

5. G. GRAMICCIA e G. SACCÀ. — Note sulla infezione da *P. gallinaceum* nel pulcino. Considerazioni sul significato biologico del ciclo endoistiocitario dopo inoculazione di sangue.

Riassunto. — La infezione da *P. gallinaceum* nei pulcini inoculati con sangue infetto è notevolmente più acuta che nei polli ed è sempre mortale; ma la comparsa delle forme endoistiocitarie non è accelerata ed è soggetta alle stesse leggi. Si fanno alcune considerazioni sul periodo di undici giorni intercorrente fra la comparsa delle prime forme endoeritrocitarie e la comparsa delle forme endoistiocitarie; tale periodo viene interpretato come un ciclo a ritroso per mezzo del quale il *P. gallinaceum* tende a ripetere quelle fasi del suo ciclo biologico saltate a causa della artificiosità del mezzo di trasmissione, per poter riacquistare la pienezza delle sue possibilità biologiche. Si fanno dei confronti con il comportamento delle forme endoemoblastiche di *P. elongatum*, e dei gametociti delle varie specie di plasmodi dopo inoculazione sperimentale con forme endoeritrocitarie.

Résumé. — L'infection à *P. gallinaceum* dans les poussins inoculés avec du sang infecté est plus aiguë que dans les poulets et toujours mortelle; mais l'apparition des formes endo-histiocytaires n'est pas accélérée et elle est assujettie aux mêmes lois. Les AA. font des considérations sur la période de 11 jours qui passe entre l'apparition des premières formes endo-érythrocytaires et l'apparition des formes endo-histiocytaires. Les AA. interprètent cette période comme un « cycle à retour » par lequel *P. gallinaceum* va répéter les phases de son cycle biologique qui avaient été perdues à cause du moyen artificiel de l'inoculation, afin de retrouver toutes ses possibilités biologiques. Les AA. comparent ce comportement avec celui des formes endo-hémoblastiques de *P. elongatum*, et des gamétocytes dans les différentes espèces de Plasmodium après inoculation expérimentale avec des formes endo-érythrocytaires.

Summary. — The infection by *P. gallinaceum* in chicks inoculated with infected blood is considerably more severe than in chickens and always lethal; but the endo-histiocytic forms do not appear earlier and their appearance is subject to the same laws. Some considerations are drawn about the period of 11 days between the appearance of the earlier endo-erythro-

cytic forms and that of the endo-histiocytic ones; this period has been interpreted as a "return cycle" by which *P.gallinaceum* tends to repeat those phases of its biological cycle which were omitted because of the artificial means of transmission, in order to regain all its biological possibilities. The AA. compare this behaviour with that of the endo-hemoblastic forms of *P.elongatum* and of the gametocytes in the various species of *Plasmodia* after experimental inoculation with endo-erythrocytic forms.

Zusammenfassung. — Bei den mit infizierten Blut geimpften Küchlein ist die Infektion durch *P.gallinaceum* weitaus akuter als bei den Hühnern, auch ist sie immer tödlich; das Auftreten der endohistozytaren Formen ist aber nicht beschleunigt und ist den gleichen Gesetzen unterworfen. Es werden einige Erwägungen über die elftägige Periode gemacht, die zwischen dem Erscheinen der ersten endoerythrozytaren Formen und dem Erscheinen der ersten endoerythrozytaren Formen und dem Erscheinen der endo-histozytaren Formen besteht. Dieser Zeitraum wird als zurückgehender Zyklus gedeutet durch welchen *P.gallinaceum* danach strebt, jene Phasen seines biologische Zyklus zu wiederholen, die durch die künstliche Übertragung übersprungen wurden, um die Gesamtheit seiner biologischen Möglichkeiten wiederzugewinnen. Es werden Vergleiche mit dem Verhalten der endohaemoblasten Formen des *P.elongatum* und der Gametozyten der verschiedenen Arten von Plasmodien nach der experimentellen Einimpfung mit endoerythrozytaren Formen gemacht.

