55. A. CORRADETTI e F. VEROLINI — **Relazioni patologico-immunitarie tra parassita e ospite in *Macacus rhesus* inoculati con sangue infetto da *Plasmodium cynomolgi*, successivamente splenectomizzati, e ripetutamente reinfettati con ceppo omologo.**

Riassunto. — Si espongono i risultati di ricerche condotte su scimmie (*Macacus rhesus*) infettate con *Plasmodium cynomolgi* mediante inoculazione di sangue, e successivamente splenectomizzate a distanza dalla guarigione apparente dell'attacco primario.

I limiti di durata dell'infezione, dedotti attraverso l'esame diretto del sangue, le subinoculazioni ad animali sani, e l'esame del sangue dopo splenectomia, sono risultati variare da meno di 174 giorni a più di 703 giorni dalla inoculazione.

Le scimmie splenectomizzate e risultate guarite sono suscettibili di contrarre una nuova infezione con ceppo omologo di *P. cynomolgi*. La reinoculazione può determinare un'infezione che si prolunga fino alla morte dell'animale, oppure un'infezione che viene rapidamente dominata dall'ospite. In quest'ultimo caso successive reinoculazioni determinano nuove infezioni, ciascuna delle quali risulta di entità e di durata sempre inferiori alle precedenti.

In nessuna scimmia studiata è stato possibile mettere in evidenza forme endoepiteliali epatiche nelle biopsie di fegato praticate in periodi differenti dell'infezione e in differenti condizioni immunitarie. Di conseguenza nelle scimmie inoculate con sangue l'origine delle recidive è sempre in rapporto alla presenza di forme endoeritrocitiche, il cui numero nei periodi di latenza è al disotto della soglia di visibilità microscopica, ma che iniziano una rapida moltiplicazione tutte le volte che, spontaneamente o artificialmente, si riducono le difese immunitarie dell'ospite.

Résumé. — On expose les résultats de recherches conduites sur des singes (*Macacus rhesus*) infectés avec *Plasmodium cynomolgi* au moyen d'inoculation de sang et ensuite splenectomisés après la guérison apparente de la première attaque.

Les limites de la durée de l'infection, selon les résultats déduits à travers l'examen direct du sang, les subinoculations à des animaux sains et l'examen du sang après la splénectomie, varient de moins de 174 jours à plus de 703 jours de l'inoculation.

Les singes splénectomisés et qui ont guéri sons susceptibles de con-

tracter une nouvelle infection par l'inoculation d'une souche homologue de *P. cynomolgi*. La réinoculation peut déterminer une infection qui se prolonge jusqu'à la mort de l'animal, ou bien au contraire une infection qui est rapidement dominée par l'hôte. Dans ce dernier cas des inoculations successives déterminent de nouvelles infections chaque fois moins sévères et de moindre durée que la précédente.

Chez aucun des singes étudiés on n'a pu mettre en évidence des formes endo-épithéliales hépatiques dans les biopsies du foie qui ont été pratiquées à des époques différentes de l'infection et dans des conditions immunitaires différentes. Par conséquent chez les singes inoculés avec du sang, l'origine des récidives est toujours en rapport avec la présence de formes endo-érythrocytiques, dont le nombre pendant les périodes latentes est au dessous du seuil de visibilité microscopique, mais qui se multiplient très rapidement chaque fois que les défenses immunitaires de l'hôte sont réduites naturellement ou artificiellement.

Summary. — The paper describes the results of experiments conducted on monkeys (*Macacus rhesus*) which had been infected with *Plasmodium cynomolgi* by means of blood inoculation, and were subsequently splenectomized after the end of the primary attack.

The limits of duration of the infection, deduced by blood examination, sub-inoculation to healthy animals and blood examination after splenectomy, varied between less than 174 and more than 703 days after inoculation.

The splenectomized monkeys which did not relapse (in other words showing a complete recovery) were liable to contract a re-infection with the homologous strain of *P. cynomolgi*. Re-inoculation resulted in either an infection which lasted, with continuous positive blood, the entire life of the host, or an infection which it quickly overcame. In the latter case subsequent reinoculations led to re-infections, each of them being less serious and shorter than the preceeding infections.

In no monkeys was it possible to detect endo-epithelial forms in liver biopsies taken in different periods of the infection and in different immunity conditions. Consequently the origin of the relapses, in blood-inoculated monkeys, is always related to the presence of endo-erythrocytic forms. The number of these latter is below the treshold of microscopic visibility in latent periods, but they rapidly multiplicate every time the immunitary defences of the host are spontaneously or artificially reduced.

Zusammenfassung. — Die Verfasser geben die Ergebnisse von Untersuchungen, die bei Affen (Macacus rhesus) durchgeführt wurden, die zunächst durch Einimpfen von mit *Plasmodium cynomolgi* verseuchtem Blut infiziert worden waren, worauf die Milz nach einer bestimmten Zeit nach der augenscheinlichen Heilung des Primäranfalls herausgenommen wurde.

Die mittels unmittelbarer Blutuntersuchung, Einimpfen des Blutes der kranken bei gesunden Tieren sowie Blutuntersuchung nach erfolgter Herausnahme der Milz festgestellte zeitliche Begrenzung der Infektion zeigte Schwankungen von weniger als 174 bis zu mehr als 703 Tagen vom Tage der Einimpfung des verseuchten Blutes an gerechnet.

Die Affen, denen die Milz herausgenommen und die als geheilt anzusehen waren, können eine neue Infektion mit einem homologen Stamm von *Plasmodium cynomolgi* erleiden. Die erneute Einimpfung kann eine Infektion hervorrufen, die bis zum Tode des Tieres dauert, oder eine solche, die von dem Wirt schnell überwunden wird. In diesem letzteren Fall rufen weitere Einimpfungen neue Infektionen hervor, von denen jede einzelne hinsichtlich der Stärke und Dauer schwächer als die vorhergehende ist.

