti alla colonia un colorito verde di grado variabile secondo la natura del terreno; le culture su Czapeck e su patata diventano fioccosi dopo qualche tempo, mentre quelle su terreno di Sabouraud diventano immediatamente fioccosi con scarsa produzione di conidi; su patata e su Czapeck si

(14) DRAKE C. H., Mycopathologia IV, 103 (1948).



Sintomi osservati nei piccioni inoculati con dosi varie di conidi di *Aspergillus Nidulans*

P = piccione. c = conidi.

Giorni di osservazione	I GRUPPO (via endovenosa)				II GRUPPO (via endovenosa)				III GRUPPO (via endovenosa)					IV GRUPPO (via endomuscolare)	
	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15
	5.000 c	50.000 c	500.000 c	5.000.000 c	100.000 c	1.000.000 c	10.000.000 c	100.000.000 c	100.000 c	1.000.000 c	10.000.000 c	100.000.000 c	100.000.000 c	40.000.000 c	160.000.000 c
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	++	++++	0	0
III	0	0	0	+	0	0	+	++++	0	+	+	++++	m	0	0
IV	0	0	0	++	0	+	+++	m	0	++	++	m		0	0
V	0	0	0	+++	0	+	++++		0	+++	+++			0	0
VI	0	0	0	+++	0	+	m		0	+++	+++			0	0
VII	0	0	0	+++	0	+			0	++++	+++			0	0
VIII	0	0	0	++	0	0			0	++++	+++			0	0
IX	0	0	0	++	0	0			0	++++	++++			0	0
X	0	0	0	++	0	0			0	m	++++			0	0
XI	0	0	0	s	0	0			0		++++			0	0
XII	0	0	0		0	0			0		++++			0	0
XIII	0	0	0		0	0			0		++++			0	0
XIV	0	0	0		0	0			0		++++			0	0
XV	s	s	s		s	s			s		s			s	s

0 = nessun sintomo.

++ = sintomi evidenti.

+++ = sintomi leggeri.

++++ = sintomi gravi.

++++ = sintomi gravissimi.

m = l'animale è morto spontaneamente.

s = l'animale è stato sacrificato.

ha abbondante formazione di pigmento rosso-violaceo in ambiente alcalino, rosso-arancio in ambiente acido; scarsa produzione di pigmenti su altri terreni. Conidiofori da 50 a 100 micron, con pareti lisce; vescicola piccola ovoidale di circa 10 x 7 micron; fialidi primarie e secondarie parallele all'asse del conidioforo, di 6 x 2 micron le primarie, di 5,5 x 1,8 micron le secondarie; conidi giallo-verdastri, piccoli, leggermente spinulati, da 2 a 3 micron di diametro, disposti in lunghe catene, riunite in fitte masse colonnari; su Czapeck e su patata, con o senza glicerina, si ha intensa formazione di periteci, rosso-violacei, che diventano quasi neri con l'invecchiamento, circondati da ife sterili, portanti numerose grosse cellule di Hülle; aschi ottosporici di colore rosso vinoso a maturazione completa; ascospore appiattite a disco bivalve di 4,5 x 2,2 micron.

Si sviluppa sul liquido di Raulin; non coagula il latte, scinde con produzione di acidi il maltosio ed il saccarosio, ma non il lattosio.

Il micete è stato sempre mantenuto su un terreno naturale (patata semplice) sul quale ha conservato tutti i caratteri osservati all'atto dello isolamento.

In considerazione che gli uccelli sono gli animali più sensibili alle aspergillosi, gli esperimenti sono stati eseguiti su piccioni, maschi e femmine, dai 5 ai 10 mesi di età, di peso oscillante tra i 300 ed i 500 gr., tenuti in gabbie separate e nelle stesse condizioni di ambiente e di alimentazione. Gli animali erano osservati giornalmente rilevandone il peso, la temperatura e gli eventuali sintomi. L'inoculazione dei conidi fu praticata nella vena dell'ala o nei muscoli pettorali.

