

40. Augusto CORRADETTI. — Particolari fenomeni immunitari nell'infezione da *Plasmodium berghei*.

**Riassunto.** — Il *Plasmodium berghei* trasmesso al ratto mediante inoculazione di sangue non produce recidive e l'infezione negli animali che sopravvivono, si estingue in un periodo che varia da meno di 28 giorni a un massimo di 50 giorni dopo la cessazione dell'attacco primario. Spenta spontaneamente l'infezione, permane uno *stato immunitario in assenza di parassiti* (distinto quindi dalla premunizione) che risulta sufficiente a prevenire la reinfezione con ceppo omologo per un periodo di almeno 205 giorni dalla cessazione dell'attacco primario. Tale grado di immunità acquisita è mantenuto in gran parte dalla milza, come dimostra il fatto che la splenectomia permette l'attecchimento di una successiva reinoculazione con ceppo omologo. In assenza della milza la reinoculazione produce lo stabilirsi di un'infezione cronica con positività del sangue periferico della durata di fino a 220-255 giorni dalla reinoculazione: tuttavia, anche dopo l'eliminazione della milza, l'apparato reticolo endoteliale esistente in altri organi riesce ancora a elaborare un'immunità acquisita di grado sufficiente talvolta a stroncare la reinfezione, e comunque a far sì che la reinfezione non risulti mortale.

**Résumé.** — Le *Plasmodium berghei*, transmis au rat par inoculation de sang, ne produit pas de rechutes et l'infection, dans les animaux survivants, s'éteint dans un laps de temps variant entre moins de 28 jours et un maximum de 50 jours après la cessation de l'attaque primaire. Après l'extinction spontanée de l'infection, persiste un *état immunitaire en absence de parasites* (qui est pourtant à distinguer de la prémunition), qui se révèle suffisant pour prévenir la réinfection par une souche homologue, pendant une période de temps de 205 jours au moins à partir de la cessation de l'attaque primaire. Ce degré d'immunité acquise est maintenu en grande partie par l'action de la rate, ainsi que le démontre le fait que la splénectomie permet le développement d'une infection par ré-inoculation successive d'un souche homologue. Dans l'absence de la rate, la ré-inoculation produit l'établissement d'une infection chronique, avec manifestation positive du sang périphérique, d'une durée jusqu'à 220-225 jours à partir de la ré-inoculation. Toutefois, même après l'ablation de la rate, le système réticulo-endothélial existant en d'autres organes parvient encore à élaborer une immunité acquise à un degré suffisant pour interrompre la réinfection et en tout cas pour faire en sorte que la réinfection ne soit pas mortelle.

**Summary.** — *Plasmodium berghei*, transmitted to the rat through blood injection, does not produce relapses, and in surviving animals the infection lasts for a period varying between less than 28 days and a maximum of 50 days, after the end of the primary attack. After the spontaneous extinction of the infection a *state of immunity without parasites* (distinct from premunition) persists. Such a state is sufficient to prevent reinfection with the homologous strain for a period of at least 205 days from the end of the primary attack. This degree of acquired immunity is maintained mostly by the spleen, as demonstrated by the fact that splenectomy allows a reinfection with a successive reinoculation of the homologous strain. In absence of the spleen, the reinoculation produces a chronic infection with positivities of the peripheral blood which last 220-225 days from the reinoculation: even after the spleen elimination, however, the reticulo-endothelial system, existing in other organs, still elaborates an acquired immunity, sometimes sufficient to stop the reinfection and, in all cases, to prevent death from reinfection.

**Zusammenfassung.** — *Plasmodium berghei*, durch Blutinjektion auf Ratten übertragen, verursacht keine Rezidiven und erlischt in den überlebenden Tieren innerhalb weniger als 28 bis zu einem Maximum von 50 Tagen nach Beendigung des primären Anfalls. Nach spontanem Erlöschen der Infektion verbleibt im Organismus ein immunitärer Zustand in Abwesenheit von Parasiten (der somit verschieden vom premunitären Zustand ist) der genügend wirksam ist um eine erneute Infektion durch homologe Plasmodien für eine Dauer von wenigstens 205 Tagen nach Genesung nach dem primärem Anfall zu verhindern. Diese erworbene Immunität hat ihren Sitz in der Milz, was aus der Tatsache hervorgeht dass nach Extirpation der Milz eine erneute Infektion mit homologen Plasmodien möglich wird. In den Tieren in welchen die Milz extirpiert wurde verursacht die erneute Injektion der Plasmodien eine chronische Infektion, mit positivem peripherischen Blut, die bis 220-225 Tagen nach der erneuten Inokulation andauert; doch nach der Entfernung der Milz ist der in den anderen Organen bestehende endoteliale Apparat immer noch fähig eine erworbene Immunität zu bewerkstelligen, die manchmal sogar die erneute Infektion erfolgreich bekämpfen kann, jedenfalls aber einen letalen Ausgang der Reinfektion verhindert.