Come è noto dalle esperienze di Corradetti ⁽¹⁾ sui polli, il ciclo endoistiocitario del *P.gallinaceum* dopo inoculazione di sangue infetto prelevato all'inizio o durante la curva ascendente dell'attacco primario endoeritrocitico si verifica soltanto se e dopo che si sia avuta una infezione endoeritrocitica che si applichi con una positività nel sangue periferico di oltre 11 giorni. Per quanto riguarda la interpretazione di codesto fenomeno, lo stesso Corradetti ⁽²⁾ sostiene che esso è in dipendenza di due fat-

⁽¹⁾ A. CORRADETTI, Ricerca sulla biologia del *Plasmodium gallinaceum* nei polli inoculati con sangue infetto, Riv. Parass., 4, 249 (1940).

⁽²⁾ A. CORRADETTI, Valore biologico del ciclo endoistiocitario del *Plasmodium gallinaceum*, Riv. parass., 5, 209 (1941).

tori: 1) la proprietà della specie di attaccare le cellule dell'apparato reticolo endoteliale; 2) la assenza di immunità od un processo immunitario ritardato nell'organismo ospite. Infatti le forme endoistiocitarie non compaiono allorchè si generi un processo immunitario che stronchi l'infezione endoeritrocitica entro i primi 11 giorni dall'inizio della positività nel sangue periferico e non si formano neppure dopo inoculazione di forme endoistiocitarie se questa avvenga in polli che abbiano già superato e stroncato l'infezione endoeritrocitica.

Si è voluto verificare se tali asserzioni avessero valore anche per le infezioni da *P.gallinaceum* nei pulcini, in rapporto al comportamento di tale plasmodio in animali giovanissimi. Il decorso della infezione da *P.gallinaceum* nei pulcini presenta infatti caratteri di gravità notevolmente maggiori che nei polli. Ciò concorda con le osservazioni di Launoy ⁽³⁾ il quale peraltro sperimentò su animali di circa un mese, inoculandoli nel peritoneo.

Le nostre esperienze sono state rivolte a studiare:

- 1) il decorso dopo inoculazione endovenosa di sangue infetto prelevato durante la curva ascendente dell'attacco primario endoeritrocitico;
- 2) il decorso dopo inoculazione intramuscolare dello stesso sangue;
- 3) il decorso dopo inoculazione intramuscolare di forme endoistiocitarie.

I pulcini, al momento della inoculazione, erano tutti di età fra 5 e 8 giorni, del peso medio di circa 50-60 grammi.

Il sangue infetto da inoculare veniva prelevato durante la curva ascendente dell'attacco primario da polli o da pulcini infetti, indifferentemente, essendoci accertati, in esperienze preliminari, che l'età dell'ospite dal quale il sangue infetto veniva prelevato non influiva sui caratteri del decorso dell'infezione nei pulcini inoculati. Si aveva cura che il sangue inoculato contenesse dal 30 al 60% di globuli rossi infetti e che fosse prelevato da un animale non oltre il quinto giorno dall'inizio dell'infezione. Il sangue veniva diluito in parti uguali con una soluzione di citrato di sodio al 3%. Di tale diluizione venivano inoculati cm³ 0,1 (in media 50 milioni di parassiti) quando si praticava l'inoculazione endovenosa nella giugulare, e

⁽³⁾ E. MOSNA, Sul comportamento delle forme del ciclo esoeritrocitico del *Plasmodium gallinaceum*, Riv. Parass., 4, 241 (1940).

cm³ 0,2 (in media 100 milioni di parassiti) quando si praticava l'inoculazione intramuscolare nei muscoli pettorali. L'inoculazione veniva eseguita mediante siringa da tuberculina graduata a 1/40 di cm³ con ago molto sottile. Si esaminava quindi giornalmente il sangue periferico ottenuto per puntura della vena dell'ala a partire dal primo giorno dopo l'inoculazione. Di ogni pulcino morto venivano allestiti strisci di cervello per osservare l'eventuale presenza di forme endostiocitarie. Venivano considerati come negativi quegli strisci nei quali non veniva repertata nessuna forma del parassita entro 5 minuti di osservazione.