Le sospensioni di conidi usate per l'inoculazione erano preparate nel modo seguente: si seminava un'ansata di spore di *A. nidulans* su Czapeck inclinato e si lasciava sviluppare in termostato a 37°, per circa 48 h., sino a quando il micelio appariva completamente ricoperto da un fitto tappeto verde di conidi (in seguito la cultura diviene inadatta alla raccolta dei conidi per lo sviluppo di un micelio secondario, che conferisce alla cultura stessa un caratteristico aspetto fioccoso). I conidi venivano ripresi con circa 5 cc. di soluzione fisiologica sterile; la sospensione era quindi agitata a lungo con palline di vetro e successivamente filtrata, in asepsi, per cotone, allo scopo di allontanare gli eventuali residui di micelio e le teste rimaste intatte; con accurato controllo microscopico si accertava che la sospensione fosse effettivamente costituita da conidi isolati.

Per la titolazione, la sospensione veniva diluita fino alla sesta diluizione decimale (1/1.000.000); con questa venivano allestite, mediante semina in massa in Czapeck, 8 piastre, ciascuna con 1 cc. di sospensione; si lasciavano le piastre per 48 h a 37° e dopo si faceva la conta delle colonie; si

calcolava quindi la media aritmetica delle colonie sviluppatesi nelle 8 piastre e si controllava l'esattezza della tecnica calcolando la varianza.

Dai dati ottenuti si risaliva alla concentrazione delle spore nella sospensione originale, che opportunamente diluita era usata per l'inoculazione negli animali.

Per ciascun animale, deceduto o sacrificato, venivano allestite, dal sangue e da pezzetti di organi, culture su Czapeck inclinato; si eseguivano inoltre numerose preparazioni istologiche dai vari organi.

Gli esperimenti sono stati condotti su 15 piccioni (che indicheremo con la lettera P ed un numero progressivo da 1 a 15) divisi in quattro gruppi (vedi prospetto A). I 13 animali dei primi tre gruppi furono inoculati, con dosi varie di conidi, per via endovenosa, mentre i due animali del quarto gruppo furono inoculati per via intramuscolare.

I GRUPPO. — Quattro piccioni furono inoculati per via endovenosa con le seguenti dosi di conidi: 5.000 l'animale P1, 50.000 l'animale P2, 500.000 il P3 e 5.000.000 il P4.

I primi tre animali non presentarono sintomi di alcun genere; dopo 15 giorni di osservazione essi furono sacrificati ed all'esame anatomico-patologico non presentarono lesioni di sorta; le culture allestite dai diversi organi e dal sangue risultarono negative.

L'animale P4, inoculato con 5.000.000 di conidi, cominciò invece, a partire dal terzo giorno dell'inoculazione, a presentare una serie di sintomi morbosi che si aggravarono di intensità nei giorni successivi. L'animale rifiutava il cibo e si manifestarono i primi disturbi a carico della deambulazione, consistenti in evidente atassia e paresi degli arti inferiori; successivamente questi sintomi si aggravarono a tal punto che l'animale era costretto a stare accovacciato in un angolo della gabbia con lo sterno appoggiato sul fondo di essa; il piccione, spinto a muoversi, si trascinava aiutandosi con le ali. Al sesto giorno dell'inoculazione gli arti inferiori erano quasi completamente paralizzati. Nei giorni successivi però si osservò un lento e graduale miglioramento di tutti i sintomi, pur rimanendo evidenti la paresi e l'atassia degli arti ed una notevole diminuzione di peso. Allo scopo di rilevare le eventuali lesioni degli organi e di eseguire le culture, l'animale venne sacrificato in undicesima giornata. All'esame anatomico-patologico non si riscontrarono lesioni macroscopiche evidenti a carico dei vari organi; le culture risultarono positive per l'*A. nidulans* solo dai polmoni, mentre quelle eseguite dagli altri organi e dal sangue furono negative.

II GRUPPO. — Quattro piccioni furono inoculati, sempre per via endovenosa, con le seguenti dosi di conidi: 100.000 l'animale P5, 1.000.000 il P6, 10.000.000 il P7 e 100.000.000 il P8.

Il piccione P5, inoculato con la dose più bassa di conidi, non presentò sintomi di malattia; il P6, inoculato con 1.000.000 di conidi, presentò una lievissima forma di atassia a partire dalla quarta giornata di osservazione, che durò solo pochi giorni ed in seguito scomparve completamente. Questi due animali, sacrificati in quindicesima giornata, non presentarono all'autopsia alterazioni apprezzabili; le culture risultarono negative da tutti gli organi e dal sangue.

