

71. G. GRAMICCIA. — Ricerche sulla infezione degli embrioni di pollo con *Plasmodium gallinaceum*. — Nota II.

Riassunto. — Le infezioni degli embrioni di pollo con sangue infetto da *P. gallinaceum* riescono costantemente solo se viene usato sangue infetto prelevato da un animale che presenti una infezione endoistocitaria negli organi interni. Altrimenti la inoculazione, anche se eseguita per via endovenosa dà solo eccezionalmente un risultato positivo. Si descrive la tecnica seguita per le inoculazioni.

Résumé. — L'infection des embryons de poulet au moyen de sang infecté de *P. gallinaceum* a un succès constant, seulement si l'on fait usage de sang infecté prélevé d'un animal qui présente en même temps une infection endohystiocyttaire dans les organes intérieurs. Autrement l'inoculation, même par voie intraveineuse, ne donne qu'exceptionnellement un résultat positif. L'A. décrit la technique suivie pour les inoculations.

Summary. — Infection of chicken embryos by means of inoculation of blood infected by *P. gallinaceum* is consistently successful only if the infected blood is drawn from an animal that presents e.-E. forms in its internal organs. Otherwise the inoculation, even when performed intravenously, gives but occasionally a positive result. The technique followed for the inoculations is described.

Zusammenfassung. — Die Infektionen der Hühnerembryos, durch *P. gallinaceum* infiziertes Blut verursacht, sind nur dann stets erfolgreich wenn das Blut von einem Tier abgenommen wird, das in seinen inneren Organen eine endohistiozytäre Infektion aufweist. Sonst, wenn die Infektion auch durch intravenöse Injektion hervorgerufen wird, ergibt sie nur ausnahmsweise einen positiven Erfolg. Es wird die hier befolgte Technik der Impfung beschrieben.

Nella nota precedente ⁽¹⁾ si metteva in evidenza la diversità e la incostanza dei risultati ottenuti dai vari ricercatori e da noi stessi nelle inoculazioni degli embrioni di pollo con *P. gallinaceum*, e si facevano alcune ipotesi circa le possibili spiegazioni dei risultati controversi.

⁽¹⁾ G. RITA e G. GRAMICCIA, Rend. Ist. Sup. Sanità, 11, 103 (1948).

Dall'esame della letteratura, riportata nella nota precedente, e degli ultimi lavori che è stato possibile consultare, cioè quelli di Haas e collaboratori ⁽²⁾, di Fonseca e coll. ⁽³⁾ e di Zuckerman ⁽⁴⁾, risalta il fatto che le infezioni dell'embrione di pollo con *P. gallinaceum* sono state ottenute:

1) mediante inoculazione o deposizione di sporozoitii o mediante puntura di *Aedes* infette sulla membrana chorion-allantoidea;

2) mediante deposizione sulla membrana ch.-a. o mediante iniezione nel sacco vitellino di emulsioni grossolane di organi contenenti forme endoistiocitarie;

3) mediante inoculazione di sangue infetto in un vaso allantoideo, o nel corpo dell'embrione o mediante deposizione di qualche goccia di sangue sulla membrana ch.-a.

Mentre i primi due tipi di inoculazione hanno dato risultati concordemente positivi (anche io ho avuto gli stessi risultati deponendo frammenti di cervello e di fegato con forme endoistiocitarie sulla membrana ch.-a.), con il terzo tipo di inoculazione ottennero lo sviluppo costante di infezione nell'embrione soltanto Haas e coll. (via endovenosa), Zuckerman (via intramuscolare), Fonseca e coll. (via endovenosa); ebbero risultati positivi più o meno incostanti Haas e coll. (8 embrioni positivi su 19 inoculati mediante apposizione di sangue infetto sulla membrana ch.-a.), Rita e Gramiccia (su 10 uova inoculate solo 2 positive, una per apposizione di sangue sulla membrana ch.-a., uno per inoculazione di sangue nel sacco vitellino), Fonseca e coll. (1 risultato positivo su 6 dopo apposizione di sangue sulla membrana ch.-a.); risultati costantemente negativi ebbero Gavrilov e coll. (via endovenosa), Chorine, Rita, Rodhain e Van Den Berge (apposizione o inoculazione di sangue infetto nella membrana ch.-a.), Fonseca e coll. (inoculazione di sangue infetto nel sacco vitellino). Inoltre negli embrioni comunque inoculati con sangue e infettatisi, il reperto di forme endoistiocitarie non fu costante.