---

Nella presente nota si comunicano alcuni fatti relativi all'immunologia nell'infezione da *Plasmodium berghei*. Tali fatti sono stati rilevati nel corso di una serie di ricerche organiche sulla patologia e immunologia dell'infezione da questo plasmodio, eseguite su oltre 250 ratti.

Numerose osservazioni e ricerche condotte su altre specie di plasmodi dell'uomo e degli animali hanno dimostrato i seguenti fatti, oggi universalmente accettati:

1) il decorso di un'infezione da plasmodi si effettua secondo il seguente schema: a un periodo di incubazione segue un periodo di infezione parassitaria manifesta che comprende il tempo durante il quale il parassita può essere dimostrato nel sangue con la tecnica microscopica; si ha successivamente un periodo di infezione parassitaria latente, durante il quale gli ordinari metodi di laboratori possono rivelare la presenza dei parassiti solo saltuariamente; a questo periodo di latenza, di durata più o meno lunga a seconda delle specie, può seguire una o più recidive;

2) finchè il parassita è presente nell'organismo ospite, sia pure in forma latente, si ha una immunità alla superinfezione con lo stesso ceppo di plasmodio. Tale immunità si attenua e scompare in genere poco tempo dopo l'estinzione dell'infezione;

3) la splenectomia effettuata durante il periodo di latenza produce invariabilmente una moltiplicazione dei parassiti e quindi una recidiva.

L'infezione da *P. berghei* nel ratto non appare seguire in tutto queste leggi generali, ed è per richiamare l'attenzione sul particolare comportamento di questo plasmodio che vien comunicata la presente nota.

#### MATERIALE E TECNICA

Il ceppo di *P. berghei* usato nei presenti esperimenti è stato gentilmente fornito al nostro laboratorio da uno dei suoi scopritori, il dott. I. H. VINCKE, che lo ha isolato da un roditore selvaggio dei dintorni di Elisabethville (Congo belga). Tale ceppo viene mantenuto nel nostro laboratorio in ratti albinici con successivi passaggi da ratto a ratto mediante inoculazione di sangue.

Tutti i ratti relativi ai presenti esperimenti sono i sopravvissuti dall'attacco primario tra oltre 250 ratti infettati. Essi sono stati seguiti con esami quotidiani di sangue per tutta la durata (talvolta superiore a un anno) dell'esperimento stesso. Tutti gli animali sono stati seguiti fino alla morte spontanea, tranne alcuni tuttora viventi, per i quali nelle tabelle è stato specificato che l'osservazione continua.

Gli esperimenti relativi alla presente nota possono essere riuniti nei tre seguenti gruppi:

1) ratti splenectomizzati a varia distanza di tempo dalla fine dell'attacco primario e seguiti con esami quotidiani di sangue fino alla morte spontanea (10 ratti);

RATTI SPLENECTOMIZZATI A DISTANZA DI TEMPO DALLA FINE DELL'ATTACCO PRIMARIO E SEGUITI CON ESAMI QUOTIDIANI DI SANGUE FINO ALLA MORTE

Numero del ratto	Durata dell'attacco primario (in giorni)	Durata del periodo di negatività tra attacco primario e splenectomia (in giorni)	Durata del periodo di osservazione del sangue dopo la splenectomia (in giorni)	Periodo seguente alla splenectomia. Risultato degli esami di sangue	Osservazioni
15	11	103	245	negativo	
17	18	122	213 (*)	negativo	(*) l'osservazione continua
21	9	111 (a)	226 (*)	negativo	(a) un parassita nello striscio fu osservato ai giorni 22°, 48° e 50° di questo periodo (*) l'osservazione continua
23	12	110 (b)	168	negativo	(b) un parassita fu osservato al 22° giorno di questo periodo
27	17	98	6	negativo	
38	18	62 (c)	27	negativo	(c) un parassita fu osservato al 28° giorno di questo periodo
39	14	59	7	negativo	
40	17	56	8	negativo	
45	9	45	7	negativo	
46	21	28	12	negativo	