Nella tab. I sono riportati i risultati delle osservazioni sul decorso dell'infezione.

TABELLA I. DECORSO DELL'INFEZIONE

a) Giorno dall'inoculazione in cui si è osservata positività del sangue periferico all'esame dello striscio.

Inoculazione	Giorni dall'inoculazione							
	1	2	3	4	5	6	7	
Endovenosa . .	18	18	—	—	—	—	—	Pule. inocul. 36
Intramuscolare .	—	—	1	2	7	—	—	Pule. inocul. 10

b) Giorno dall'inizio della positività nel sangue periferico in cui è sopravvenuta la morte.

	G i o r n i													
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Pulcini morti .	1	17	11	4	4	1	1	1	4	1	1	—	—	Pule. inocul. 46

Si rileva che nonostante la esigua quantità di sangue inoculato, la positività del sangue periferico, dopo inoculazione endovenosa, è evidente nella metà dei casi nel primo giorno e nell'altra metà nel secondo giorno. Questa uniformità di reperto si presta ad essere bene sfruttata nelle esperienze sulla attività dei medicamenti anti-malarici. Invece, i pulcini inoculati per via intramuscolare sono diventati positivi 3-5 giorni dopo la inoculazione. L'infezione da *P.gallinaceum* è stata fatale per tutti i pulcini inoculati. La morte è avvenuta fra il 3° e il 13° giorno dall'inizio della positività nel sangue periferico, con un massimo fra il 4° e il 5° giorno e

un'altra lieve accentuazione all'11° giorno. Fra l'inizio dell'infezione nel sangue periferico e la morte il decorso dell'infezione è stato caratterizzato in tutti i casi da un rapido aumento del numero dei parassiti, che raggiungevano un massimo di densità fra il 3° e il 5° giorno dall'inizio della positività (50-98% dei globuli rossi infetti), massimo che coincide con la mortalità più elevata; quindi, fra il 9° e il 12° giorno si è avuta una certa diminuzione del numero dei parassiti (50-20% dei globuli rossi infetti), che però non ha impedito l'esito mortale, causato quasi certamente dall'insorgenza dell'infezione endoistiocitaria, che spiega, come si vedrà nella tab. II, la seconda accentuazione della mortalità all'11° giorno dall'inizio della positività nel sangue periferico.

TABELLA II.

REPERTO DI FORME ENDOISTIOCITARIE NEL CERVELLO

Giorni di positività continua nel sangue periferico, a partire dall'inizio dell'infezione:

	G i o r n i											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Numero dei pulcini morti nei rispettivi giorni dall'inizio della positività nel sangue periferico	1	17	11	4	4	1	1	1	1	—	—	
	—	—	—	—	—	—	—	—	3	1	1	

 Pulcini nei quali non furono trovate forme endoistiocitarie negli endoteli dei capillari cerebrali.

 Pulcini nei quali furono rinvenute forme endoistiocitarie negli endoteli dei capillari cerebrali.

Nella tab. II si nota infatti che le forme endoistiocitarie compaiono l'11° giorno dopo l'inizio della infezione continua endoeritrocitaria; esse furono repertate infatti solo nei pulcini morti l'11° giorno o dopo l'11° giorno. La scarsa possibilità di sopravvivenza dei pulcini fino all'11° giorno di infezione ed oltre ci ha impedito di avere un numero maggiore di casi di conferma, se pur di conferma si può avere bisogno in una manifestazione così evidente anche in pochi casi. La comparsa di forme endoistiocitarie negli endoteli dei capillari cerebrali è massiva, come se ad un certo momento, e precisamente all'11° giorno di infezione, la maggior parte dei merozoiti prodotti dalle sporulazioni endoeritrocitarie andasse ad invadere

le cellule istiocitarie. Infatti, mentre nel cervello di pulcini morti entro il 10° giorno ed anche in uno di quelli morti l'11° giorno non è stato possibile trovare una sola forma endoistiocitaria nonostante una prolungatissima osservazione al microscopio, gli altri tre pulcini morti l'11° giorno, come pure gli altri due morti rispettivamente il 12° e il 13° giorno, erano infarciti di forme endoistiocitarie.

