

18. SULL'INFETTABILITÀ DELL'AEDES ALBOPICTUS NEI VARI STADI DELL'INFEZIONE DA P. GALLINACEUM NELL'OSPITE VERTEBRATO.

Si era osservato in questo Laboratorio che la percentuale degli *Aedes albopictus* che risultavano infetti dopo aver succhiato il sangue dei polli inoculati con *P. gallinaceum*, non era sempre in rapporto col numero dei gametociti presenti nel sangue periferico, per cui non riusciva agevole ottenere, nel tempo desiderato, un numero sufficiente di *Aedes* infetti.

Ho pertanto cercato di stabilire, nel modo possibilmente più vicino alla realtà, quale relazione interceda fra il decorso dell'infezione primaria nei polli e la loro infettività per l'insetto vettore, e determinare quindi quale sia il momento più propizio e più adatto per far pungere i polli ed aver in tale maniera una percentuale elevata di zanzare infette.

Per quanto mi consta, nulla di consimile o almeno di così sistematico è stato mai tentato, nè riguardo ai plasmodi umani e delle scimmie, nè ai plasmodi aviari, per cui questa ricerca acquista un valore ben diverso da quello che potrebbe avere un semplice procedimento di tecnica di laboratorio.

Ho eseguito gli esperimenti su due lotti di polli: uno di 12 animali, infettati mediante inoculazione di sangue, l'altro di 9, mediante inoculazione di sporozoiti. Controllavo giornalmente il sangue per sorprendere la comparsa dei parassiti in circolo, e non appena la ricerca aveva esito positivo, facevo pungere ogni giorno i polli e per solito da circa 30 *Aedes albopictus*, che dopo novantasei ore erano dissezionati, per la determinazione della percentuale di stomachi infetti.

Continuavo le ricerche finchè non scorgevo più parassiti in circolo. Solo raramente ho cessato dal far pungere gli animali quando vi erano ancora globuli rossi parassitati nel sangue periferico e ciò avvenne quando le zanzare risultarono negative ormai da parecchi giorni.

In due casi, per i polli inoculati con sangue, ed in cinque, per quelli infettati con sporozoiti, applicai le zanzare qualche giorno (1-5) prima che i parassiti apparissero in circolo.

I risultati ottenuti sono raccolti nei due diagrammi che riporto: l'uno riguardante i polli inoculati con sangue (prima serie di esperimenti), l'altro i polli infettati con puntura di zanzare (seconda serie di esperimenti). Unitamente alle curve della percentuale di stomachi con oocisti, sono i dati che si riferiscono all'andamento dell'infezione (per 1.000 di globuli rossi parassitati) ed al numero dei gametociti (contati rispetto a 100 globuli bianchi): il tutto ricavato dalla media aritmetica dei valori ottenuti in ogni singolo esperimento.

Analizzando i grafici suddetti sorprende il fatto inatteso, che in entrambi le due serie di esperimenti, le zanzare si infettano non appena i parassiti compaiono nel sangue periferico. Infatti non appena riuscivo a trovare un solo globulo rosso parassitato scorrendo per lungo tempo lo striscio, anche se l'esame era apparentemente negativo per i gametociti, le zanzare s'infettavano.

Appare evidente da questi risultati, che i gametociti del *P. gallinaceum* maturano parallelamente alle forme schizogoniche e questo avviene sia che si determini l'infezione inoculando sangue infetto, sia inoculando sporozoiti: se una differenza esiste, questa deve essere unicamente numerica.

Poichè il reperto negativo dei parassiti in circolo, non esclude affatto la loro esistenza nel sangue periferico, ho cercato di vedere, come ho già detto, se gli insetti vettori riuscissero ad infettarsi allorchè nel sangue periferico stesso non si riscontrano, coi nostri mezzi di indagine, non solo i gametociti ma neppure forme del ciclo schizogonico: questi tentativi hanno sempre avuto esito negativo.