Bei keinem der untersuchten Affen war es möglich, hepatische Endoepitelformen bei der zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektionsdauer und unter verschiedenen Immunitätsbedingungen angestellten Leberbiopsien festzustellen. Folglich ist bei den Affen, denen Blut eingeimpft wurde, der Ursprung des Rückfalls stets in Beziehung zu dem Vorhandensein von endoeritrocytischen Formen, deren Anzahl in der Zeit des latenten Zustands so gering ist, dass sie im Mikroskop nicht sichtbar sind, die sich jedoch jedesmal stark vermehren, wenn.

In precedenti ricerche ([1, 2]) abbiamo messo in evidenza che il *Plasmodium cynomolgi* inoculato in serie al *Macacus rhesus* mediante sangue infetto, conserva in ogni passaggio la proprietà di produrre recidive,

---

([1]) Corradetti A., Verolini F.: Studies on relapses in blood-induced infections from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium cynomolgi*. - The Journ. of the National Malaria Society, Vol. 9, n. 4, 322-331, 1950.

([2]) Corradetti A., Verolini F.: Studi sulle recidive da *Plasmodium malariae* e da *Plasmodium cynomolgi*, in infezioni indotte con sangue. - Rendic. Istit. Sup. Sanità, 14, 271-281 (1951).

senza che contemporaneamente si osservino forme endoepiteliali epatiche (*).

Delle scimmie utilizzate per quella ricerca e di altre successivamente inoculate con sangue (74 scimmie in totale), dieci sono sopravvissute sufficientemente a lungo per permetterci di istituire esperimenti diretti a meglio chiarire le relazioni patologico-immunitarie tra il *P. cynomolgi* e il *M. rhesus* nelle infezioni indotte con sangue. I decorsi individuali di queste dieci scimmie, con un sommario degli esperimenti istituiti in ciascuna di esse, sono allegati in fondo al lavoro.

Le indagini sono state rivolte ai seguenti obiettivi: 1° Determina-

---

(*) Il termine « recidiva » (in inglese: « relapse ») ha dato origine a una critica di GARNHAM (*Tropical Disease Bulletin, 48*, 437-38, 1951); il quale riferendosi al nostro lavoro in lingua inglese scrive: « It is unfortunate that the authors do not define « relapse ». If this term is confined to attacks of fever (or bouts of parasitaemia) following a primary attack, with parasite-free intervals between them, then there is no certainty that the attacks described in this paper belong to this category — they may well be recrudescences, or attacks of fever separated by periods during which the blood is never free of parasites (though these may only be detectable by massive blood inoculation into susceptible hosts). If this strict interpretation were applied, it may well be that relapses are due to persistent exo-erythrocytic forms while recrudescences are due to a persistent low parasitaemia with periodic fading immunity ».

E' ormai universalmente accettata la classificazione di JAMES (3) che distingue: a) *recrudescenze* per le positività del sangue che si verificano entro l'ottava settimana dalla fine dell'attacco primario; b) *recidive* per le positività osservabili tra la nona e la ventiquattresima settimana; v) *ricorrenze* per le positività riscontrabili oltre la venticinquensima settimana. Inoltre, quando non si intende fare una distinzione specifica, la parola « recidiva » si usa come termine generale.

Noi abbiamo usato il termine « recidiva » nel comune senso generale, ma abbiamo anche esattamente specificato il tempo di comparsa dei parassiti dopo la fine dell'attacco primario. A pag. 329 del nostro lavoro, a proposito del *P. malariae* abbiamo scritto: « All the patients showed more or less persistent parasitic relapses at a time varying from two to 29 weeks after the end of the primary attack. In two subjects in particular, it was observed that *P. malariae*, after 31 and 34 inter-human passages respectively (all made through blood inoculation), still mantained the property of producing relapses 22 and 29 weeks after the end of the primary attack ». Inoltre a pag. 330, a proposito del *P. cynomolgi*: « Relapses may appear at any time during the period of observation, with more frequency at the 2nd-4th week, at the 15-16th and at the 27th-28th after the end of the primary attack ».

Come si vede, da quanto avevamo scritto risultava evidente che le nostre « recidive » comprendevano non le sole « recrudescenze », ma anche le vere « recidive » e le « ricorrenze » della classificazione di JAMES.

Se poi non si accetta la classificazione di JAMES, ma si considera « recidiva » soltanto la *ricomparsa dei parassiti dopo periodi di assoluta assenza dei parassiti stessi nel sangue*, si deve dimostrare che tali recidive realmente esistano e che si verifichino periodi di latenza in cui nessun globulo rosso sia parassitato. Tutta la nostra esperienza malariologica ci induce a ritenere che nei periodi di latenza il sangue non è mai totalmente libero dai parassiti, e che questi scompaiono di fatto dai globuli rossi solo con l'estinzione immunitaria dell'infezione.

---

(3) JAMES S. P.: Some general results of a study of induced malaria in England. - Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 24 (5) 477-538, 1931.

zione della durata minima e massima dell'infezione negli animali inoculati con sangue. 2° Risultati delle reinfezioni con ceppo omologo in scimmie non splenectomizzate e in scimmie splenectomizzate. 3° Ricerca di stadi endoepiteliali epatici nelle scimmie inoculate con sangue, effettuata in differenti periodi dell'infezione e in diverse condizioni immunitarie.

