

56. Gabriele GRAMICCIA. — Sulle recenti scoperte relative ad alcune forme di sviluppo degli sporozoiti di *Plasmodium cynomolgi* e di *Plasmodium vivax*.

Riassunto. — L'A. fa la storia delle recenti scoperte relative alle fasi di sviluppo degli sporozoiti di varie specie di plasmodi: aviari, delle scimmie e dell'uomo. Mette in evidenza il comportamento diverso delle varie specie di plasmodi sia per quanto riguarda lo sviluppo che il significato biologico delle diverse fasi tissulari. La recente scoperta delle fasi pre-eritrocitiche di *P. cynomolgi* e di *P. vivax* entro cellule epatiche parenchimali fa sorgere nuovi problemi di sistematica che investono l'intero sottordine degli *Haemosporidiidae* ma tali problemi non potranno essere risolti finchè non sarà svelato il comportamento particolare di ciascuna specie o gruppo di plasmodi.

Résumé. — L'A. fait mention des découvertes récentes relatives au développement des sporozoïtes de différentes espèces de plasmodes des oiseaux, des singes et de l'homme.

Il fait ressortir le différent comportement dans les diverses espèces de plasmodes, ayant égard soit au développement, soit à la signification biologique des diverses phases tissulaires.

La récente découverte des phases pré-érythrocytiques de *P. cynomolgi* et *P. vivax* dans les cellules hépatiques parenchymales fait naître de nouveaux problèmes de systématique, qui intéressent le sous-ordre *Haemosporidiidae* tout entier; mais ces problèmes ne pourront être résolus tant que le comportement particulier de chaque espèce ou groupe de Plasmodia ne sera pas décelé.

Summary. — The A. summarizes the recent discoveries relating to the development stages of malaria sporozoites in some species of plasmodia of birds, monkeys and man. Stress is laid on the different behaviour of the various plasmodium species, as to their development as well as to the biological meaning of their different tissular stages.

The recent finding of the pre-erythrocytic stages of *P. cynomolgi* and of *P. vivax* within the parenchymal cells of the liver has given rise to some new problems of systematics affecting the whole sub-order of the

Haemosporidiidacea. However, the solution of these problems cannot be achieved before the particular behaviour of each single plasmodium species or group will be disclosed.

Zusammenfassung. — Der V. beschreibt die neuesten Entdeckungen bezüglich der Entwicklungsphasen der Sporozoiten der verschiedenen Vogel- -Affen -und Menschenmalariaarten.

Es wird das verschiedene Vorgehen einzelner Plasmodiumarten dargestellt und zwar mit Berücksichtigung auf deren Entwicklung, sowie auf die biologische Bedeutung der verschiedenen Gewebsphasen.

Aus den vor kurzem in den Parenchymalzellen der Leber entdeckten prä-erythrozytären Phasen des *P. cynomolgi* und des *P. vivax* sind neue Systematikprobleme, die die ganze Untergattung der *Haemosporidiidacea* beeinträchtigen, hervorgerufen worden.

Diese Probleme werden jedoch keine Auflösung ergeben, bis das eingehende Vorgehen einzelner Plasmodiumarten oder Plasmodiumgruppen eine Aufklärung finden wird.

Una serie di ricerche eseguite presso la London School of Hygiene and Tropical Medicine hanno portato recentemente alla scoperta di fatti nuovi e inattesi nella tanto dibattuta questione dello sviluppo dei parassiti malarigeni e del loro ciclo esoeitrocitico, sì che alcune presunte conoscenze e la stessa classificazione degli emosporidi ne restano fortemente scosse.

Le ricerche di Huff e coll. ⁽¹⁻²⁻³⁾, 1943-45, sullo sviluppo del *Plasmodium gallinaceum* nel sito della inoculazione avevano mostrato che gli sporozoiti si sviluppano nelle cellule del sistema linfo-macrofagico (cioè a dire in cellule fisse o migranti, più o meno differenziate, appartenenti al sistema reticolo-istiocitario) della pelle del sito della inoculazione, senza escludere la possibilità di sviluppo anche in cellule endoteliali (che

(¹) C. G. HUFF, F. COULSTON e W. CANTRELL (1943). « Malarial cryptozoites ». *Science*, 97, 286.