Ricordo qui, a titolo di confronto, alcuni dati ricavati dalla letteratura e che si riferiscono però in gran parte solo a *P. vivax*, di cui i casi riferiti riguardano forme di terzana indotta sperimentalmente mediante puntura di zanzare.

Già nel 1899, Bastianelli e Bignami ⁽¹⁾ riscontrarono forme sessuali nel sangue circolante di un giovane, che si trovava al 4° o al 5° giorno dall'inizio della malattia: vari *A. maculipennis*, fatti pungere sul paziente nello stesso giorno, presentarono le oocisti nello stomaco.

James ⁽²⁾ afferma di non essere mai riuscito a trovare i gametociti prima del 7° giorno dalla comparsa della febbre e che solamente dopo dieci giorni dal primo attacco, i pazienti diventano infettanti per le zanzare che li pungono.

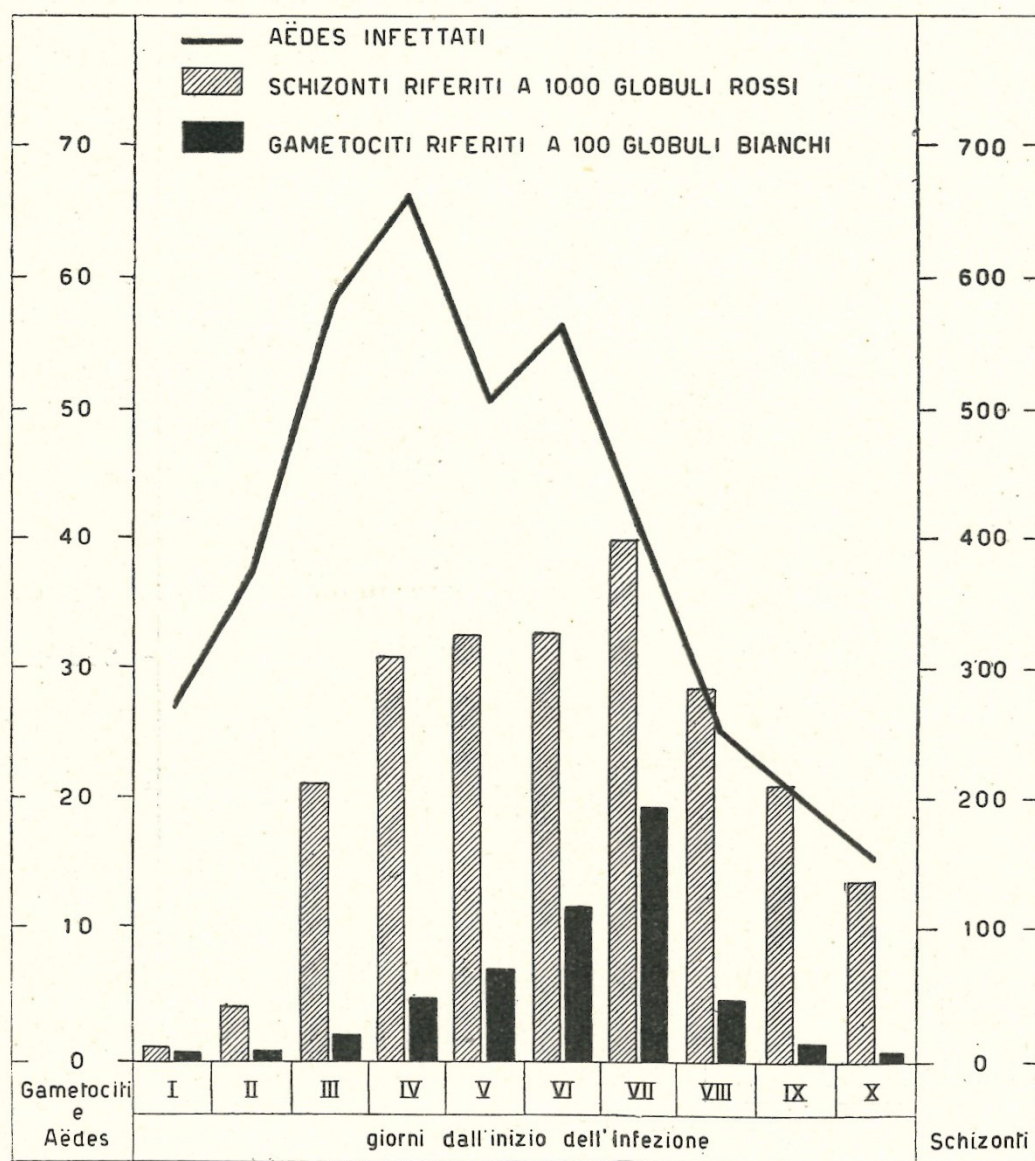


FIG. 1.

Boyd ⁽³⁾ invece sarebbe riuscito ad ottenere zanzare infette applicandole su di un malato al 3° giorno dopo la prima dimostrazione dei parassiti.

Dai protocolli di questo Laboratorio risulta che al 9° giorno dalla comparsa dei parassiti, 3° da quello delle semilune nel sangue di un paralitico infettato con un ceppo tropicale di *P. immaculatum*, si potè riscontrare il 6,6 % (2 su 30) di zanzare (*Anopheles maculipennis* var. *atroparvus*) con oocisti, mentre nei giorni precedenti il risultato era sempre stato negativo.

Quanto alla semplice comparsa dei gametociti in circolo, Wenyon (⁴) scrive che nella terzana benigna naturale essa non si ha abitualmente che fra il 10°-14° giorno dopo l'attacco iniziale. Mosna (⁵), in paralitici infettati mediante inoculazione di sangue o di sporozoiti di *P. vivax*, ha riscon-