Materiale tecnico

Le 10 scimmie che sono state di base alle nostre ricerche appartengono, come si è detto a una serie di 74 scimmie tutte rese infette in passaggi consecutivi mediante inoculazione di sangue.

Di ciascun animale sono stati eseguiti quotidianamente esami microscopici del sangue per la ricerca dei parassiti per tutta la durata degli esperimenti (lacune nell'osservazione delle scimmie 3 e 5 sono riferite nella descrizione dei decorsi individuali).

Le 10 scimmie sono state distribuite per gli esperimenti come segue:

a) 8 scimmie (n. 2, 3, 5, 21, 24, 32, 34, 37) sono state splenectomizzate a varia distanza dalla fine dell'attacco primario.

b) la nona scimmia (n. 41), non splenectomizzata, è stata reinoculata quando, per la lunga negatività intercorsa, la prima infezione poteva considerarsi presumibilmente estinta.

c) 4 delle scimmie splenectomizzate e risultate negative (n. 2, 21, 32, 34) sono state reinoculate con ceppo omologo.

d) Una delle scimmie splenectomizzate e risultata ancora positiva (n. 24) è stata reinoculata con ceppo omologo dopo la guarigione della recidiva e l'estinzione dell'infezione.

e) 2 delle scimmie reinoculate (n. 24, 34) hanno avuto a distanza di tempo una seconda e una terza reinoculazione, e una di esse (n. 34) anche una quarta.

f) le biopsie epatiche sono state eseguite su quattro delle scimmie suddette (3, 21, 24, 37).

g) la decima scimmia (n. 50), non splenectomizzata è stata sottoposta a una serie di reinoculazioni e il suo sangue è stato subinoculato ad altre scimmie a diversa distanza di tempo dall'inoculazione.

Esperimenti

Gli esperimenti eseguiti su ciascuna scimmia sono descritti in dettaglio nei decorsi individuali allegati in fondo al lavoro. E' necessario tenere presenti i decorsi individuali per una esatta comprensione degli esperimenti che qui si descrivono.

1) *Risultati delle splenectomie.* — Essi sono riassunti nella tabella 1. Per ciascuna scimmia abbiamo indicato il giorno (a partire dal-

Tab. 1

Scimmia	Giorno della splenectomia a partire dalla inoculazione	Risultato	Giorno in cui fu osservata l'ultima positività nelle scimmie che furono negative dopo la splenectomia
2	277°	Negativo	152°
3	251°	Recidiva	—
5	228°	Negativo	157°
21	443°	Negativo	338°
24	380°	Recidiva	—
32	219°	Negativo	91°
34	174°	Negativo	131°
37	93°	Recidiva	—

l'inoculazione) in cui la spletectomia fu effettuata, e il risultato della splenectomia stessa. Nell'ultima colonna della tabella abbiamo aggiunto, per le sole scimmie che risultarono non aver più parassiti, il giorno, sempre a partire dall'inoculazione, in cui era stata osservata l'ultima positività spontanea.

2) *Risultati delle reinoculazioni.* — Essi sono riassunti nella tabella 2. Per ogni esperimento effettuato abbiamo indicato la scimmia o le scimmie su cui è stato eseguito e il risultato ottenuto.

3) *Risultati delle biopsie epatiche.* — Essi sono riassunti nella tabella 3. Questa tabella è stata costituita con tutti i dati in nostro possesso, ossia includendovi oltre le quattro nuove anche le sei biopsie eseguite dal dr. Gramiccia, di cui abbiamo parlato nei nostri precedenti la-

Tab. 2

Tipo dell'esperimento e numero della scimmia	Risultato
a) *reinoculazione in scimmia non splenoctomizzata*	
41	Reinfezione durata 11 giorni e guarita per crisi
b) *reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
2	Reinfezione durata 11 giorni e terminata per crisi (animale morto 16 giorni dopo)
21	Reinfezione con continua positività del sangue periferico per 376 giorni
24	Reinfezione durata 10 giorni e guarita per crisi
32	Reinfezione durata 10 giorni e seguita a breve distanza da due recrudescenze (della durata di 10 e 11 giorni rispettivamente)
34	Reinfezione durata 8 giorni e seguita a breve distanza da due recrudescenze (della durata di 19 e 10 giorni rispettivamente)
c) *seconda reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
24	Reinfezione durata 8 giorni e guarita per crisi
34	Reinfezione durata 9 giorni e guarita per crisi
d) *terza reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
24	Reinfezione durata 5 giorni (lieve parassitemia)
34	Reinfezione durata 4 giorni (lieve parassitemia)
e) *quarta reinoculazione in scimmie splenectomizzate*	
34	Negativa (osservata fino a 12 giorni dopo la reinoculazione, dopo di che la scimmia è morta)

vori ([1, 2]). Nella tabella le biopsie sono state disposte in ordine di tempo a partire dall'inoculazione, e per ciascuna di esse è stato descritto lo stadio dell'infezione in cui si trovava la scimmia al momento della biopsia.

Tab. 3

Numero della scimmia	Giorno dalla inoculazione in cui si è eseguita la biopsia	Risultato per la presenza di forme endcepiteliali epatiche	Stadio dell infezione in cui era la scimmia al momento della biopsia epatica
4	11°	Negativo	Durante l'attacco primario
2	53°	Negativo	Durante una recrudescenza
1	67°	Negativo	Alla fine dell'attacco primario
37	75°	Negativo	Durante una recrudescenza
1	88°	Negativo	Durante una recrudescenza
5	116°	Negativo	Durante una recidiva
2	151°	Negativo	Durante una recidiva
3	260°	Negativo	9 giorni dopo la splenectomia, all'inizio della recidiva post-splenectomia
24	278°	Negativo	Durante una ricorrenza
21	697°	Negativo	154 giorni dopo la reinoculazione seguente la splenectomia (la scimmia era continuamente positiva nel sangue da 151 giorni)

4) *Risultati relativi alla scimmia* 50. — Sulla scimmia n. 50 sono state eseguite ricerche speciali che sono descritte nel decorso della scimmia stessa nell'allegato in fondo al lavoro.