Questa diversità di comportamento dopo inoculazione con sangue, paragonata con la costanza dei risultati positivi dopo la inoculazione di

⁽²⁾ V. H. HAAS, A. WILCOX, F. PARK DAVIS, F. MOORE EWING, Pub. Health Rep., 61, 921 (1946).

⁽³⁾ F. FONSECA, F. J. C. CAMBOURNAC, M. R. PINTO, J. M. PEREIRA e A. CUNHA, Parassitology, 37, 113 (1946).

⁽⁴⁾ A. ZUCKERMAN, J. inf. Dis., 79, 1 (1946).

sporozoiti o di frammenti di organi contenenti forme endoistiocitarie, mi ha fatto supporre in un primo tempo che i parassiti endoglobulari trovassero nell'uovo delle difficoltà di ordine non determinato per giungere a contatto con i globuli rossi dell'embrione e continuare il ciclo di sviluppo. Ma i primi risultati negativi ottenuti inoculando endovena nell'embrione il sangue infetto, mi hanno fatto ricredere e mi hanno spinto ad indagare se i risultati positivi e negativi non fossero invece da porsi in rapporto con lo stadio di evoluzione del parassita inoculato.

MATERIALE E TECNICA

Ceppo di P. gallinaceum. — Il ceppo usato è quello mantenuto in questo Laboratorio da oltre 10 anni mediante inoculazioni di sangue in polli o in pulcini. Come è stato dimostrato da Corradetti ⁽⁵⁾ e da Gramiccia e Saccà ⁽⁶⁾ nei polli o nei pulcini inoculati con sangue prelevato all'inizio dell'attacco primario endoeritrocitico, le forme endoistiocitarie compaiono soltanto dopo 11 giorni di infezione palese continua e sufficientemente intensa nel sangue periferico. Se si inocula invece sangue prelevato durante la curva discendente dell'attacco primario endoeritrocitico o emulsione di organi contenenti forme endoistiocitarie, le forme endoistiocitarie compaiono nell'animale subinoculato prima degli 11 giorni consecutivi di positività [Mosna ⁽⁷⁾].

Per ottenere pulcini infetti con forme endoistiocitarie, nelle presenti esperienze si è somministrato ai pulcini, dopo la comparsa dei primi parassiti nel sangue periferico, 2-4 cm³ di soluzione al 0,75% di cloridrato di chinina per via gastrica, in dosi di 1 cm³ alla volta, allo scopo di mantenere l'infezione endoeritrocitaria a un livello che permettesse la sopravvivenza dei pulcini oltre l'11° giorno dall'inizio dell'infezione nel sangue periferico.

Embrioni di pollo. — Sono state usate sempre uova « Rhode Island » forniteci da un allevatore industriale. Esse venivano incubate a 39° C nelle opportune condizioni di umidità e di aereazione.

Il giorno precedente o il giorno stesso dell'inoculazione, nelle uova risultate fecondate alla transilluminazione, previa disinfezione della parte

⁽⁵⁾ A. CORRADETTI, Riv. Parassitologia, 4, 249 (1940).

⁽⁶⁾ G. GRAMICCIA e G. SACCÀ, Rend. Ist. Sup. Sanità, 11, 94 (1948).