2) ratti non splenectomizzati e reinoculati con lo stesso ceppo di plasmodio a varia distanza di tempo dalla fine dell'attacco primario (11 ratti);

3) ratti splenectomizzati a distanza di tempo dalla fine dell'attacco primario e successivamente reinoculati con lo stesso ceppo di plasmodio (3 ratti).

#### PRIMO GRUPPO DI ESPERIMENTI

Dieci ratti che avevano subito un attacco primario variato da 9 a 21 giorni sono stati tenuti in osservazione con quotidiani esami di sangue per periodi variati da 28 a 122 giorni. Sette di questi ratti non presentarono mai parassiti in questo periodo. Negli altri tre ratti si ebbero osservazioni sporadiche di un parassita, in uno al 22° giorno, in un altro al 28° giorno, e nel terzo tre volte (al 22°, al 48° e al 50° giorno): l'estremo limite in cui un parassita è stato osservato nel sangue è stato, nei presenti esperimenti 50 giorni dopo la cessazione dell'attacco primario.

Dopo periodi variati, come si è detto, da 28 a 122 giorni si è eseguita la splenectomia, e si è quindi continuata l'osservazione dei ratti con esami di sangue quotidiani fino alla morte avvenuta in periodi variati da 6 a 245 giorni dopo la splenectomia.

I dati relativi a ciascun ratto e i risultati ottenuti sono espressi nella tabella 1. Come risulta dalla tabella, tutti i ratti splenectomizzati sono rimasti costantemente negativi per tutto il periodo di osservazione successivo alla splenectomia.

#### SECONDO GRUPPO DI ESPERIMENTI

Undici ratti che avevano subito un attacco primario variato da 8 a 21 giorni sono stati tenuti in osservazione con quotidiani esami di sangue per periodi variati da 7 a 205 giorni. Dieci di questi ratti non presentarono mai parassiti in questo periodo. Nell'undicesimo fu osservato una volta un parassita al 49° giorno dalla fine dell'attacco primario.

Dopo questo periodo di osservazione si è proceduto a reinoculare i ratti con lo stesso ceppo di plasmodio.

I dati relativi a ciascun ratto e i risultati ottenuti sono espressi nella tabella 2. Dalla tabella risulta che sette degli undici ratti sono rimasti negativi dopo la reinoculazione, e uno di essi è restato negativo anche dopo una seconda reinoculazione; gli altri quattro ratti hanno dimostrato scarsissimi parassiti nel sangue per 3-5 giorni con successiva loro scomparsa definitiva; quattro ratti di controllo invece, inoculati con lo stesso sangue dei ratti in esperimento, si sono tutti infettati dimostrando un tipico decorso di infezione primaria da *P. berghei*.

RATTI REINOCULATI CON SANGUE INFETTO DA P. BERGHEI  
A DISTANZA DI TEMPO DALLA FINE DELL'ATTACCO PRIMARIO

(per tutti i ratti di questa tabella l'osservazione continua)

Numero del ratto	Durata dell'attacco primario (in giorni)	Durata del periodo di negatività tra attacco primario e reinoculazione (in giorni)	Esito della reinoculazione	Osservazioni
66	19	205	negativo	
72	8	170	negativo	
74	17	166	negativo	
103	13	152	debole positività transitoria (5 giorni)	
106	15	154	debole positività transitoria (4 giorni)	
107	16	153	debole positività transitoria (3 giorni)	
108	15	154	negativo	
109	15	125	negativo (*)	(*) Reinoculato ancora 14 giorni dopo con esito ugualmente negativo
115	16	109	debole positività transitoria (3 giorni)	
143	21	69(*)	negativo	(*) fu riscontrata la presenza di un parassita nello striscio al 49° giorno di questo periodo
149	19	67	negativo	

Nota. — I ratti 202, 210, 211, 212, controlli inoculati con lo stesso sangue usato per le reinoculazioni, si sono tutti infettati e hanno avuto un decorso tipico di infezione primaria da *P. berghei*.