Sei pulcini inoculati per via intramuscolare con emulsioni di cervello contenente forme endoistiocitarie sono divenuti positivi nel sangue periferico 5-7 giorni dopo l'inoculazione. Il reperto di forme endoistiocitarie nel cervello coincise con quello dell'inizio della positività nel sangue periferico.

Si può dedurre da questi dati che l'inizio dello sviluppo delle forme endoistiocitarie del *P.gallinaceum* dopo inoculazione di sangue infetto prelevato durante la curva ascendente dell'attacco primario endoeritrocitico dipende in primo luogo dal ciclo biologico particolare del parassita. Infatti lo sviluppo di tali forme si manifesta indipendentemente dall'età e dal grado di resistenza o di immunità naturale dell'ospite, solo dopo 11 giorni di infezione continua nel sangue periferico. L'infezione endoeritrocitaria nei pulcini, benchè più precoce e notevolmente più intensa e fatale che nei polli adulti non vale ad anticipare affatto la comparsa delle forme endoistiocitarie, le quali restano condizionate ugualmente dalla persistenza di una infezione endoeritrocitaria continua di 11 giorni.

D'altra parte sappiamo dalle esperienze di Corradetti (1) e di Mosna (4) (inoculazione di sangue prelevato durante la curva discendente dell'infezione endoeritrocitaria, inoculazione di forme endo-istiocitarie) che in tali casi la comparsa delle forme endoistiocitarie è precoce e si verifica già durante lo stadio acuto dell'infezione.

Quanto ora detto ci porta alle seguenti considerazioni:

1) Il momento della comparsa delle forme endoistiocitarie dopo una infezione endoeritrocitica continua è indipendente dalla maggiore o minore recettività media dell'ospite e dalla maggiore o minore virulenza palese della infezione nel sangue periferico.

(4) L. LANOY, Sur quelques caractères de la maladie expérimentale à *Plasmodium gallinaceum* chez le jeune poulet, Bull. Soc. Path. Exot., 33, 413 (1940).

2) La comparsa di forme endoistiocitarie è invece legata allo svolgimento per almeno 11 giorni del ciclo schizogonico endoeritrocitario *in uno stesso ospite*. In altre parole, ogni volta che il parassita viene trasmesso per inoculazione di sangue, prelevato all'incirca durante la prima settimana dell'infezione, in un nuovo individuo ospite, il parassita stesso si viene a trovare all'inizio di un nuovo ciclo biologico che comprende 11 giorni di infezione palese (= di almeno discreta entità) nel sangue e quindi la comparsa delle forme endoistiocitarie.

3) Il numero dei cicli schizogonici endoeritrocitari compiuti nei giorni della curva ascendente dell'attacco primario nell'ospite da cui è stato prelevato il sangue per la subinoculazione non influenzano l'epoca della comparsa delle forme endoistiocitarie nell'ospite in cui il sangue è stato subinoculato. Ciò fa supporre che il particolare comportamento del ciclo biologico del *P.gallinaceum* sia in relazione ad un adattamento del parassita a ciascuno dei nuovi individui ospiti.

Pertanto il periodo che intercorre tra la inoculazione di sangue e la comparsa delle forme endoistiocitarie deve considerarsi come un periodo di adattamento del *P.gallinaceum* al nuovo ospite, periodo di adattamento reso necessario, verosimilmente, dall'innaturale modo di trasmissione, per il quale il parassita viene a trovarsi in un organismo ospite nuovo, già in uno stadio avanzato rispetto a quello del suo ciclo evolutivo normale (dallo sporozoita).