I fatti emersi sono i seguenti:

a) la persistenza dei parassiti con negatività apparente del sangue si è estesa dall'80° giorno dall'inoculazione al 653° giorno;

b) durante questo periodo si è avuta resistenza totale a quattro reinoculazioni di sangue infetto eseguite rispettivamente al 409°, al 431°, al 461°, e al 632° giorno dalla prima inoculazione;

c) durante lo stesso periodo tre subinoculazioni di sangue apparentemente negativo sono state eseguite a scimmie sane rispettivamente ai giorni: *a*) 475°, 478° e 481°; *b*) 502°; *c*) 585°, 601°, 623°. Di queste subinoculazioni le prime due (*a*, *b*) hanno avuto esito positivo;

d) l'ultima positività del sangue della scimmia 50 si è verificata al 703° giorno dall'inoculazione (la morte è avvenuta al 798° giorno).

Analisi dei risultati e discussione

Dalla tabella 1 risulta che degli 8 animali splenectomizzati, tre (3, 24,37) hanno avuto una recidiva post-splenectomia e cinque sono rimasti negativi. La recidiva verificatasi nella scimmia 24 dimostra che il *P. cynomolgi* può ancora persitere nell'ospite al 380° giorno dopo la inoculazione di sangue infettante. D'altra parte il comportamento delle scimmie restate negative dopo la splenectomia dimostra che l'infezione può risultare totalmente estinta molto prima: al 228° giorno (scimmia 5), al 219° (scimmia 32) e perfino al 174° (scimmia 34).

Dai dati osservati nei nostri esperimenti risulta che i limiti entro i quali l'immunità acquisita dall'ospite riesce ad eliminare totalmente il parassita oscilla tra: — di 174 e + di 380 giorni dall'inoculazione.

Gli esperimenti compiuti sulla scimmia 50 dimostrano d'altra parte che la resistenza alla reinfezione e la positività delle subinoculazioni sono dimostrabili per lungo tempo (dall'80° al 653° giorno dall'inoculazione) in apparente totale negatività del sangue, e che la persistenza dei parassiti endoeritrocitici determinata a + di 380 giorni dall'inoculazione nei nostri sopra descritti esperimenti di splenectomia può elevarsi a + di 703 giorni.

Dalla tabella 2 risulta che una reinfezione eseguita su una scimmia non splenectomizzata (scimmia 41) è risultata positiva. Dal decorso individuale di questa scimmia si rileva che essa è stata reinoculata 488 giorni dopo la prima inoculazione e dopo una negatività apparente del sangue di 398 giorni. L'infezione risultata dalla reinoculazione ha avuto la durata di 11 giorni ed è guarita per crisi. L'animale è venuto a morte troppo presto per determinare l'insorgenza o meno di eventuali recidive.

Dal complesso dei risultati sugli esperimenti di reinoculazione in animali splenectomizzati, si può dedurre che l'organismo ospite, che è già guarito una volta dall'infezione prima della splenectomia, può non essere in grado di elaborare un'immunità sufficiente ad eliminare la seconda infezione. In tal caso (v. scimmia 21) si istituisce un'infezione caratterizzata dalla continua persistenza nel sangue di un alto numero di parassiti (tale da essere riscontrabile ogni giorno al microscopio), che dura quanto la vita dell'ospite (376 giorni nella scimmia 21).

Più comunemente (scimmia 2, 24, 32, 34) si verifica un attacco da reinfezione, talvolta seguito da recrudescenze, che termina con scomparsa totale dei parassiti, come è dimostrato dalla negatività di ripetute subinoculazioni del sangue ad altri animali indenni (cfr. decorso individuale della scimmia 24).

Dalla tabella 2 si rileva ancora che la guarigione dalla reinfezione

avvenuta in assenza della milza non ha impedito l'attecchimento di una seconda reinoculazione, ma l'infezione è risultata di minore entità ed è guarita per crisi con nuova scomparsa totale dei parassiti, come è dimostrato dalla ripetuta negatività di subinoculazioni di sangue ad animali sani (cfr. decorsi individuali delle scimmie 24 e 34). La terza guarigione non ha impedito l'attecchimento di una terza reinoculazione, ma l'infezione è risultata ancora più debole e transitoria. Una quarta reinoculazione infine (effettuata sulla scimmia 34) non risultava avere attecchito al 12° giorno, data in cui si è verificata la morte dell'animale.

Dai decorsi individuali delle scimmie 24 e 34 si rileva che la seconda reinoculazione ha attecchito, essendo stata effettuata quando la guarigione dalla prima reinfezione era avvenuta da non meno di 59 e non più di 107 giorni (scimmia 24) e rispettivamente da non più di 237 giorni (scimmia 34). La terza reinoculazione poi ha attecchito, essendo stata effettuata quando la guarigione dalla seconda reinoculazione era avvenuta da non meno di 47 e non più di 72 giorni (scimmia 24) e rispettivamente da non meno di 25 e non più di 71 giorni (scimmia 34).