L'animale P7, inoculato con 10.000.000 di conidi, cominciò invece, già in terza giornata, a mostrare i soliti sintomi paretici ed atassici agli arti inferiori, che si aggravarono repentinamente nei giorni successivi portando a morte il piccione in sesta giornata. All'autopsia si notò una forte congestione di tutti gli organi ed in particolare del fegato, sulla cui sierosa, in corrispondenza della faccia anteriore del lobo destro, si osservò un ascesso-lino del diametro di circa 2 mm., che al successivo esame istologico risultò poi di natura micotica. Le culture risultarono positive dal fegato e dai polmoni, mentre risultarono negative quelle eseguite dal rene e dal sangue.

L'animale P8, inoculato con la dose più alta di conidi (100.000.000) dopo 48 h. presentava sintomi di atassia e paresi agli arti inferiori, che si aggravarono notevolmente il giorno successivo sino alla completa paralisi degli arti; l'animale decedette in quarta giornata. L'esame anatomo-patologico mise in evidenza una forte congestione di tutti gli organi e specialmente del fegato; le culture risultarono positive da tutti gli organi e dal sangue.

III GRUPPO. — In queste prove ci siamo serviti di conidi provenienti dalla cultura ottenuta dal fegato del piccione P⁸ dell'esperienza precedente.

Furono inoculati, sempre per via endovenosa, cinque piccioni con le seguenti dosi: 100.000 conidi all'animale P9, 1.000.000 al P10, 10.000.000 al P11 e 100.000.000 ai piccioni P12 e P13.

L'animale P9, inoculato con la dose più bassa di conidi, non mostrò alcuna sintomatologia sino al quindicesimo giorno di osservazione, in cui venne sacrificato. L'autopsia non mise in rilievo alcuna alterazione degli organi e le culture risultarono tutte negative.

L'animale P10 presentò, a partire dalla terza giornata, la caratteristica sintomatologia atassico paretica, che a mano a mano si accentuò nei giorni successivi, accompagnata da evidente diminuzione di peso. L'animale morì in decima giornata. All'autopsia tutti gli organi si presentavano congesti; il fegato appariva cosparso, sia in superficie, sia in sezione, di numerosi nodulini giallo-grigiastri, della grandezza di una testa di spillo; anche i

polmoni presentavano numerosi piccoli noduli dello stesso aspetto. Le culture furono positive dai polmoni e dal fegato, negative dagli altri organi e dal sangue.

L'animale P11 mostrò fino dal terzo giorno dell'inoculazione la solita sintomatologia atassico-paretica degli arti inferiori che si aggravò gradualmente nei giorni successivi, per mantenersi poi stazionaria dal nono al quindicesimo giorno di osservazione, in cui l'animale fu sacrificato. L'autopsia mise in evidenza il grave deperimento dell'animale; il fegato era modicamente ridotto di volume, di colorito grigio-giallastro, a disegno confuso, con piccole emorragie sottocapsulari. Anche i polmoni di questo animale presentarono alla sezione piccoli noduli grigio-giallastri, circondati da un alone emorragico. Le culture risultarono positive solamente dai polmoni.

Gli animali P12 e P13, inoculati ambedue con la dose più alta di conidi (100.000.000), presentarono già dopo 48h. dall'iniezione sintomi gravi di atassia e paresi agli arti inferiori, che progredirono rapidamente sino alla paralisi completa degli animali, i quali morirono, rispettivamente, in quarta e in terza giornata. L'autopsia mise in evidenza una forte congestione di tutti gli organi e le culture risultarono tutte positive.

IV GRUPPO. — Furono inoculati nei muscoli grandi pettorali due piccioni rispettivamente con 40.000.000 (P14) e 160.000.000 (P15) conidi. Questi animali non presentarono nei giorni successivi alcuna particolare sintomatologia, salvo un notevole deperimento osservato nel P15 accompagnato da diminuzione di peso (da gr. 330 a gr. 275 in 15 giorni). L'animale sacrificato in quindicesima giornata confermava il deperimento osservato in vita, senza segni a carico degli organi. Nel muscolo pettorale destro, lungo il tragitto dell'inoculazione, si notava come una formazione a budello contenente detriti di colorito giallo-verdastro, che all'esame microscopico risultarono costituiti da conidi e leucociti più o meno alterati.

Il piccione P14, sacrificato in quindicesima giornata non presentò alla autopsia segni particolari. Le culture allestite da ambedue gli animali risultarono negative.