(²) C. G. HUFF e F. COULSTON (1944). « The development of *Plasmodium gallinaceum* from sporozoite to erythrocytic trophozoite ». *J. Inf. Dis.*, 75, 231-49.

(³) F. COULSTON, W. CANTRELL e C. G. HUFF (1945). « The distribution and localization of sporozoites and preerythrocytic stages in infections with *Plasmodium gallinaceum* ». *J. Inf. Dis.*, 76, 226-38.

non fu peraltro osservata o ben definita); e che solo dopo questa fase *pre-eritrocitica* (*criptozoiti* o prima generazione tissulare, *meta-criptozoiti* o generazioni tissulari successive) avviene l'invasione delle cellule endoteliali e del sistema linfo-macrofagico degli altri tessuti (*fanerozoiti* o forme tissulari tardive, non necessariamente dipendenti dallo sviluppo di sporozoiti in quanto possono prodursi anche dopo inoculazione di sangue infetto) e dei globuli rossi.

Tali ricerche avevano, parzialmente almeno, polarizzato l'attenzione degli sperimentatori alla ricerca delle fasi di sviluppo degli sporozoiti dei vari plasmodi *nel punto di inoculazione*, nonostante le esperienze antiche e recenti di Missiroli ⁽⁴⁾, Fairley ⁽⁵⁾ e vari altri, i quali avevano dimostrato, direttamente o indirettamente, la rapida diffusione degli sporozoiti oltre la zona di inoculazione (in circa 5 minuti). Inoltre una diffusa e non giustificata opinione tendeva ad applicare a tutte le specie di plasmodi quello che solo per alcune specie si conosceva, e neppure completamente, nonostante già dimostrate diversità di comportamento biologico tra diverse specie [Corradetti e Gramiccia ⁽⁶⁾], ed a ricercare nel reticolo-endotelio, in periodi dell'infezione ed in organi indiscriminatamente diversi le tanto affermate e invocate, ma così poco dimostrate, fasi esoeritrocitiche della malaria delle scimmie ed umana.

Nel 1932 Levaditi e Schoen ⁽⁷⁾, osservando in sezioni il fegato di un babuino (*Cynocephalus babuin*), vi notavano delle cisti protozoarie di dimensioni da 65 micron fino a 2 mm. di diametro, caratterizzate, nello stadio più sviluppato, da una massa periferica di innumerevoli formazioni di 2-3 micron, simili a delle spore, e da una zona centrale di sostanza omogenea; negli stadi più giovani le cisti erano invece interamente ripiene di formazioni sporoidi. La parete, ialina, era circondata da tessuto di rea-

⁽⁴⁾ A. MISSIROLI (1940). « Sullo sviluppo dei parassiti malarigeni ». *Riv. Parassitologia*, 4 (2), 69-78. (Lavoro riassuntivo).

⁽⁵⁾ N. H. FAIRLEY (1947). « Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments ». *Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 40 (5), 621-76.

⁽⁶⁾ A. CORRADETTI e G. GRAMICCIA (1941). « Ricerche sul valore biologico del ciclo schizogonico del *Plasmodium elongatum* nelle cellule ematopoietiche ». *Riv. Parassitologia*, 5, (1), 5-16.

⁽⁷⁾ C. LEVADITI e R. SCHOEN (1932). « Sur un parasite sporulé du singe ». *C. R. Soc. Biol.*, 109, 343-46.

zione, dapprima composto di polinucleari, poi di monociti. Le cisti, situate in pieno tessuto epatico, erano assenti in tutti gli altri organi esaminati.

Essi non seppero mettere in relazione tale reperto evolutivo con nessuno dei protozoi noti nelle scimmie, e denominarono quindi tali formazioni e il supposto protozoo che le determinava *Hepatocystes simiae*.

Nel marzo 1947, Mer e Goldblum ⁽⁸⁾ descrissero per primi forme schizogoniche di un emosporidio di un pipistrello (*Myotis myotis*) rinvenute in cellule reticolo-endoteliali e in cellule ematopoietiche della serie granulocitaria. In un altro pipistrello (*Myotis nattererii*), forme schizogoniche furono riscontrate libere in strisci di fegato e di rene. Lo scrivente ha avuto occasione di osservare recentemente tali preparati per la cortesia del Dr. Wenyon che ne era in possesso, e ha potuto notare che alcune delle forme schizogoniche di questo secondo pipistrello erano chiaramente localizzate nell'interno di cellule epatiche parenchimali.

