

10. A. CORRADETTI e E. RIGOLI. — **Comportamento dei sistemi ematopoietico e reticolo endoteliale nel ratto albino al quarto e al settimo giorno di una infezione mortale da *Plasmodium berghei*.**

Riassunto. — Mediante lo studio del comportamento dei sistemi reticolo endoteliale ed ematopoietico in ratti infetti da *Plasmodium berghei* rispettivamente sacrificati al quarto giorno d'infezione o morti spontaneamente al settimo giorno si è potuto determinare quanto segue.

L'infezione da *P. berghei* produce un'esaltazione dell'attività eritropoietica nel midollo osseo e nel fegato che risulta già evidente al quarto giorno d'infezione e che diviene imponente nei ratti morti al settimo giorno. Tale esaltata attività eritropoietica costituisce una reazione dell'ospite che paradossalmente favorisce una sempre più intensa invasione parassitaria, in quanto il tipo di cellula prodotto in questa tumultuaria eritropoiesi è l'eritrocita con emoglobina immatura che costituisce appunto la cellula preferita da *P. berghei* per il proprio sviluppo. Nei ratti deceduti al settimo giorno è evidente un'insufficienza dell'apparato reticolo endoteliale a fronteggiare la crescente formazione di pigmento e di detriti cellulari e parassitari.

Riassunto. — By studying the behaviour of both the haemopoietic and the reticulo-endothelial systems in albino rats infected from *Plasmodium berghei* respectively either sacrificed at the fourth day of infection or spontaneously dead at the seventh day, the following facts were observed.

The infection from *P. berghei* induces in the albino rat a highly intensified erythropoietic activity that takes place in both the bone marrow and the liver. This activity is evident as early as the fourth day of infection and becomes very high in the rats spontaneously dead at the seventh day. This exalted erythropoietic activity constitutes a host reaction that paradoxically favours a more intense parasitic invasion, as the type of cell produced is the erythrocyte bearing non-mature haemoglobin (not exactly the same as the reticulocytes, but confused with them by many Authors), that is the type of cell preferred by *P. berghei* for its development. In the rats dead at the seventh day of infection it was evident that the reticulo-endothelial system was insufficient to digest the continuously increasing amount of pigment and material coming from parasite and cells destruction.

Nel 1951 CORRADETTI e VEROLINI ⁽¹⁾ pubblicarono uno studio sperimentale sulle relazioni tra *Plasmodium berghei* e cellule della serie rossa durante l'attacco primario nel ratto albino.

Questi autori definirono dapprima, in rapporto alla maturità dell'emoglobina, tre differenti tipi di cellule della serie rossa reperibili nel sangue periferico del ratto albino durante l'attacco primario da *P. berghei*: 1. Eritrociti maturi, ossia globuli rossi con emoglobina matura, colorabile in rosa con il liquido di Giemsa e quindi a reazione acidofila; 2. Eritrociti immaturi, ossia globuli rossi caratterizzati da una più o meno marcata basofilia del citoplasma, comunque da assenza di decisa acidofilia (si tratta di elementi in cui il processo di trasformazione delle sostanze pre-emoglobiniche in emoglobina non è ancora compiuto interamente): tali elementi si riconoscono anche per avere un diametro decisamente maggiore di quello dei globuli rossi normali (6,13-13,13 micron di diametro rispetto a 4,39-9,13 micron degli eritrociti normali); 3. Eritroblasti basofili.

Nel loro lavoro CORRADETTI e VEROLINI determinarono i rapporti tra il plasmodio e questi tre tipi di cellula ospite del parassita nei vari giorni dell'attacco primario. Essi studiarono due differenti ordini di fenomeni: a) le modificazioni, nei vari giorni, della percentuale relativa dei tre suddetti tipi di cellule, b) le modificazioni nei vari giorni della distribuzione dei parassiti in ciascuno dei tre suddetti elementi del sangue.