Per quanto riguarda la temperatura corporea (rettale) non si notarono in tutti i quindici animali grandi oscillazioni, salvo una evidente ipotermia che colpiva prima della morte quegli animali che decedettero spontaneamente.

REPERTI ISTOLOGICI

La fissazione degli organi era fatta in Duboscq-Brasil o in formalina e le sezioni erano colorate con ematossilina-eosina, con ematossilina ferrica e con il metodo di Gram-Weigert.

Reperti istologici di rilievo si sono riscontrati nei polmoni e nel fegato, con lesioni essenzialmente di tipo necrotico negli animali morti precocemente (da 3 a 6 giorni) e di tipo granulomatoso in quelli vissuti più a lungo (almeno dieci giorni).

Le lesioni del primo tipo consistevano in piccole aree di necrosi di pochi elementi cellulari nel cui ambito ed attorno si notavano numerose plasmacellule; in alcuni punti la necrosi era più progredita ed estesa ad un maggior numero di elementi cellulari.

Le lesioni di tipo granulomatoso apparivano come grossi focolai, costituiti da una zona centrale, omogenea, eosinofila con qualche granulazione basofila dovuta a residui nucleari, con un ammasso di ife più o meno degenerate, che si irradiavano alla periferia a guisa di raggiera (granulo actinomicoide), con frammiste numerose plasmacellule, più o meno conservate a secondo che si trovano verso il centro o verso la periferia della lesione, ed una zona esterna limitata da un addensamento di cellule connettivali giovani frammiste a plasmacellule.

A carico dei reni, della milza e degli altri organi si misero in evidenza solo fatti congestizi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati sperimentali da noi ottenuti indicano chiaramente che l'*A. nidulans* — almeno il ceppo usato — è dotato di potere patogeno per i piccioni. Ciò è dimostrato dal fatto che in seguito all'inoculazione, per via endovenosa, di un certo quantitativo di conidi, anche relativamente poco elevato (quale quello di 1.000.000), si sviluppa nel piccione la malattia con la sintomatologia caratteristica dell'aspergillosi aviaria (incoordinazione dei movimenti del piccione, paresi fino alla paralisi spastica degli arti inferiori e nei casi più gravi fino alla paralisi completa dell'animale), e dal reperto istopatologico delle lesioni riscontrate nel fegato e nel polmone. Queste lesioni corrispondono a quelle descritte da URBAIN e GUILLOT⁽¹³⁾ per le aspergillosi aviarie. E' da notare che le lesioni avevano caratteri diversi a secondo del decorso della malattia e precisamente si riscontrarono lesioni di tipo necrotico nello stadio iniziale e di tipo granulomatoso in uno stadio più avanzato, fino a costituire dei veri e propri tubercoli quando il micete aveva avuto il tempo di svilupparsi e di invadere i tessuti viventi.

Riguardo alla quantità di conidi capaci di produrre la malattia, nelle nostre esperienze abbiamo notato che le dosi comprese tra 5.000 e 500.000 conidi non provocano alcuna sintomatologia apprezzabile e che le culture allestite dagli animali sacrificati sono risultate sempre negative.

La dose di 1.000.000 di conidi, che non sempre è risultata capace di provocare la malattia, rappresenterebbe la *dose limite* per il piccione. Infatti tutti gli animali inoculati con dosi superiori contrassero la malattia.

Le dosi di 5-10 milioni di conidi provocarono una forma morbosa con sintomatologia molto grave, ma non sempre mortale.

Infine una dose di 100.000.000 di conidi provoca in tutti gli animali inoculati sintomi gravissimi, culminanti con la morte degli animali stessi tra la terza e la quarta giornata.

Quest'alta dose non ha permesso di mettere in evidenza lesioni micotiche a carico del fegato e del polmone e ciò forse in relazione al rapido decorso della malattia.

L'inoculazione per via intramuscolare, anche con dosi elevate di conidi, non ha dato luogo alla tipica sintomatologia osservata in quelli trattati per via endovenosa e comunque non mostra potere invasivo negli organi degli animali trattati.

Non è stata notata differenza di comportamento, a parità di dosi, tra gli animali inoculati con conidi del ceppo originale e gli animali inoculati, invece, con conidi provenienti da culture derivate dagli organi di animali morti di micosi.

Roma, Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Microbiologia dell'Università.
Maggio 1949.