RATTI SPLENECTOMIZZATI A DISTANZA DI TEMPO DALLA FINE DELL'ATTACCO PRIMARIO E SUCCESSIVAMENTE REINOCULATI CON SANGUE INFETTO DELLO STESSO PLASMODIO

Numero del ratto	Durata dell'attacco primario (in giorni)	Durata del periodo di negatività tra attacco primario e splenectomia (in giorni)	Durata del periodo di osservazione del sangue dopo la splenectomia, fino alla reinoculazione (in giorni)	Periodo seguente la splenectomia. Risultato degli esami di sangue	Durata del periodo di osservazione del sangue dopo la reinoculazione (in giorni)	Esito della reinoculazione
4	20	109	23	negativo	220	Positivo. Lunghi periodi di positività per tutto il decorso. Morto positivo 220 giorni dopo la reinoculazione.
8	11	111	22	negativo	106	Positivo. La positività è durata per circa 4 settimane dopo la reinoculazione: l'animale è quindi sopravvissuto oltre 10 settimane, rimanendo sempre negativo.
9	12	79	21	negativo	255	Positivo. La positività è continuata quasi costante per i 255 giorni. L'osservazione continua.

TERZO GRUPPO DI ESPERIMENTI

Tre ratti che avevano subito un attacco primario variato da 11 a 20 giorni sono stati tenuti in osservazione con quotidiani esami di sangue per periodi variati da 79 a 111 giorni. Nessuno di essi presentò mai parassiti nel sangue in questo periodo.

Ciascun ratto fu quindi splenectomizzato e tenuto successivamente in osservazione con esami quotidiani di sangue per 21-23 giorni, durante i quali i parassiti non comparvero mai nel sangue in nessuno di essi.

I tre ratti furono quindi reinoculati con lo stesso ceppo di plasmodio. I dati relativi a ciascun ratto e i risultati ottenuti sono espressi nella tabella 3. Da essa si rileva che le tre reinoculazioni risultarono tutte positive e che in due ratti la positività è risultata quasi costante per periodi di osservazione di 220-255 giorni, mentre nel terzo la positività è durata circa 4 settimane, dopo di che l'animale, sopravvissuto oltre 10 settimane, è risultato sempre negativo.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Dal complesso degli esperimenti eseguiti risulta che nei ratti che sopravvivono all'attacco primario, e indipendentemente dalla sua durata, si ha in genere una rapida scomparsa totale del *P. berghei* dal corpo del ratto. Ciò viene dimostrato dalla negatività totale di 20 su 24 ratti studiati: tale negatività totale si è verificata in periodi di osservazione che si sono estesi fino a 205 giorni dalla fine dell'attacco primario. Nei rimanenti quattro ratti si è avuta complessivamente l'osservazione di 6 parassiti nello striscio entro i primi 50 giorni dalla cessazione dell'attacco primario. Il 50° giorno dalla cessazione dell'attacco primario viene ad essere quindi il limite estremo in cui, nei presenti esperimenti, è stato ancora possibile osservare la persistenza del parassita nel corpo dell'ospite.

Che la scomparsa dei parassiti sia reale e non apparente è dimostrato dai risultati delle splenectomie che in nessuno dei 13 ratti splenectomizzati hanno dato origine a recidive, neppure nei casi in cui, come nei ratti 45 e 46 la splenectomia è stata eseguita prima che trascorressero 50 giorni dalla cessazione dell'attacco primario. La mancata insorgenza di recidive nei ratti splenectomizzati è una prova che l'infezione era totalmente spenta nell'ospite.

La reinoculazione eseguita, in ratti non splenectomizzati con lo stesso ceppo di plasmodio, 67-205 giorni dopo la cessazione dell'attacco primario, in un periodo cioè in cui, per quanto si è ora detto, l'infezione era presumibilmente spenta, ha dato esito negativo o una debole positività transitoria di 3-5 giorni. Ciò dimostra la persistenza di uno stato immunitario al ceppo omologo in assenza di parassiti, che nei casi estremi dei ratti 66, 72, 74 si è esplicita dopo 166-205 giorni dalla cessazione dell'attacco primario senza che in tutto questo periodo si fosse mai riscontrato un parassita nel sangue periferico, rivelandosi sufficiente a impedire l'attecchimento della reinfezione.