Nel maggio 1947, Garnham ⁽⁹⁾ ebbe occasione di studiare 23 scimmie del genere *Cercopithecus* del Kenia, 17 delle quali presentavano nel sangue periferico una infezione da *Plasmodium kochi*.

Di tale supposto plasmodio, scoperto da Laveran nel 1899, si conoscevano, come è noto, soltanto gametociti e forme più o meno giovani uninucleate, nei globuli rossi; non erano mai state ritrovate forme di moltiplicazione nei globuli rossi o altrove. L'infezione non è trasmissibile per inoculazione di sangue, nè si conosce l'insetto trasmettitore. Occorre pertanto studiarla nelle infezioni naturali.

Garnham, avendo eseguito l'autopsia di tali scimmie, constatò la presenza nel fegato e soltanto nel fegato di 16 su 17 delle scimmie risultate infette nel sangue periferico, di cisti, in quantità variabili da 1 a oltre 100 per ciascuna scimmia, in tutto uguali a quelle descritte 15 anni prima da Levaditi e Schoen. Al contrario, nessuna delle scimmie ripetutamente negative nel sangue periferico presentava le cisti nel fegato. Egli ha potuto mettere pertanto in relazione tali cisti con la presenza di *P. kochi* nel

⁽⁸⁾ G. G. MER e N. GOLDBLUM (1947). « A haemosporidian of bats ». *Nature*, 159, 29 marzo, 444.

⁽⁹⁾ P. C. C. GARNHAM (1947). « Exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium kochi* Laveran. A preliminary note ». *Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 40, (5), 719-22.

sangue periferico. Studiando su sezioni l'evoluzione delle cisti, egli ha potuto osservare che le fasi più giovani repertate, rappresentate da una masserella citoplasmatica con 5-6 granuli di cromatina, si trovano situate *entro cellule epatiche parenchimali*, dalle quali quindi fuoriescono a causa dell'enorme accrescimento, assumendo forme dapprima irregolari, fogliate, con i granuli di cromatina disposti alla periferia della formazione (all'incirca come avviene nelle cisti plasmodiali nella parete dello stomaco della zanzara) e quindi una forma sferica, nella quale, come si è detto, i nuclei cromatinici si raggruppano in più strati nella parete, e l'interno delle cisti si colliqua, dando luogo alla formazione di liquido albuminoideo citrino.

Secondo le interpretazioni di Garnham tali cisti rappresenterebbero le forme di moltiplicazione del *P. kochi*, ed i merozoiti che ne derivano andrebbero ad invadere i globuli rossi, ove si maturerebbero come gametociti.

L'importanza di questa scoperta consiste essenzialmente nel fatto che un emosporidio produttore pigmento, e considerato come un plasmodio, sia pure « sui generis », è stato rinvenuto *svilupparsi in una cellula epiteliale*.

Questa scoperta ha riportato l'attenzione dei ricercatori sulla possibilità che l'evoluzione di alcune fasi dei parassiti malarigeni e degli sporozoiti in particolare, potesse svolgersi in cellule diverse non solo dai globuli rossi, ma anche dal reticolo-endotelio, ed in luoghi ed organi ben distanti e diversi dal punto di inoculazione nella pelle.

E' seguito quindi un periodo di febbrili ricerche sul *Plasmodium cynomolgi* che, per i suoi caratteri di plasmodio delle scimmie facilmente trasmissibile mediante anofeli e simile per morfologia e caratteri biologici e di decorso al *P. vivax*, faceva sperare in risultati più verosimilmente riportabili all'infezione umana.

Gli esami microscopici di sezioni di tutti gli organi, eseguiti durante gli stadi conclamati dell'infezione, non hanno mai lasciato osservare la presenza di forme esocitrocitiche di sviluppo.

Dopo numerose ricerche infruttuose, Shortt, Garnham e Malamos (¹⁰, ¹¹) riuscirono infine a dimostrare la presenza di forme di schi-

(¹⁰) H. E. SHORTT e P. C. C. GARNHAM (1948). « Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites ». *Nature*, 161, 24 genn., 126.