Mettendo in rapporto questi fatti tra loro, si può concludere che, in assenza della milza, la seconda guarigione avvenuta in un tempo compreso tra 59 e 107 giorni prima della seconda reinoculazione non determina nell'ospite un grado di immunità sufficiente a prevenire l'attecchimento della reinoculazione stessa. Ugualmente la terza guarigione, avvenuta in un tempo compreso tra 25 e 71 giorni prima della terza reinoculazione, non produce nell'ospite un grado di immunità sufficiente a prevenirne l'attecchimento. Risulta tuttavia evidente che, anche in assenza della milza, l'elaborazione dell'immunità da parte dell'ospite di fronte a reinfezioni ripetute appare ogni volta più rapida ed intensa, per cui ciascuna reinfezione successiva risulta più lieve e transitoria della precedente.

Dalla tabella 3 risulta che tutte le biopsie epatiche eseguite nei diversi stadi dell'infezione e in diverse condizioni immunitarie sono risultate negative. Particolarmente interessante appare il fatto che nè in una ricorrenza spontanea (scimmia 24), nè in una recidiva post-splenectomia (scimmia 3), nè infine in una scimmia splenectomizzata, reinoculata e continuamente positiva nel sangue da 151 giorni (scimmia 21), è stato possibile rilevare la presenza di forme endoepiteliali epatiche.

Mettendo ora in relazione in risultati ottenuti in questo lavoro con quelli descritti nelle precedenti pubblicazioni ([1, 2]), possiamo giungere alla seguente conclusione generale.

Le infezioni da *P. cynomolgi* indotte nel *M. rhesus* mediante inoculazione di sangue parassitato, decorrono senza che sia stato possibile

rilevare la formazione di forme endo-epiteliali epatiche. Questo equivale a dire che, nel caso specifico, le forme endoeritrocitiche non risultano svilupparsi nelle cellule del fegato, in nessun momento dell'infezione. Inoltre tale sviluppo nelle cellule epatiche non avviene neppure quando si produca artificialmente, con la splenectomia, un abbassamento del grado di immunità sufficiente a scatenare invece una recidiva endoeritrocitica, anche a grande distanza dall'inolazione e dopo lunghi periodi di latenza (cfr. specialmente il decorso della scimmia 3 e anche quello della scimmia 24).

Malgrado l'assenza di forme endoepiteliali epatiche, si assiste nella quasi totalità delle scimmie inoculate con sangue al verificarsi di recrudescenze, di recidive, di ricorrenze, separate tra loro da talvolta lunghissimi periodi di latenza parassitaria. Tali ricomparse di parassiti non possono che essere dovuti alla persistenza di forme endoeritrocitiche in numero limitato così da rimanere al disotto del numero necessario perchè un parassita abbia probabilità di essere osservato in uno striscio di sangue (*). Tre fatti fondamentali ripetutamente osservati da uno di noi in circa 20 anni di esperimenti sulle infezioni da plasmodi, dimostrano questa nostra asserzione: 1°) L'osservazione sporadica e casuale di forme endoeritrocitiche in pieno periodo di latenza (questo fenomeno si può rilevare quasi costantemente, quando gli esami di sangue si compiano sistematicamente tutti i giorni per l'intero decorso). 2°) La positività delle subinoculazioni ad animali indenni del sangue prelevato in pieno periodo di latenza. 3°) La presenza di pigmento nero recentemente fagocitato nel reticolo endotelio delle scimmie morte in piena latenza o del tessuto delle milze estirpate in periodo di latenza.

Di conseguenza l'infezione prodotta con inoculazione di sangue può considerarsi *una infezione endoeritrocitica pura e continua*, i cui periodi di latenza corrispondono ad abbassamento numerico dei parassiti per opera del grado di immunità elaborato dall'ospite, e le cui recrudescenze, recidive e ricorrenze corrispondono a periodi di aumento numerico per moltiplicazione dei parassiti, verificatasi in relazione con

---

(*) Calcolando che il *M. rhesus* abbia circa 150 cc. di sangue (= 150.000 mm. cubi), ed essendovi circa 5.000.000 di globuli rossi ogni mm. cubo (4) occorre la presenza di 750.000 parassiti nel corpo della scimmia perchè si abbia la probabilità di incontrarne uno *ogni milione di globuli rossi nello striscio.*

Questo sempre presumendo che la distribuzione dei parassiti sia omogenea nel sangue e che non si verifichi una preferenza dei globuli parassitati a restare nei capillari degli organi interni.

---

(4) Malamos B.: Das Blutbild bei Affenmalaria. - Arch. f. Schiffs - u. Trop. Hyg., Vol., 38, n. 9, 374-386, 1934.

abbassamenti spontanei o provocati del grado di immunità presente nell'ospite. Una prova evidente di questa interpretazione è data dal tumultuoso moltiplicarsi dei parassiti dopo la splenectomia effettuata in periodo di latenza: la splenectomia producendo un improvviso abbassamento del grado di immunità dell'ospite, ne deriva un immediato aumento del numero dei parassiti nei globuli rossi e l'insorgenza di una recidiva post-splenectomia.

Nel caso specifico del *P. cynomolgi* nel *M. rhesus* inoculato con sangue, l'infezione continua endoeritrocitica, lasciata decorrere spontaneamente, evolve con un'alternanza di remissioni e di aumenti numerici fino all'estinzione totale dei parassiti.

E' importante il fatto che abbiano avuto esito negativo i tentativi eseguiti per provocare artificialmente, con splenectomie e reinoculazioni, la comparsa di forme endoepiteliali epatiche. Ne deriva la deduzione che le forme endoeritrocitiche non si dimostrano in grado di invadere le cellule epatiche e che pertanto queste vanno considerate come derivanti solo dagli sporozoiti.