Essi osservarono che durante l'attacco primario si ha una diminuzione progressiva nella percentuale dei globuli rossi maturi (che nel ratto sano sono sempre in percentuale superiore al 99% degli elementi presenti nel sangue periferico) e un corrispondente aumento progressivo nella percentuale degli eritrociti immaturi e, ad infezione avanzata, comparsa degli eritroblasti basofili. Questo processo nei casi mortali risulta assolutamente progressivo fino alla morte; nei ratti che superano l'infezione esso risulta progressivo fino a un acme corrispondente ai giorni in cui si verifica la crisi parassitolitica, dopo di che si ha un'inversione del processo con un progressivo aumento della percentuale dei globuli rossi maturi, corrispondente diminuzione della percentuale dei globuli rossi immaturi e scomparsa degli eritroblasti basofili, fino a tornare alla norma in 6-10 giorni.

Riguardo al comportamento dei parassiti gli autori osservano che questi dimostrano fin dall'inizio dell'infezione una evidente tendenza a svilupparsi in eritrociti con emoglobina non ancora matura: infatti la percentuale degli eritrociti immaturi parassitati rispetto ai non parassitati è in ogni momento dell'infezione molto alta e spesso vicina al 100 per cento, mentre la percentuale degli eritrociti maturi parassitati rispetto

ai non parassitati arriva al massimo all'11% ed è in genere molto al disotto di questo limite. All'inizio dell'infezione i globuli rossi si presentano quasi esclusivamente del tipo maturo, e i parassiti, ancora in scarso numero, si osservano naturalmente in eritrociti maturi: a mano a mano che nei giorni seguenti l'infezione si va facendo più intensa, la distruzione dei globuli rossi per opera di parassiti agisce da stimolo per la immissione in circolo di eritrociti immaturi, e, in un secondo tempo, di eritroblasti basofili. Data la tendenza dei parassiti a invadere appunto gli eritrociti immaturi, si verifica *il fenomeno paradosso che la reazione dell'ospite allo stimolo anemico favorisce un sempre più intenso sviluppo dei parassiti*, per cui l'invasione parassitaria diviene imponente e giunge a percentuali estremamente alte. L'infezione giunta all'acmé può terminare o con la morte dell'ospite o con una crisi parassitolitica.

In un'altra serie di esperimenti già nel 1950 CORRADETTI ⁽²⁾ aveva dimostrato che l'infezione da *P. berghei* nel ratto albino quando non risulta mortale induce nell'ospite un'immunità che elimina i parassiti fino all'ultimo individuo in un periodo di 50 giorni dalla fine dell'attacco primario producendo una resistenza alla reinfezione che persiste dopo la distruzione dei parassiti per il resto della vita del ratto. Si tratta di un'immunità in assenza di parassiti, del tutto distinta quindi dalla pre-munizione, che si verifica nelle altre infezioni da plasmodi compresi quelli dell'uomo.

Dati questi fatti peculiari che distinguono l'infezione da *P. berghei* da quella degli altri plasmodi conosciuti, appariva di estremo interesse verificare quale fosse il comportamento dell'Apparato reticolo endoteliale e del sistema ematopoietico nelle diverse fasi dell'infezione e nelle differenti condizioni immunitarie che nel corso dell'infezione stessa si producono. Il presente lavoro costituisce un primo contributo a questo studio. In esso ci occupiamo di determinare le condizioni del S.R.E. e del Sistema ematopoietico rispettivamente al 4° giorno di infezione (ossia quando l'infezione è in pieno sviluppo ascendente) e al 7° giorno in infezioni risultate mortali appunto in quel giorno.

MATERIALE E TECNICA

I ratti usati negli esperimenti avevano circa tre mesi di età. Essi furono infettati mediante inoculazione di sangue infetto da *P. berghei* nella cavità peritoneale: a ogni ratto furono inoculati 2/10 di cc. di sangue unito a ugual quantità di citrato di sodio. A tutti i ratti si eseguivano quotidiani esami di sangue.

Per lo studio furono sacrificati al quarto giorno d'infezione due ratti. La ricerca comprese inoltre altri cinque ratti che morirono spontaneamente al settimo giorno d'infezione. Come controlli furono sacrificati due ratti sani della medesima età.