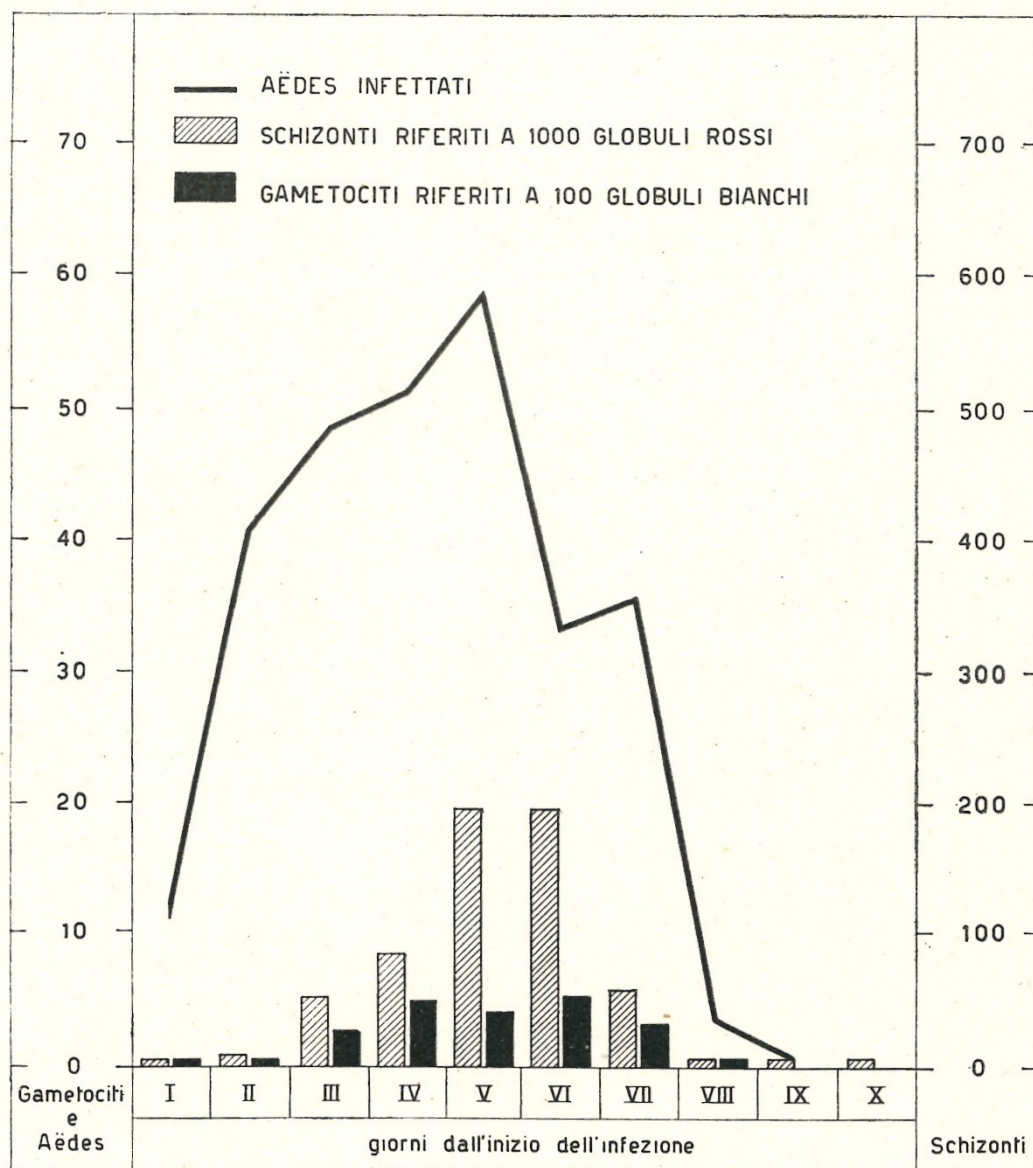


FIG. 2.

trato le forme sessuali prima del 5° giorno di malattia, rispettivamente nell'II e nel 13 % dei casi esaminati.

Nell'estivo-autunnale i gametociti non si vedono comunemente prima del 6°-7°-10° giorno [Mühlens (⁶) Boyd (³) Mosna (⁷)], mentre nella quartana la produzione di gametociti non è stata osservata che parecchi mesi dopo l'attacco primario [Boyd (³)].

E' palese, come si nota, la diversità fra ciclo di evoluzione e di maturazione delle forme sessuali nel *P. gallinaceum* e nei plasmodi umani: in-

fatti, mentre in questi i gametociti compaiono in circolo dopo un certo numero di schizogonie, vario secondo la specie considerata, e non sempre, anzi eccezionalmente, le zanzare possono infettarsi pungendo subito l'uomo, poichè è necessario un periodo più o meno lungo affinchè le forme maturino, tutto ciò non avviene per il *P. gallinaceum*. In quest'ultimo i gametociti compaiono contemporaneamente alle forme del ciclo schizogonico e, a differenza di ciò che si verifica per i gametociti dei plasmodi umani, sono già maturi, cosicchè, se gli animali vengono punti dall'insetto vettore, questo può infettarsi.

Tali risultati, oltre a fornire un dato del tutto nuovo, confermano pienamente il pensiero di Grassi ⁽⁸⁾ riguardo al significato della produzione dei gametociti e cioè che la loro comparsa non è affatto legata ad un processo immunitario che si va stabilendo nell'organismo, ma è invece un fenomeno ereditario.

Questi dati mettono in evidenza come anche per il problema della maturazione dei gametociti e dell'infettabilità degli insetti vettori esistono notevoli differenze di comportamento biologico nelle diverse specie di plasmodi. Pertanto i risultati riferibili ad una specie non sono senz'altro applicabili ad un'altra, ma è necessario indagare separatamente il comportamento di ciascuna.

Il numero delle zanzare che s'infettano cresce con l'avanzare dei giorni dell'infezione e raggiunge rapidamente il suo acme al 4° giorno dalla comparsa dei parassiti nei polli inoculati con sangue (Fig. 1), al 5° nei polli infettati mediante sporozoiti (Fig. 2).