(¹¹) H. E. SHORTT, P. C. C. GARNHAM e B. MALAMOS (1948). « Pre-erythrocytic stage of mammalian malaria ». *Brit. Med. J.*, 31 genn., 192-94.

zogonia del *P. cynomolgi* entro cellule epatiche parenchimali e lì soltanto 6 e 7 giorni dopo l'inoculazione sottocutanea, intramuscolare e endoperitoneale di un grandissimo numero di sporozoiti (circa 570 zanzare infette), e cioè durante la fase di incubazione dell'infezione, prima che il sangue periferico fosse infettante o comunque positivo.

Questo reperto è stato confermato da Hawking ⁽¹²⁾, il quale ha osservato tali forme già il 5° giorno dall'inoculazione degli sporozoiti.

Si tratta evidentemente di fasi già progredite di sviluppo degli sporozoiti (*meta-criptozoiti* quindi, adottando la nomenclatura di Huff) e tuttavia sempre pre-eritrocitiche, ritrovate solamente durante tale fase dell'infezione.

Ma un altro fenomeno importante è stato osservato, comune alle cisti del *P. kochi* e alle forme pre-eritrocitiche di *P. cynomolgi*: che cioè tali forme, inoculate in scimmie sane, *non hanno dato luogo allo sviluppo di infezione malarica*.

Questo fatto sorprende chi voglia paragonare tali fasi con le forme pre-eritrocitiche (*fanerozoiti*) di altre infezioni malariche (*P. gallinaceum*, *P. cathemerium*, *P. elongatum*, ecc.), ma può trovare un riferimento in quanto avviene nelle infezioni da *Haemoproteus columbae* o da *Haemoproteus* del passero, in cui si hanno, come è noto, gametociti nel sangue periferico e forme schizogoniche in cellule del sistema reticolo endoteliale negli organi interni; l'inoculazione in animali sani di poltiglie di organi contenenti le forme schizogoniche non dà luogo allo sviluppo della infezione.

Esistono evidentemente alcune fasi di sviluppo nel ciclo di certi emosporidi (e le fasi pre-eritrocitiche di *P. cynomolgi* sembrano essere tra esse) che non sono in grado di attecchire in un nuovo ospite e di continuare a moltiplicarsi.

Nella foga della scoperta, accertata e confermata da essi stessi e da altri ⁽¹²⁾, Shortt e Coll. hanno ripetuto l'esperienza col *P. vivax* nell'uomo. Dopo avere inoculato un paziente con sporozoiti, hanno praticato una biop-

⁽¹²⁾ F. HAWKING (1948). « Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites ». *Nature*, 161, 31 genn., 175.

⁽¹³⁾ H. E. SHORTT, P. C. C. GARNHAM, G. COVELL e P. G. SHUTE (1948). « The pre-erythrocytic stage of human malaria, *Plasmodium vivax* ». *Brit. Med. J.*, 20 marzo, 547.

sia del fegato dopo 7 giorni, ed hanno potuto rilevare, *in cellule epatiche parenchimali*, forme pre-eritrocitiche simili a quelle che avevano osservate nelle esperienze con *P. cynomolgi*.

Fin qui la storia ad oggi.

Volendo ora giustificare le affermazioni che abbiamo scritte all'inizio, dobbiamo considerare che i reperti qui riportati e che sono i primi sicuramente accettabili e per la loro base sperimentale e per l'attendibilità del reperto ottenuto in sezioni di tessuto atte a far ben distinguere gli esatti rapporti tra parassiti e cellule ospiti, sconvolgono le supposizioni fin qui quasi universalmente sostenute sulla fase tissulare dei plasmodi, che avrebbe dovuto svolgersi in cellule dell'apparato reticolo-endoteliale nei più diversi organi, e che sarebbe stata responsabile sia della fase di latenza primaria dell'infezione malarica, sia della resistenza ai medicinali, sia delle recidive.