Di ciascun animale studiato sono stati prelevati i seguenti organi: midollo osseo rosso, milza, linfoghiandole (appartenenti al distretto lombo-aortico), fegato, polmone, rene, sistema nervoso centrale, intestino e ghiandole surrenali. I frammenti di organi sono stati fissati in liquido di Carnoy e inclusi in paraffina. Delle sezioni sono state eseguite le seguenti colorazioni: Giemsa, ematossilina-eosina, Van Gieson, Gomora. Di alcuni organi (milza, fegato e midollo osseo) sono stati eseguiti anche preparati a impronta per apposizione, che sono stati fissati in Carnoy allo stato umido e colorati con il Giemsa.

Nel presente lavoro la descrizione è naturalmente tutta comparativa. Come base sono stati presi gli aspetti istologici degli organi dei due ratti sani, ed i reperti ottenuti rispettivamente al quarto giorno (ratti sacrificati) e al settimo giorno d'infezione (ratti morti spontaneamente) sono stati paragonati sia con i reperti normali che tra loro.

Nell'esposizione dei reperti relativi a ciascun organo e tessuto descriveremo dapprima le modificazioni rispetto alla norma osservate nei ratti sacrificati al quarto giorno d'infezione (ratti num. 1966 e 1968), e poi quelle riscontrate nei ratti morti al settimo giorno (ratti num. 1849, 1857, 1874, 1892, 1893). In tal modo ci sarà agevole paragonare subito i reperti osservati nelle due diverse fasi dell'infezione e renderci conto della dinamica evolutiva dell'infezione mortale.

RISULTATI DEGLI ESPERIMENTI

1. MIDOLLO OSSEO (preparati per apposizione). — In ambedue i ratti sacrificati al quarto giorno d'infezione gli eritroblasti e i monociti appaiono aumentati di numero rispetto alla norma. I parassiti sono molto scarsi e risultano nella quasi totalità in eritrociti maturi. Il pigmento è quasi del tutto assente, e molto limitati sono i fenomeni di fagocitosi, esplicita esclusivamente da rari monociti e macrofagi.

Nei ratti morti al settimo giorno di infezione gli elementi della serie eritrocitica sono nettamente aumentati di numero: si osservano numerosi pro-eritroblasti e numerosissimi eritroblasti basofili, a volte in mitosi e riuniti in piccoli nidi. Notevolmente aumentati sono pure gli elementi monocitari ed istiocitari. Moltissimi parassiti sono all'interno di eritrociti immaturi e di eritroblasti basofili. La fagocitosi è attiva ed è

esercitata in prevalenza da macrofagi che talora rivelano notevole vacuolizzazione del citoplasma: in essi si osserva pigmento a granuli e blocchetti, residui eritrocitari e scarsi parassiti in via di distruzione. Fenomeni di fagocitosi sono anche evidenti, in scala minore, da parte di monociti. Eccezionalmente pigmento si può osservare nel citoplasma di mielociti e metamielociti neutrofili. Tale quadro citologico e parassitologico risulta meno intenso nei ratti 1892 e 1893 di quanto non lo sia negli altri tre ratti studiati.

2. MILZA. — Nei ratti uccisi al quarto giorno lo studio dei preparati per apposizione rivela la presenza di parassiti in eritrociti maturi e di scarso pigmento. Si osservano monociti con citoplasma vacuolizzato e nucleo frammentato, e un certo numero di plasmacellule: qualche macrofago in fagocitosi e qualche altro in necrobiosi. Lo studio delle sezioni dimostra una polpa rossa congesta, ed endoteli rigonfi, pallidi. I seni sono ripieni di eritrociti maturi: fagocitosi limitata da parte di macrofagi e cellule endoteliali.

Nei ratti morti al settimo giorno i preparati a sezione dimostrano che i follicoli sono immersi in una polpa iperplastica. Le arterie centro-follicolari e penicillari hanno la media ispessita ed endotelio rigonfio con lume ristretto. Le cellule reticolo-istiocitarie del follicolo sono aumentate di numero e appaiono spesso rigonfie: di esse soltanto le più periferiche, ossia quelle vicine alla polpa, contengono talvolta pigmento. I cordoni sono ispessiti, ricchi di elementi fissi (istiociti, splenociti) e mobili (linfociti, plasmacellule).