Dall'esame delle due curve si rileva che nel complesso il loro comportamento è assai simile; c'è da notare soltanto che nella prima serie di esperimenti il vertice ha un valore più alto che nella seconda. Si osserva inoltre che circa 24 ore dopo la prima elevazione se ne determina un'altra, molto meno accentuata e sul cui preciso significato non ho dati sufficienti per trarne deduzioni esatte.

Le curve ridiscendono poi rapidamente, per raggiungere lo 0 al 9° giorno nel lotto dei polli inoculati con sporozoiti, mentre per quelli inoculati con sangue il coefficiente angolare della curva stessa decresce con maggiore lentezza, mantenendo valore abbastanza elevato ancora al 10° giorno. In un solo caso, fra questi ultimi, ho potuto infettare le zanzare sino all'11°

e 12° giorno, in cui ottenni una percentuale rispettivamente dell'8,3 e del 7,6 % di *Aedes* infetti con scarsissime oocisti nello stomaco: il pollo morì in 12ª giornata e quindi la prova terminò. Dopo tale limite anche il diagramma della prima serie di esperienze arriva allo 0.

Pure in un solo caso ho continuato l'esperimento sino al 26° giorno dall'inoculazione con sangue, 18° dalla comparsa dell'infezione, essendo negativo il reperto nel sangue periferico ormai da 8 giorni: le zanzare, dopo la scomparsa dei parassiti, non s'infettarono più.

La percentuale delle zanzare infette nella prima serie di esperimenti è notevolmente alta (quasi 30%) già dal 1° giorno: credo però che tale valore dovrebbe essere in realtà abbassato, perchè in due casi riuscii ad infettare con alta percentuale le zanzare sino dal 2° giorno dopo la inoculazione di sangue. Non feci pungere prima, poichè erroneamente ritenni a priori che il risultato fosse negativo; d'altronde in questi casi, con periodo d'incubazione così ridotto, non potevo sceverare quali gametociti fossero effettivamente maturati nel nuovo ospite e quali invece potessero essere ancora del pollo donatore.

Nei polli della prima serie, la curva che esprime la percentuale delle zanzare che si infettano raggiunge il suo apice due giorni avanti a quella che esprime l'intensità dell'infezione e che tocca il suo acme al sesto giorno, in cui si osserva il massimo numero di gametociti.

Le curve hanno presso a poco un decorso irregolarmente parallelo; solo però, come si è detto, quella della percentuale delle zanzare infette precede di due giorni la curva del numero dei parassiti in circolo e quella del numero dei gametociti: quindi il massimo dell'infettività per le zanzare non corrisponde al massimo dell'infezione nel pollo.

Nei polli della seconda serie non vi è invece questa divergenza, questo sfasamento delle curve; l'andamento dell'una corrisponde perciò ad un dipresso a quello delle altre: quindi in quegli animali, in cui l'infezione avviene per una via simile alla naturale, vi è una certa dipendenza tra grado dell'infezione stessa, numero di gametociti e percentuale delle zanzare che s'infettano.

I gametociti compaiono in circolo subito (in un caso li ho riscontrati sin dal 1° giorno dell'infezione, al 2° sono numerosi i casi in cui li ho potuti vedere) e pur mantenendosi in numero molto basso, danno nelle zanzare i massimi di infettività: vale così probabilmente anche per i ga-

metociti di *P. gallinaceum* quello che James (⁹) afferma per i gametociti dei plasmodi umani e cioè che il loro quantitativo non ha tanta importanza come la loro qualità.

Per ciò che riguarda il grado dell'infezione delle zanzare, il numero cioè di oocisti presenti nella parete dello stomaco, non ho la possibilità di trarre conclusioni sicure. Dai miei esperimenti mi sembra di poter dedurre che il massimo grado dell'infezione si ha nei primi giorni (3°, 4°, 5°), senza che vi sia netta relazione tra numero dei gametociti presenti nel sangue del pollo e numero delle oocisti che si sviluppano, cosicchè nessuna sicura previsione si può fare riguardo all'intensità dell'infezione considerando soltanto il numero dei gametociti riscontrati.