⁽⁷⁾ E. MOSNA, Riv. Parassitologia, 4, 241 (1940).

del guscio sotto la quale era stato osservato un grosso vaso allantoideo con tintura di jodo e con alcool, veniva praticata una finestra quadrata di circa 1 cm di lato. Veniva usato a quest'uopo un trapano elettrico da dentista, sul quale era innestata una ruota di « Vulcarbo ». Si aveva cura di incidere soltanto il guscio allo scopo di evitare emorragie, spesso fatali all'embrione, e, dopo i primi tentativi, ciò si ottenne con relativa facilità. Mediante una pinzetta sterile, si distaccava il frammento quadrato del guscio, lasciando allo scoperto, intatta, la membrana testacea. Questa veniva perforata in un angolo con la punta di una sottile pipetta Pasteur contenente un po' di soluzione fisiologica sterile, della quale si facevano penetrare 4-5 gocce allo scopo di distaccare la membrana chorion-allantoidea dalla membrana testacea. Dopo pochi secondi, mediante una forcina ricurva e con l'aiuto di una pinzetta, si ritagliava la membrana testacea lungo i quattro bordi della finestra e si lasciava allo scoperto la membrana ch.-a. A questo punto si usava la precauzione per proteggere l'embrione dalla contaminazione aerea, di porre al disopra dell'uovo, sorretta da un sostegno, una grossa capsula Petri rovesciata, a sufficiente distanza tuttavia da permettere le successive operazioni. Con una bacchetta di vetro si disponeva quindi una miscela a parti uguali di vasellina filante e di paraffina, previamente sterilizzata e poi riscaldata al momento dell'uso fino a fusione, lungo i bordi della finestra, fino a formare una cornice continua sopraelevata ad uno stesso livello. Su questa si disponeva infine un vetrino copri-oggetti, dopo averlo passato rapidamente 3 volte sulla fiamma per meglio sterilizzarlo e per riscaldarlo quanto bastava a permettere una perfetta aderenza con il bordo di paraffina.

L'uovo così preparato veniva quindi riposto in termostato, con la finestra in alto. Esso permetteva una buona visibilità delle condizioni dell'embrione all'interno, e le successive manipolazioni erano rese più facili e rapide. Bastava infatti distaccare dolcemente il coprioggetto, fare le operazioni necessarie e poi riapplicare lo stesso o un altro, previa flambatura, sul bordo di paraffina già spianato dalla precedente apposizione del vetrino.

Tecnica delle inoculazioni. — Ci si è serviti di una siringa da 2 cm³ con un ago da intradermoreazione. Il sangue infetto veniva prelevato dalla vena giugulare di un pulcino infetto di 2-3 settimane di età, e mescolato a parti uguali con una soluzione di citrato di sodio al 3%.

Allorchè si voleva praticare l'inoculazione endovenosa, tolto il coprioggetti, si afferrava dolcemente mediante una pinzetta sottile il vaso allantoideo più grosso e superficiale, e lo si teneva sollevato. Ciò facilitava l'immobilizzazione del vaso e quindi l'introduzione dell'ago. Eseguita l'inoculazione, si ritirava dolcemente l'ago e si lasciava la presa della pinzetta. Molto frequentemente, a questo punto, sopravveniva una emorragia del vaso inoculato, che terminava con la morte dell'embrione. Nelle presenti esperienze, con questa tecnica, si è avuta una mortalità del 74% entro i primi 3 giorni dalla inoculazione.

Quando si voleva invece deporre il sangue infetto sulla membrana ch.-a., esso veniva fatto semplicemente gocciare dall'ago della siringa sopra un punto ben vascolarizzato della membrana stessa. Usando questa tecnica, si è avuta una mortalità del 25% entro i primi 4 giorni dall'inoculazione.

Nel caso delle inoculazioni nel sacco vitellino, non si praticava l'apertura della finestra, ma si forava semplicemente l'apice ottuso dell'uovo, e quindi si introduceva verticalmente, per circa 3 cm, un ago sufficientemente lungo, montato su siringa, e si inoculava il sangue infetto. Tale manovra portava il materiale infettante nell'interno del sacco vitellino.

In tutti e tre i casi, la quantità di sangue inoculato (miscelato con la soluzione di citrato) è stata di $1/10-2/10$ di cm^3 (circa 2-4 gocce).

Il sangue inoculato presentava, nelle diverse esperienze, dal 10% al 50% dei globuli rossi parassitati.