Correlando infine questi studi eseguiti sperimentalmente mediante inoculazione di sangue con quanto è noto sul decorso dell'infezione naturale prodotta da inoculazione di sporozoiti (sia nelle infezioni delle scimmie che in quelle dell'uomo), siamo indotti a ritenere che anche quando si inoculino sporozoiti il processo di origine delle recidive possa nella grande maggioranza dei casi, svolgersi nell'identica maniera.

Il ciclo endoepiteliale epatico nelle infezioni da plasmodi dei mammiferi (e ci riferiamo specialmente ai plasmodi dell'uomo, sui quali esiste un'enorme esperienza derivata da oltre mezzo secolo di ricerche in tutto il mondo) deve essere in genere limitato al periodo di incubazione e all'attacco di prima invasione. Il suo continuare nel proseguimento dell'infezione, benchè accertato in due diverse occasioni ([5], [6]), non può essere un fatto da accettare come costante senza che si compiano in proposito ulteriori estese ricerche. Se si trattasse di un reperto comune, pensiamo che non sarebbe facilmente spiegabile come mai nessuno degli innumerevoli patologi, che per oltre mezzo secolo hanno studiato soggetti deceduti per malaria, in tutti gli stadi dell'infezione, abbia mai descritto (magari non riferendole all'infezione malarica) le grossolane lesioni istologiche del ciclo endoepiteliale epatico.

I citati reperti di Shortt e Garnham ([5]) e di Shortt, Bray e Cooper ([6])

([5]) Shortt H., Garnham P. C. C.: Demonstration of persisting exoerythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. - Brit. Med. Journ. 1225-1228, 1948.

([6]) Short H. E., Bray R. S. e Cooper W.: Further notes on the tissue stages of *Plasmodium cynomolgi*. - Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 48, 122-131, 1954.

sono molto importanti in quanto dimostrano la possibilità della persistenza di forme endoepiteliali epatiche in scimmie inoculate con sporozoiti di *P. cynomolgi* tre mesi e 115 giorni prima rispettivamente. I reperti stessi però non costituiscono da soli la dimostrazione che la persistenza delle forme endoepiteliali si verifichi costantemente, che non si verifichi contemporaneamente una persistenza del ciclo schizogonico endoeritrocitico, e che alle sole forme endoepiteliali sieno dovute le recidive.

Il fatto che nelle infezioni indotte con sangue le recidive, anche a lunga distanza dall'inoculazione, si verificano ugualmente senza che forme endoepiteliali epatiche risultino dimostrabili, dimostra d'altra parte che le forme del sangue possono esser da sole la causa delle recidive. E' evidente che nelle infezioni ottenute con sporozoiti, nei casi come quelli segnalati da Shortt e collaboratori in cui si verifica una persistenza prolungata delle forme endoepiteliali epatiche, i merozoiti derivati da queste schizogonie endoepiteliali possono alimentare anch'essi le recidive: ma questo non esclude che le recidive derivino comunemente dalla persistenza del ciclo endoeritrocitico, persistenza ormai ampiamente documentata da numerose ricerche.

A noi sembra che il fascino che esercita la teoria dell'origine delle recidive dalle sole forme endoepiteliali epatiche (come quella dalle forme endoistiocitarie nella malaria degli uccelli) si basi, piuttosto che su esperimenti comparativi, sulla presunzione che la chinina o gli altri medicamenti somministrati debbano sistematicamente e sempre distruggere tutti i parassiti endoeritrocitici fino all'ultimo individuo. Vedendo che le recidive potevano verificarsi anche nei soggetti precedentemente curati, si è rimasti attratti, specie negli ambienti clinici dalla suggestiva spiegazione che i parassiti non potessero derivare dalle forme endoeritrocitiche, che si presumevano totalmente eliminate. Dopo la scoperta delle forme in cellule dei tessuti si è ritenuto logico attribuire le recidive solamente a queste: il che è contrastato dai nostri risultati.

Conclusioni

1) Nei *M. rhesus* inoculati con sangue infetto da *P. cynomolgi*, la persistenza dei parassiti endoeritrocitici può durare fino a + di 703 giorni dopo l'inoculazione. D'altra parte l'infezione può risultare già estinta in — di 174 giorni dall'inoculazione.

2) Una reinfezione con ceppo omologo eseguita su una scimmia al 488° giorno dalla prima inoculazione (dopo una negatività apparente

di 398 giorni), ha attecchito producendo un attacco di breve durata cessato per crisi.

3) Nelle scimmie guarite e successivamente splenectomizzate, una nuova reinoculazione di parassiti endoeritrocitici produce costantemente la reinfezione. L'organismo ospite può non essere in grado di elaborare un'immunità sufficiente ad eliminarla, cosicchè si istituisce un'infezione caratterizata dalla continua persistenza dei parassiti nel sangue (in numero tale da essere rilevabile ogni giorno all'esame dello striscio) per tutta la durata della vita dell'ospite (fino a 376 giorni di positività continua osservati). Più comunemente l'organismo ospite, malgrado l'assenza della milza, riesce a estinguere anche la seconda infezione. Dopo la seconda guarigione si può ottenere una seconda reinfezione a cui segue una terza guarigione. Ciascuna infezione successiva è però di entità e durata sempre minore della precedente, per cui si assiste all'accrescersi della resistenza alle infezioni ripetute in un organismo ospite privo di milza.

4) Nelle scimmie inoculate con sangue le forme endoepiteliali epatiche sono risultate assenti in qualsiasi momento dell'infezione spontanea (attacco primario, recrudescenza, recidiva, ricorrenza) e anche durante abbassamenti del grado di immunità dell'ospite artificialmente provocati (recidiva post-splenectomia, reinoculazione dopo splenectomia).

