

37. CONSERVAZIONE DI *P. GALLINACEUM* A BASSA TEMPERATURA.

E' noto [Laveran e Mesnil ⁽¹⁾, Zanderbergen ⁽²⁾, Jahnel ⁽³⁾], che i tripanosomi e le spirochete sopportano bassissime temperature, senza perdere nè la loro vitalità nè la virulenza.

Jahnel ⁽³⁾ in particolare ha posto il tripanosoma della durina (*T. equiperdum*) e le spirochete della sifilide e della ricorrente ad una temperatura prossima allo zero assoluto (ottenuta mediante l'elio liquido) ed ha verificato come questi microrganismi resistano per alcune ore in tali condizioni.

T. equiperdum conserva il potere di infettare il topolino dopo 20 ore di permanenza a -195° (temperatura dell'azoto liquido); le spirochete della ricorrente e del Sodoku e la spirocheta della sifilide infettano ancora dopo 14 giorni rispettivamente il topolino ed il coniglio.

Turner ⁽⁴⁾, mediante una miscela di ghiaccio secco (anidride carbonica solida) ed alcool, con la quale si raggiungono facilmente circa -79° , notò come le spirochete della sifilide e della framboesia sopravvivano, mantenendosi virulente per oltre un anno.

A differenza quindi dei risultati ottenuti da Jahnel⁽³⁾, i cui procedimenti presentano grandi difficoltà tecniche e finanziarie, così che le ricerche condotte con questi metodi hanno un valore esclusivamente scientifico, quelli riferiti da Turner ⁽⁴⁾, appunto perchè più semplice la tecnica seguita, offrono anche un interesse pratico.

Coggeshall ⁽⁵⁾, infatti, cercò di utilizzare il metodo per conservare ceppi di plasmodi, che normalmente si mantengono in laboratorio su animali con passaggi in serie. Dopo numerosi tentativi, l'A. riprodusse in *Macacus rhesus*, iniettandogli sangue citrato e parassitato da *P. knowlesi* o da *P. inui*, una tipica infezione malarica: il sangue era stato conservato per 70 giorni nella medesima miscela proposta da Turner ⁽⁴⁾.

Ho ripreso queste ricerche, seguendo press'a poco la medesima tecnica usata da Coggeshall ⁽⁵⁾ e le ho estese al *P. gallinaceum*. Ritengo però che sarà utile ampliare tali esperienze, studiando la capacità di conservazione di ciascuna specie di parassiti, poichè solo in questo modo si potrà usufruire con sicurezza del metodo per il mantenimento dei singoli ceppi.

Turner (4) [comunicazione orale a Coggeshall (5)], ha rilevato la grande importanza che ha in queste esperienze la rapidità di congelamento e disgelo, per cui, come ho potuto controllare, occorre porre la massima attenzione a questi due momenti del procedimento tecnico.

Ho posto in un thermos di ampia capacità provettine da sierodiagnosi, contenenti ciascuna circa 1 cc di sangue con il 68% dei globuli rossi parassitati, citratato nella proporzione di due parti di sangue ed una di citrato di sodio al 2%; l'anidride carbonica solida, previamente triturrata mantiene nel recipiente una temperatura che oscilla intorno a -75° .

Il sangue si congela in pochi secondi ed in tali condizioni si conserva per tutta la durata dell'esperimento. Il disgelo viene facilitato ed affrettato ponendo le provette in acqua riscaldata a 37° .

Il controllo del sangue, osservato prima dell'iniezione, a fresco e su strisci colorati, ha dimostrato la lisi di gran parte dei globuli rossi: ne sussistevano però ancora di apparentemente non alterati, reperto questo confermato dall'esito degli esperimenti.

Riassumo in una tabella i dati desunti:

Numero di giorni dall'inizio dell'esperimento	Numero dei polli				Giorno di comparsa dei parassiti
	Inoculati	Morti durante la incubazione	Infettatisi	Negativi	
10	4	1	1	2	10
30	4	2	2	—	8-10
50	2	—	1	1	5
70	4	—	—	—	—

Come si desume dall'esame delle cifre sopra riportate, la percentuale dei polli che si infetta, pur essendo alta, non è tale da offrire una garanzia assoluta, per cui è bene inoculare sempre un numero possibilmente grande di animali, onde aumentare la probabilità di ottenere il ceppo conservato. Si deve tener presente però, che anche nella inoculazione di sangue fresco, vi sono sempre polli in cui l'infezione non attecchisce.

La bassa temperatura non ha alcuna influenza sulla virulenza dei parassiti che sopravvivono: infatti il periodo di incubazione della malattia negli animali inoculati non è più lungo di quello normale, e da quanto ho potuto constatare, seguendo ogni giorno il decorso dell'infezione, questa si svolge regolarmente.

La durata di conservazione del parassita, come risulta da miei esperimenti, è abbastanza notevole e tale da essere presa in considerazione, soprattutto allorchè per una qualsiasi ragione possano mancare gli animali su cui si effettua il passaggio del plasmodio.

Credo che con alcune modificazioni, riguardanti specialmente la sostanza anticoagulante usata e la proporzione in cui questa viene aggiunta al sangue, si possano ottenere risultati migliori.

RIASSUNTO.

L'A. espone un metodo di conservazione del *P. gallinaceum* a bassa temperatura, -75° .

SUMMARIUM.

Auctor ostendit qua ratione *Plasmodium gallinaceum*, infimae (-75°) subditum temperaturae, integrum servetur.

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

BIBLIOGRAFIA

(¹) LAVERAN A. e MESNIL F., « Trypanosomes et trypanosomiasis », Paris, Masson (1938).

(²) ZANDERBERGEN K., « Trypanosomen en lage temperaturen », Diss., Leiden (1922).

(³) JAHNEL F., « Ueber das Ueberleben von Syphilis und Recurrens-spirochäten sowie Sodokuspirillen in flüssigem Stickstoff. (Temperatur -16°) und die Einwirkung anderer Kältegrade auf diese Mikroorganismen », Klin. Wschr., 16, 1304-1305 (1937); JAHNEL F., « Ueber das Ueberleben von Syphilis Spirochäten bei tiefster Temperatur (-271° C; $1,7^{\circ}$ vom absoluten Nullpunkt entfernt) », Klin. Wschr., 17, 836-838 (1939); JAHNEL F., « Ueber das Ueberleben von Trypanosomen und Recurrens-spirochäten nach Abkühlung in flüssigem Helium bis auf $-269,5^{\circ}$ C, d. i. $3^{\circ},7$ vom absoluten Nullpunkt entfernt, Zeitschr. f. Immunitätsf., 94, 328-341 (1938).

(⁴) TURNER T. B., « The preservation of virulent *Treponema pallidum* and *T. pertenue* in frozen state with a note on the preservation of filtrables viruses », Jl. Exp. Med., 67, 61-77 (1938).

(⁵) COGGESHALL L. T., « Preservation of viable malaria parasites in frozen state », Proc. Soc. f. experim. Biol. and Med., 42, 499-501 (1939).