Si è attesa la schiusa dell'uovo per prelevare dal pulcino strisci di sangue; se questo risultava positivo, si uccideva il pulcino e si facevano strisci di cervello, fegato, milza e midollo osseo. Se questo era negativo, si lasciava il pulcino in vita per una settimana, al termine della quale si sacrificava e si esaminava. Gli strisci venivano fissati con alcool metilico (allo stato secco) e in Carnoy (allo stato umido) e colorati col Giemsa.

ESPERIENZE

Si sono allestiti tre tipi di esperienze:

1) Inoculazione endovenosa in embrioni tra l'8° e il 14° giorno di incubazione, di sangue infetto da *P. gallinaceum*, prelevato da pulcini al 4°-6° giorno di positività nel sangue periferico, e che al controllo

microscopico risultarono privi di forme endoistiocitarie negli organi interni, al momento del prelievo del sangue.

2) Inoculazione nel sacco vitellino di embrioni al 9° e al 17° giorno di incubazione, di sangue infetto prelevato da pulcini al 3° e al 7° giorno di positività nel sangue periferico, e che al controllo microscopico risultarono privi di forme endoistiocitarie negli organi interni al momento del prelievo del sangue.

3) Deposizione sulla membrana chorion-allantoidea di embrioni tra il 9° e il 10° giorno di incubazione, di sangue infetto prelevato da pulcini al 12°-15° giorno di positività nel sangue periferico, e che, al momento del prelievo del sangue, risultarono infetti da forme endoistiocitarie negli organi interni.

RISULTATI

La tabella 1 esprime i risultati delle infezioni ottenute.

Vi si rileva che, mentre nel primo tipo di esperienze, su 7 embrioni giunti a svilupparsi, si sono avuti 5 negativi e 1 positivo, nel terzo tipo

TABELLA I.

N. Uova	Giorno della infezione in cui è stato prelevato il sangue infetto	Giorno di incubazione al momento della inoculaz.	Embrioni morti precocemente (entro il 4° giorno)	Uova sviluppate		Forme Endoistiocitarie presenti in pulcini nati infetti
				Positive	Negative	
<i>I. Inoculazione endovenosa di sangue infetto prelevato tra il 4° e il 6° giorno di positività.</i>						
12	6°	10°	7	0	5	0
7	4°	14°	6	0	1	0
8	5°	7°	7	1	0	0
Totali 27			20	1	6	0
<i>II. Inoculazione nel sacco vitellino di sangue prelevato tra il 3° e il 7° giorno di positività.</i>						
9	3°	17°	7	0	2	0
6	7°	9°	2	1	3	0
Totali 15			9	1	5	0
<i>III. Inoculazione mediante deposizione sulla membrana chorion-allantoidea di sangue infetto prelevato da pulcino con forme endoistiocitarie.</i>						
6	15°	10°	3	3	0	1
12	14°	10°	3	8	1 (*)	7
10	12°	9°	2	8	0	1
Totali 28			8	19	1 (*)	9

(*) Embrione morto al 18° giorno di incubazione.

di esperienze, su 19 embrioni pervenuti a sviluppo completo, si sono avuti 19 positivi. Un embrione morto al 18° giorno di incubazione, 8 giorni dopo l'inoculazione, e osservato qualche ora dopo la morte, è risultato negativo. Non si può escludere che la negatività fosse solo apparente e derivasse da troppo scarsa parassitosi o da fenomeni litici post-mortali che impedivano di riconoscere i parassiti.

Tralasciando di considerare le inoculazioni del secondo tipo (nel sacco vitellino), perchè esse offrono troppi fattori di incertezza di risultati, primo fra i quali la possibilità di sopravvivenza e di diffusione dei plasmodi inoculati in un mezzo non organizzato e non vascolarizzato quale è il vitello, ma delle quali tuttavia possiamo dire che, almeno in un caso, l'infezione è stata possibile inoculando sangue prelevato al 7° giorno di infezione, dobbiamo rilevare che gli altri due tipi di esperienze rivelano una profonda differenza di risultati: un solo eccezionale reperto positivo nel primo tipo di esperienza, nonostante la inoculazione endovenosa; un costante reperto positivo nel terzo tipo di esperienza, essendo stato il materiale semplicemente deposto sulla membrana chorion-allantoidea, cioè con minori probabilità di venire in contatto con il sangue e i tessuti del corpo dell'embrione. Ciò dimostra che è nella diversità del materiale infettante inoculato che deve ricercarsi la ragione dei diversi risultati. La diversità del materiale consiste soltanto nel fatto che nel primo tipo di esperienze ci si è serviti di sangue prelevato all'inizio dell'infezione, quando non erano presenti forme endoistiocitarie nel pulcino datore; nell'altro tipo di esperienze, di sangue prelevato dopo 11 giorni di infezione, quando le forme endoistiocitarie erano presenti.