5) Nelle scimmie inoculate con sangue le recidive originano dalle forme endoeritrocitiche sopravvissute nel periodo di latenza, che si moltiplicano in corrispondenza di abbassamenti spontanei o provocati dell'immunità dell'ospite.

ALLEGATO

DECORSI INDIVIDUALI DELLE SCIMMIE IN ESPERIMENTO

SCIMMIA 2.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 36 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 9 giorni, indi una recrudescenza durata 6 giorni. Si è così giunti al 57° giorno dall'inoculazione. Dal 58° in poi segue un periodo di negatività sporadiche occasionali fino al 152° giorno dall'inoculazione (dal 78° al 106° giorno il sangue non fu esaminato). Al 152° giorno i parassiti furono osservati per l'ultima volta, dopo di che il sangue permase negativo fino al 277° giorno.

Splenectomia al 277° giorno. Il sangue resta sempre negativo per tutta l'osservazione durata fino al 397° giorno (120° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 397° giorno dall'inoculazione. Il sangue diviene positivo al 404° giorno (cioè 7 giorni dopo la reinoculazione) e rimane fino al 415° (infezione intensa cessata per crisi). Negativo fino alla morte avvenuta al 431° giorno.

SCIMMIA 3.

Dopo 4 giorni di incubazione (inoculazione endovenosa) si hanno 17 giorni di positività. Segue una pausa di 15 giorni, indi una recrudescenza di 5: nuova pausa di 5 giorni seguita da 3 giorni di positività. Dal 44° al 79° giorno il sangue non viene esaminato. Dall'80° al 251° giorno continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 251° giorno. Positiva dal 258° (sette giorni dopo la splenectomia) al 279° giorno. Negativa dal 280° al 286° giorno. Positiva al 287° (ultimo giorno in cui si osservano i parassiti. Negativa dal 288° al 306° giorno (data della morte).

SCIMMIA 5.

Dopo 8 giorni di incubazione si hanno 13 giorni di positività. L'esame viene discontinuato per 35 giorni, dopo di che si osservano gruppi di giorni di positività alternati a gruppi di giorni di negatività. L'ultima positività si osserva al 157° giorno dall'inoculazione. Negatività dal 158° al 228°.

Splenectomia al 228° giorno dall'inoculazione. Negativa fino alla morte avvenuta al 405° giorno dall'inoculazione.

SCIMMIA 21.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 59 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 7 giorni, indi una recrudescenza durata 16 giorni: seguono 23 giorni di pausa, e quindi altri 7 giorni di positività. Si è così giunti al 118° giorno dall'inoculazione. Dal 119° giorno in poi segue un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche occasionali fino al 338° giorno dall'inoculazione, ultimo giorno in cui si osservano i parassiti. Dal 339° al 443° giorno si ha continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 443° giorno dopo l'inoculazione. Il sangue resta sempre negativo durante tutta l'osservazione fino al 543° giorno (100° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 543° giorno dall'inoculazione. Il sangue diviene positivo al 546° giorno (cioè 3 giorni dopo la reinoculazione) e permane sempre tale fino alla morte dell'animale avvenuta al 922° giorno dall'inoculazione (376 giorni di positività continua).

SCIMMIA 24.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 32 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 14 giorni, indi una recrudescenza durata 8 giorni. Si è così giunti al 60° giorno dall'inoculazione. Dal 61° segue un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche fino al 322° giorno dall'inoculazione, ultimo giorno in cui si osservano i parassiti. Dal 323° a 380° si ha negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 380° giorno. Recidiva post-splenectomia due giorni dopo: la recidiva dura dal 382° al 408° giorno. Segue una pausa di 13 giorni, quindi un secondo periodo di positività durato 14 giorni: nuova pausa di 3 giorni e terzo periodo di positività di 12 giorni. Si è così giunti al 449° giorno dalla prima inoculazione (69° giorno dopo la splenectomia). Segue un periodo di negatività del sangue che dura dal 450° al 641° giorno dall'inoculazione (261° dopo la splenectomia). Subinoculazione di sangue di questa scimmia ad altre sane compiute ai giorni 611°, 621°, 635° dall'inoculazione (rispettivamente 231°, 241°, 255° dalla splenectomia) hanno dato esito negativo.

Reinoculazione al 641° giorno. Positiva dal 647° al 657° giorno (infezione intensa cessata per crisi). Il sangue permane negativo dal 658° al 764° giorno dall'inoculazione. Le subinoculazioni del sangue a scimmie sane compiute ai giorni 705°, 721° e 752° (rispettivamente 64°, 80°, e 111° dalla reinoculazione) hanno dato esito negativo.

Seconda reinoculazione al 764° giorno. Positività dal 768° a 776° giorno (infezione intensa cessata per crisi). Il sangue permane negativo dal 777° all'848° giorno. Le subinoculazioni compiute nei giorni 801°, 810° e 823° dall'inoculazione (rispettivamente 37°, 46° e 59° dalla ultima reinoculazione) non hanno prodotto l'infezione nelle scimmie sane.

Terza reinoculazione all'848° giorno dall'inoculazione. Pasitiva dall'856° all'861° giorno (lieve infezione). Negativa dall'862° all'884° giorno (data della morte dello animale).

SCIMMIA 32.

Dopo un'incubazione di 9 giorni si hanno 40 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 13 giorni, indi una recrudescenza durata 13 giorni: seguono 16 giorni di pausa e quindi un nuovo periodo di positività di 12 giorni. Si è così giunti al 91° giorno dall'inoculazione. Dal 92° giorno al 219° si ha continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 219° giorno dall'inoculazione. Il sangue resta sempre negativo per tutta l'osservazione durata fino al 313° giorno (94° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 313° giorno dall'inoculazione. Il sangue diviene positivo al 315° giorno (cioè due giorni dopo la reinoculazione) e permane positivo fino al 325° giorno. Segue una pausa di 10 giorni, indi un periodo di positività durato 10 giorni: nuova pausa di 23 giorni e secondo periodo di positività di 11 giorni. Si è così giunti al 379° giorno (66° dopo la reinoculazione). Dal 380° giorno al 488° (data della morte dell'animale) si ha negatività del sangue periferico.