Ora, per la prima volta, tale fase è stata sicuramente trovata, *non nelle cellule R. E., ma in cellule parenchimatose del fegato, e lì soltanto, in un periodo che va dal 5° al 7° giorno dopo la infezione con gli sporozoiti*. Mentre da una parte sono in corso ricerche dirette a stabilire l'evoluzione e la localizzazione dei parassiti anteriormente al 5° giorno dall'infezione con sporozoiti, nessuna forma tissulare è stata infatti ritrovata nel periodo susseguente alla comparsa dei primi parassiti nel sangue, al contrario di ciò che avviene in specie aviarie di plasmodi. Inoltre, come si è detto, le forme endo-epatiche sia di *P. kochi* che di *P. cynomolgi* si sono dimostrate inadatte a trasmettere l'infezione se inoculate in animali sani.

Da quanto si è detto, appare evidente che esistono ancora molti punti da chiarire nella storia dello sviluppo dell'infezione malarica in generale e delle singole specie (fra gli altri il destino degli sporozoiti di *P. cynomolgi* e *P. vivax* dal loro ingresso nell'organismo fino al 5°-7° giorno, il destino delle fasi pre-eritrocitiche e il loro significato biologico, la eventuale presenza per le varie specie di altre fasi tissulari più tardive, ecc.).

Si hanno già tuttavia criteri orientativi sufficienti a stabilire che le future ricerche dovranno presupporre 1) la considerazione che *ogni specie di plasmodio va studiata come entità a sè, capace di comportarsi e di evol-*

vere in maniera diversa dalle altre; 2) pochi fatti particolari accertati, di cui è ricco il nostro patrimonio di cognizioni in questo campo.

Per quanto riguarda il primo punto, basterà ricordare il comportamento delle fasi tissulari del *P. gallinaceum* (nelle cellule R. E.), del *P. elongatum* (nelle cellule ematopoietiche), del *P. mexicanum* (nelle cellule R. E. e nelle cellule ematopoietiche assieme), del *P. cynomolgi* e *P. vivax* (nelle cellule epatiche), per dare un'idea della variabilità di comportamento delle varie specie.

Per quanto riguarda il secondo punto, dovremo invece ricordare le già citate esperienze di Missiroli, il quale è stato il primo a dimostrare la inconsistenza delle affermazioni di Schaudinn circa l'ingresso diretto degli sporozoiti nei globuli rossi, ed ha osservato gli stadi più precoci di sviluppo degli sporozoiti di *P. praecox* nel fegato e nella milza (dopo 22 ore). Purtroppo i suoi reperti, ottenuti su *strisci* di tessuto hanno mostrato solo parassiti liberi, ma ciò non esclude la possibilità di rapporti tra parassiti e cellule dei tessuti, essendo queste ultime andate disfatte nell'esecuzione dello striscio. Da ricordare anche i reperti di Huff e Coll. nel punto di innesto di sporozoiti di *P. gallinaceum*, che sono, d'altra parte, in un certo contrasto con la documentata, rapida diffusione degli sporozoiti dal punto di inoculazione; la negatività di simili reperti nelle scimmie; e infine i tanti vari reperti delle varie specie di plasmodi nei tessuti, di brevissima durata gli uni (come il *P. cynomolgi* nel fegato - 7 giorni? -), più lunga altri (come il *P. gallinaceum* nelle cellule R. E. - circa 45 giorni -) e altri infine di durata tanto lunga quanto la stessa infezione malarica (come il *P. elongatum* nelle cellule ematopoietiche - oltre 8 mesi -).

Per la questione della genesi delle recidive, non esiste ancora un solo elemento dimostrativo della loro dipendenza da fasi tissulari, ed anche per questa questione la ricerca dovrà essere particolare per ogni singola specie di plasmodio, poichè si è visto che ciò che si può dimostrare per una specie non può necessariamente applicarsi anche alle altre.

Quanto anzi detto ci porta ad accennare, almeno di sfuggita, alla necessità di una revisione sistematica del sottordine *Haemosporidiidaea*, in quanto la sede e i modi di sviluppo delle forme schizogoniche, presi come criteri di classificazione dei generi compresi nel sottordine, si sono

rilevati all'esperienza tanti e così variati, che si può dire esista molta più differenza tra due specie comprese nel genere *Plasmodium* che tra alcune specie di plasmodi e il genere *Haemoproteus*.

Una tale revisione è quindi senz'altro necessaria, ma sarà fondatamente possibile solo quando tanti punti oscuri della biologia e del ciclo dei più importanti emosporidi saranno stati sufficientemente chiariti.

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