Nella tabella II sono espressi il grado delle infezioni endoglobulari e il reperto delle forme endoistiocitarie nei diversi organi al momento della nascita dei pulcini che avevano subito, allo stadio embrionale, la inoculazione del terzo tipo. I reperti sono stati ottenuti su strisci.

Si nota che:

1) Non c'è rapporto tra l'intensità della infezione endocitocitaria e presenza e intensità dell'infezione endoistiocitaria;

2) Mentre alcuni degli embrioni o dei pulcini presentavano forme endoglobulari e non è stato possibile rinvenire forme endoistiocitarie, non è mai avvenuto il contrario;

3) Le forme endoistiocitarie sono presenti con maggiore frequenza in quei pulcini che non sono stati uccisi al momento della nascita, ma alcuni giorni dopo, quando cioè si è dato modo alla infezione endoe-ritrocitaria di svolgersi per un tempo più lungo;

TABELLA II.

REPERTI DI FORME ENDOISTICITARIE NEI PULCINI NATI INFETTI
(3° tipo di inoculazione).

Pulcini	Parassiti endoe-ritrocitari (% G. R.)	Forme endoeistiocitarie in				Giorno dell'uccisione (dall' inizio dell'incub).
		Fegato	Milza	Cervello	Mid. osseo	
1	100	—	—	—	—	16 ⁰
2	—	—	—	—	—	18 ⁰
3	1	—	—	—	—	19 ⁰
4	150	+++	+++	+++	+	21 ⁰
5	300	(+)	(+)	(+)	—	22 ⁰
6	20	+	+	++	—	22 ⁰
7	900	(+)	(+)	++	(+)	29 ⁰
8	0,5	—	—	(+)	—	21 ⁰
9	150 (*)	+++	+++	+++	++	21 ⁰
10	1	—	—	—	—	18 ⁰
11	10	(+)	(+)	(+)	(+)	23 ⁰
12	200	—	—	—	—	23 ⁰
13	1	—	—	—	—	21 ⁰
14	300	—	—	—	—	21 ⁰
15	900	—	—	—	—	25 ⁰
16	3	—	—	—	—	21 ⁰
17	900	+++	+++	+++	+	25 ⁰
18	850	—	—	—	—	25 ⁰
19	700	—	—	—	—	21 ⁰
20	50	—	—	—	—	21 ⁰

(*) = presenza di forme endoistiocitarie libere nel sangue periferico; forme apigmentate in eritroblasti basofili.

+++ = più di una forma endoistiocitaria per campo microscopico.

++ = una forma endoistiocitaria per campo microscopico.

+

(+) = rarissime forme endoistiocitarie.

— = assenza di forme endoistiocitarie (dopo osservazione di 15').

4) Le forme endoistiocitarie nel midollo osseo sono notevolmente più scarse che non nel cervello, fegato, milza, nei quali organi la presenza di tali forme è quasi equivalente, con una lieve prevalenza nel cervello, in alcuni casi.

In tutti i pulcini nati infetti si è confermata, per quanto in modo vario, in taluni casi accentuatissima, in altri meno, la particolare morfologia dei parassiti endoglobulari, descritta nella prima Nota; e cioè la

presenza di un grosso vacuolo a stampo, entro il quale è raccolto il pigmento, particolarmente evidente nelle forme adulte (schizonti e gametociti).