Vi sono infatti molteplici casi in cui, con scarsi, talora scarsissimi gametociti, ho ottenuto infezioni veramente cospicue (la parete stomacale era letteralmente coperta dalle oocisti); mentre invece altre volte, pur abbandonando le forme sessuate, il numero delle oocisti è risultato affatto esiguo. E' presumibile che i gametociti di *P. gallinaceum* maturino precocemente e conservino per breve tempo la proprietà di svilupparsi nell'ospite intermedio.

CONCLUSIONI.

1) I gametociti di *P. gallinaceum* compaiono in circolo contemporaneamente alle forme schizogoniche, sia nei polli inoculati con sangue che con sporozoiti.

2) Gli *Aedes albopictus* si possono infettare sino dal primo giorno della comparsa dei parassiti nel sangue periferico.

3) Il massimo grado d'infettività per gli *Aedes* si ha al 4° giorno dell'infezione nei polli inoculati con sangue, al 5° in quelli inoculati con sporozoiti.

4) Non ho osservato una precisa relazione fra il numero dei gametociti presenti in circolo e il grado d'infezione delle zanzare.

5) E' probabile che i gametociti di *P. gallinaceum* maturino precocemente e conservino per breve tempo la loro capacità di evolversi nell'ospite intermedio.

RIASSUNTO

L'A., sperimentando su polli infettati con *P. gallinaceum* mediante inoculazione di sangue e su quelli infettati mediante inoculazione di sporozoi, ha studiato quale relazione interceda fra il decorso dell'infezione, il numero dei gametociti presenti in circolo e l'infettività degli animali per gli *Aedes albopictus*.

In base ai suoi esperimenti conclude che le zanzare possono infettarsi sino dal 1° giorno della comparsa in circolo dei parassiti e che il massimo dell'infettività si ha al 4° giorno nei polli inoculati con sangue e al 5° in quelli inoculati con sporozoi.

SUMMARIUM

In pullis gallinaceis *Plasmodium gallinaceum* infectis, quorum alteris sanguis, alteris sporozoitae inoculati essent, Auctor experimentis perscrutatus est quatenus congruentia ac necessitudo esset inter infectionis decursum et numerum gametocytorum in circolo praesentium; praeterea quatenus *Aedes albopictus* infici possent.

Ex his experimentis concluditur, *Aedes* infici posse iam inde a primo die, quo die parassiti compareant in circolo; ad maximum vero infectivitatis in pullis, qui sanguine, quarto, in pullis qui sporozoitis inoculati fuerint quinto die perveniri.

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

BIBLIOGRAFIA

(¹) BASTIANELLI G. e BIGNANI A., « Sullo sviluppo dei parassiti della terzana nell'*Anopheles claviger* », Ann. d'Ig., 9, 272-293 (1899).

(²) JAMES S. P., « Some general results of a study of induced malaria in England », Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 24, 477-588 (1931).

(³) BOYD M. F., « Observations on naturally induced malaria », South Med. J., 27, 155-159 (1934).

(⁴) WENYON C. M., « Protozoology », Baillière, London (1926).

(⁵) MOSNA E., « Sulla malaria indotta da *Plasmodium immaculatum* (*falciparum*) ceppo etiopico e ceppo campagna romana », Riv. di Parassitol., 2, 275-287 (1938).

(⁶) MUEHLENS P., « Die *Plasmodiden* », Handbuch der pathogenen Protozoen. Prowazeck, Leipzig, 1421-1636 (1921).

(⁷) MOSNA E., « Caratteristiche della curva termica in rapporto al numero dei parassiti malarigeni », Riv. di Malariol., 17, 20-28 (1938).

(⁸) GRASSI G. B., « Studi di uno zoologo sulla malaria », R. Acc. Lincei, Mem. Classe di scienze fisiche nat. e mat., 3, 299-511 (1900).

(⁹) JAMES S. P., « Epidemiological results of a laboratory study of malaria in England », Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 20, 143-165 (1926).