Ogni qualvolta il parassita viene portato a contatto in modo innaturale, cioè in fase endoeritrocitica (anzichè in fase di sporozoita), con un ospite nuovo, esso deve compiere una specie di « ciclo a ritroso » della durata di almeno 11 giorni per riacquistare intere le possibilità del suo ciclo biologico normale. Il fattore immunitario, per quanto concerne la produzione delle forme endoistiocitarie ha importanza solo in quanto non riesca a stroncare l'infezione endoeritrocitaria entro gli 11 giorni necessari allo svolgimento completo del « ciclo a ritroso ».

Qualora l'inoculazione venga eseguita con sangue prelevato da polli al termine della seconda settimana d'infezione, o con emulsione di organi contenenti forme endoistiocitarie (vedi le citate esperienze di Corradetti e di Monsa), il ciclo « a ritroso » è notevolmente ridotto o abolito, e ciò perchè i parassiti subinoculati lo avevano già compiuto nel primo ospite e sono stati trasferiti nell'altro ospite — sia pure per mezzo del

sangue — avendo già quasi raggiunto o totalmente raggiunto la pienezza delle loro possibilità biologiche. Le forme endoistiocitarie, come pure le forme endoeritrocitarie reperibili durante lo svolgimento della fase endoistiocitaria, si dimostrano, per la pienezza delle loro possibilità biologiche, vicine agli sporozoit.

Con le inoculazioni di sangue infetto si sono create artificialmente delle forme parassitarie endoeritrocitarie, che pur essendo morfologicamente indifferenziabili dalle altre, sono diverse nelle loro capacità biologiche. Qui sorge la questione come sia stato possibile creare queste forme endoistiocitarie. Due sono le possibilità:

1) le forme endoeritrocitarie, dopo una lunga infezione naturale e dopo che il ciclo endoistiocitario del *P.gallinaceum* si è compiuto ed esaurito, perdono la capacità di riprodurre forme endoistiocitarie nello stesso ospite, ma la riacquistano dopo aver percorso il « ciclo a ritroso », se inoculate in un ospite nuovo;

2) successivi passaggi per inoculazione di sangue infetto hanno prodotto nelle forme endoeritrocitarie un affievolimento delle loro capacità primitive in conseguenza dell'anormale sistema di trasmissione al quale sono state sottoposte.

Viene qui a proposito di ricordare due fatti.

Il comportamento del ciclo endoemoblastico del *P.elongatum* si differenzia da quello endoistiocitario oltre che per le ragioni già poste in evidenza da Corradetti e Gramiccia ⁽⁵⁾, anche da questo punto di vista. Infatti, dopo inoculazione di sangue infetto prelevato in qualsiasi fase dell'infezione da *P.elongatum*, si ha sempre la comparsa contemporanea delle forme endoemoblastiche e delle forme endoeritrocitarie. Ciò conferma la perfetta equivalenza biologica delle forme pigmentate ed apigmentate del ciclo schizogonico del *P.elongatum*; mentre le corrispondenti del *P.gallinaceum* hanno caratteristiche biologiche nettamente diverse fra loro in alcune fasi della infezione.

Il comportamento dei gametociti nelle infezioni sperimentali con sangue infetto delle varie specie di plasmodi, compresi quelli umani, presenta qualche cosa di analogo con quanto abbiamo detto a proposito delle

⁽⁵⁾ A. CORRADETTI e G. GRAMICCIA, Ricerche sul valore biologico del ciclo schizogonico del *Plasmodium elongatum* nelle cellule ematopoietiche, Riv. Parass., 5, 5 (1941).

forme endoistiocitarie di *P.gallinaceum* nelle infezioni per inoculazione di sangue. La comparsa in circolo dei gametociti è infatti subordinata a un certo numero di cicli schizogonici, variabili per le diverse specie di plasmodi, che debbono compiersi prima che sia possibile il reperto di gametociti nel sangue periferico; ciò avviene anche quando il sangue per l'inoculazione sia stato prelevato da un individuo infetto che fosse già gametifero. Anche in questo caso è necessario supporre una fase di adattamento o di evoluzione del parassita nel nuovo ospite, prima che esso possa riacquistare la capacità di produrre gametociti.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di malariologia. 4 sett. 1947.