In un solo pulcino si è constatata la presenza di forme schizogoniche endoistiocitarie, apparentemente libere negli strisci di sangue periferico. E' un reperto eccezionalmente raro nelle infezioni da *P. gallinaceum* [vedi anche Mosna ⁽⁸⁾] e lo segnalo per questa ragione. Nello stesso pulcino sono stati anche osservati nel sangue periferico e nel midollo osseo, rari trofozoiti apigmentati, già abbastanza sviluppati, in eritroblasti intensamente basofili.

Non sono state mai osservate forme di sviluppo del *P. gallinaceum* in mielociti, nè in leucociti di ogni sorta del sangue circolante, nè in ogni tipo di cellula immatura della serie rossa (con l'eccezione sopra riferita), al contrario di ciò che afferma Zuckerman ⁽⁴⁾. Nel midollo osseo, e talvolta anche nel sangue circolante, di pulcini appena nati si osserva una notevole abbondanza di granulazioni (azzurrofile?) rotonde nel citoplasma di mielociti e di cellule monocitoidi che per la loro regolarità, dimensioni e colorabilità potrebbero essere confuse con forme di schizogonia del plasmodio; ma un occhio esercitato può riconoscerle con facilità, soprattutto per l'assenza di citoplasma azzurro intenso caratteristico delle fasi esoeritrocitiche del parassita.

In alcune delle uova si è notato, 5-8 giorni dopo la inoculazione dei parassiti, una trasformazione del colore del vitello dal giallo oro al verdastro. Gli embrioni nei quali questo fenomeno si è verificato risultarono positivi al momento della nascita. E' probabile che questo fenomeno sia in rapporto con l'infezione malarica, e ci confortano su questo punto le analoghe osservazioni fatte da Haas e coll. ⁽⁹⁾.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti chiariscono i dati controversi intorno alla infettabilità degli embrioni di pollo con *P. gallinaceum* ottenuti dai vari ricercatori che si sono interessati dell'argomento.

⁽⁸⁾ E. MOSNA, Riv. Parassitologia, 7, 19 (1947).

⁽⁹⁾ V. H. HAAS, H. A. FELDMAN e F. MOORE EWING, Pub. Health Rep., 60, 577 (1945).

Il fatto che il sangue infetto prelevato da un pulcino con forme endoistiocitarie sia costantemente infettante per l'embrione, mentre il sangue prelevato all'inizio della infezione provocata con inoculazione di sangue, quando cioè le forme endoistiocitarie non sono ancora presenti, non lo sia, o lo sia solo eccezionalmente anche se inoculato endovena nell'embrione, dimostra che l'infezione dell'embrione non dipende dal modo dell'inoculazione, ma dalla qualità dei parassiti inoculati. In particolare gli sporozoiti, le forme endoistiocitarie contenute in emulsioni di organi interni, le forme endoeritrocitarie del sangue periferico di pulcini con forme endoistiocitarie negli organi, riescono ad adattarsi alle condizioni presentate dalle cellule ospiti embrionali. E' da supporre quindi che siano in grado di attecchire nei globuli rossi dell'embrione quelle forme del parassita abituate a vivere in ambienti privi di emoglobina (sporozoiti, forme endoistiocitarie) o quelle forme endoeritrocitarie che provengono da — e sono in grado di riprodurre — forme endoistiocitarie viventi in cellule prive di emoglobina. E' logico pensare che la emoglobina delle emazie embrionali sia in qualche modo diversa da quella delle emazie dell'animale dopo la nascita, e che pertanto la respirazione, la sopravvivenza e la riproduzione dei parassiti nelle emazie embrionali sia possibile solo a quelli che si trovano negli stadi sopra ricordati, nei quali evidentemente i requisiti e i fenomeni di respirazione e di nutrizione debbono essere diversi. Sarà questo il terreno di indagine delle prossime esperienze.

Per quanto riguarda il meccanismo della infezione dell'embrione, i dati della tabella II danno fondati motivi per ritenere che anche nell'embrione l'infezione provocata da inoculazione di sangue infetto avvenga in un primo tempo nelle emazie, e in seguito, dopo alcun tempo, nelle cellule reticolo-istiocitarie, come è stato più volte accertato.

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

6 agosto 1948.