SCIMMIA 34.

Dopo 7 giorni di incubazione si hanno 36 giorni di attacco primario. Segue, dal 44° al 131° giorno dall'inoculazione, un periodo di negatività interrotto da positività sporadiche occasionali: ultima osservazione dei parassiti al 131° giorno. Dal 132° al 174° giorno si ha continua negatività del sangue periferico.

Splenectomia al 174° giorno. Il sangue resta sempre negativo per tutta l'osservazione durata fino al 273° giorno dall'inoculazione (99° dopo la splenectomia).

Reinoculazione al 273° giorno. Positiva dal 276° al 284° giorno. Segue una

pausa di 20 giorni, indi un periodo di positività durato 19 giorni: nuova pausa di 24 giorni e secondo periodo di positività di 10 giorni. Si è così giunti al 357° giorno dall'inoculazione (84° dalla reinoculazione). Dal 358° al 585° giorno si ha continua negatività del sangue periferico.

Seconda reinoculazione al 585° giorno. Positiva dal 587° al 596° giorno. Il sangue permane negativo dal 597° al 668° giorno. Subinoculazioni di sangue a scimmie sane eseguite al 643° e al 653° giorno (rispettivamente 46° e 56° giorno dall'ultima reinoculazione non hanno prodotto l'infezione.

Terza reinoculazione al 668° giorno. Positiva dal 673° al 676° giorno (lieve infezione). Negativa dal 677° al 708° giorno (data della morte dell'animale). Una *quarta reinoculazione* effettuata al 696° giorno non ha prodotto positività nei 12 giorni intercorsi fino alla data della morte.

SCIMMIA 37.

Dopo un'incubazione di 6 giorni si hanno 33 giorni di attacco primario. Segue una pausa di 10 giorni, indi una recrudescenza di 10 giorni: seguono 15 giorni di pausa e un periodo di positività durato 9 giorni. Si è così giunti all'83° giorno dall'inoculazione. Negatività del sangue periferico dall'84° al 93° giorno dall'inoculazione.

Splenectomia al 93° giorno dall'inoculazione. Recidiva post-splenectomia due giorni dopo: la recidiva dura dal 95° al 151° giorno. Dal 152° giorno al 170° (data della morte dell'animale) negatività interrotta dall'osservazione sporadica di parassiti al 157° giorno.

SCIMMIA 41.

Dopo un'incubazione di 10 giorni si hanno 13 giorni di positività. Segue una pausa di 52 giorni indi un periodo di positività durato 14 giorni. Si è così giunti all'89° giorno dall'inoculazione. Segue una negatività continua dal 90° al 488° giorno dall'inoculazione.

Reinoculazione al 488° giorno dall'inoculazione. Positiva dal 493° al 503° giorno. Negativa dal 504° al 542° giorno dall'inoculazione (data della morte dell'animale).

SCIMMIA 50.

Dopo 5 giorni di incubazione si hanno 15 giorni di positività. Segue una pausa di 13 giorni, indi una recrudescenza di 14 giorni: nuova pausa di 29 giorni e nuova positività di 6 giorni. Si è così giunti al 79° giorno. Negatività continua dall'80° al 409° giorno dall'inoculazione.

Reinoculazione al 409° giorno dall'inoculazione. Esito negativo.

Seconda reinoculazione al 431° giorno con sangue eccezionalmente carico di parassiti. Esito negativo con osservazione di un parassita nel sangue il giorno successivo (432°).

Terza reinoculazione al 461° giorno. Esito negativo.

Prima subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 67). Il sangue viene inoculato tre volte, rispettivamente ai giorni 475°, 478° e 481° dalla

prima inoculazione della scimmia 50. La scimmia subinoculata diviene positiva 5 giorni dopo l'ultima iniezione di sangue e svolge un'infezione normale.

Seconda subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 68). Il sangue viene inoculato una sola volta al 502° giorno dalla prima inoculazione della scimmia 50. La scimmia subinoculata diviene positiva 10 giorni dopo e svolge un'infezione normale.

Terza subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 69). Il sangue viene inoculato tre volte, rispettivamente ai giorni 585°, 601° e 623° dalla prima inoculazione della scimmia 50. La scimmia 69 non si infetta.

Quarta reinoculazione della scimmia 50, eseguita al 632° giorno dalla prima inoculazione.

In tutto questo periodo sperimentale, e cioè dall'80° giorno al 632°, la scimmia 50 era sempre stata negativa, con l'unica eccezione del giorno successsivo alla seconda reinoculazione (432° dalla prima inoculazione).

La quarta reinoculazione ha esito negativo, mentre l'infezione si svolge regolarmente in altra scimmia di controllo (n. 70) inoculata con lo stesso sangue. Sporadici parassiti si osservano ai giorni 653°, 654° e 655°. La negatività prosegue fino al giorno 666° in cui con sangue apparentemente negativo della scimmia 50 si esegue la quarta subinoculazione a scimmia sana.

Quarta subinoculazione del sangue della scimmia 50 ad altra scimmia sana (n. 74). Esito negativo. Il sangue della scimmia 50 si mantiene negativo fino alla morte avvenuta al 798° giorno dalla prima inoculazione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di parassitologia.