La reinoculazione in ratti splenectomizzati ha invece avuto esito positivo, il che dimostra l'importanza della milza nella produzione e nel mantenimento dello stato immunitario. E' importante tuttavia notare che, anche in assenza della milza, era presente uno stato immunitario sufficiente a evitare che la reinfezione fosse mortale, e che, malgrado l'assenza della milza, un ratto (il n. 8) è stato in grado di vincere definitivamente anche la seconda infezione. Negli altri due ratti (n. 4 e 9) si è istituito un particolare stato di equilibrio tra parassita e ospite caratterizzato da una positività quasi costante del sangue per tutto il decorso successivo.

CONCLUSIONI

Concludendo, dal complesso delle ricerche possono dedursi i seguenti risultati:

1) il *P. berghei*, trasmesso al ratto mediante inoculazione di sangue infetto, negli animali che sopravvivono, non produce recidive, ma l'infezione si estingue subito dopo la cessazione dell'attacco primario. In qualche raro ratto (4 su 24) i parassiti sono stati occasionalmente osservati fino al 50° giorno dopo la cessazione dell'attacco primario, mentre d'altra parte la splenectomia eseguita in altri ratti anche prima del 50° giorno (precisamente al 28° e al 45° giorno) non ha prodotto la ricomparsa dei parassiti nel sangue periferico. L'estinzione dell'infezione può verificarsi quindi prima del 28° giorno, e, nei limiti del presente esperimento, non c'è alcun segno che perduri al di là del 50° giorno dopo la cessazione dell'attacco primario (\*);

2) spenta l'infezione, permane uno stato immunitario sufficiente a prevenire la reinfezione con ceppo omologo per un periodo variato nei presenti esperimenti da 67 a 205 giorni; tale termine massimo di 205 giorni è relativo ai limiti degli esperimenti eseguiti, e non si esclude possa essere aumentato. Si tratta in questo caso di una immunità *in assenza di parassiti*, distinta quindi da quella descritta in altri plasmodi sotto il nome di *premunizione*, la quale presuppone la persistenza di sia pur piccole quantità di parassiti nel corpo dell'ospite;

3) tal grado di immunità acquisita è mantenuto in gran parte dalla milza, come dimostra il fatto che la splenectomia produce l'attecchimento di una successiva reinoculazione con ceppo omologo. In assenza della milza, la reinoculazione produce lo stabilirsi di un'infezione cronica con positività del sangue periferico, le quali, secondo le presenti osservazioni sono durate fino a 220-255 giorni dalla reinoculazione: la reinfezione non è però risultata mortale, e, in un caso su tre, l'ospite è riuscito ad aver ragione dei parassiti dopo la quarta settimana.

---

(\*) Mentre il presente lavoro era in bozze furono splenectomizzati altri 4 ratti. Due di essi, splenectomizzati rispettivamente 16 e 12 giorni dopo la cessazione dell'attacco primario, non hanno presentato più parassiti nel sangue. Gli altri due, splenectomizzati uno 3 giorni dopo la cessazione dell'attacco primario, e l'altro durante l'attacco primario stesso, hanno invece presentato una immediata moltiplicazione dei parassiti che è risultata in un attacco mortale.

Infine due ratti sono stati subinoculati col sangue di un ratto in cui l'attacco primario era terminato da 3 giorni: in essi l'infezione non ha attecchito.

Di conseguenza il limite inferiore per l'estinzione dell'infezione che nelle conclusioni del presente lavoro è indicato in « meno di 28 giorni » va modificato in « meno di 12 giorni » dalla cessazione dell'attacco primario.

Questi ultimi fatti dimostrano che anche dopo l'eliminazione della milza, l'apparato reticolo endoteliale esistente negli altri organi riesce ancora a elaborare un grado di immunità acquisita sufficiente talvolta a stroncare la reinfezione, e comunque a far sì che la reinfezione non risulti mortale;

4) i risultati ottenuti con il *P. berghei* nel ratto, confrontati con quelli noti per altre specie di plasmodi, dimostrano che le relazioni tra parassita e ospite, anche per quanto si riferisce al comportamento immunitario, sono specifiche per ciascun plasmodio.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Parassitologia.

---