Le lacune hanno il lume occluso da elementi circolanti e da macrofagi, mentre gli endoteli sono iperplastici, rigonfi. Tutti questi elementi presentano spiccata attività fagocitaria, col risultato di frequenti fenomeni di necrobiosi che colpiscono cellule e gruppi di cellule il cui citoplasma è infarcito di pigmento, detriti globulari e residui parassitari. Eccezionalmente si osservano parassiti inclusi nel citoplasma di leucociti e di megacariociti. Alcuni seni risultano talvolta bloccati da ammassi di pigmento e da parassiti.

3. LINFOGHIANDOLE. — Al quarto giorno d'infezione il linfonodo appare discretamente aumentato di volume, con capsula integra e disegno parenchimale ben conservato. Alcuni follicoli sottocapsulari hanno centro chiaro iperplastico: vi è discreto aumento numerico delle cellule del reticolo e delle fibrille reticolari. I cordoni sono modicamente ispessiti, i seni dilatati e ripieni di linfociti, monociti e macrofagi, questi ultimi con citoplasma vacuolizzato, assai di rado contenente pigmento e resi-

dui vari. Si osservano anche cellule endoteliali rigonfie, sporgenti nel lume o in esso distaccate.

Nei ratti morti al settimo giorno d'infezione i follicoli non sono più evidenti, sommersi dalla proliferazione dei linfoblasti e soprattutto degli istio-monociti, che hanno sostituito in gran parte il mantello linfocitario e i cordoni. I seni, specie i periferici, appaiono notevolmente dilatati: gli endoteli, rigonfi, sporgono nel lume e vi cadono in mezzo a una folla di macrofagi e monociti in fagocitosi. Questi elementi infarciti di pigmento, residui eritrocitari e raramente parassiti cadono in preda a fenomeni involutivi documentati dalla vacuolizzazione citoplasmatica e dalla cariolisi nucleare. Fenomeni simili si osservano a carico delle cellule reticolo-istiocitarie del parenchima.

4. FEGATO. — Nei ratti uccisi al quarto giorno lo studio dei preparati per apposizione rivela la presenza di alcuni pro-eritroblasti e di eritroblasti basofili isolati e riuniti a gruppi di due o tre elementi. Si osservano anche parecchi macrofagi, alcuni dei quali con citoplasma contenente granuli di pigmento, a volte interi eritrociti o eritroblasti parassitiferi: rarissimi i fenomeni di necrobiosi. Gli epatociti sono ben conservati. Lo studio dei preparati per inclusione dimostra che la struttura parenchimale è ben conservata. Intorno ai vasi allogati negli spazi portobiliari, si osservano piccoli infiltrati linfo-monocitari, tra i quali si notano gruppetti di eritroblasti. Fenomeni di fagocitosi si osservano soltanto in vicinanza degli spazi del Kiernan a carico delle cellule di Kupfer, dei macrofagi, e degli endoteli dei sinusoidi che sono modicamente dilatati. Piccoli nidi di eritropoiesi possono comparire anche nello spessore dei lobuli.

Nei ratti morti al settimo giorno i preparati a sezione dimostrano che la struttura parenchimale è sempre conservata. I nidi di eritropoiesi sono divenuti numerosi e appaiono diffusi nei lobuli. I capillari intralobulari sono notevolmente dilatati da macrofagi, globuli rossi parassitiferi e grossolani ammassi di pigmento: questi ultimi bloccano completamente in alcuni acini il lume dei sinusoidi in prossimità della vena centrolobulare. In corrispondenza dell'intasamento le trabecole del Remak mostrano epatociti sofferenti con citoplasma rigonfio, vacuolizzato. Tanto le cellule endoteliali che quelle di Kupfer risaltano per il loro contenuto in pigmento, che spesso ne infarcisce completamente il citoplasma determinando gravi fenomeni regressivi e necrosi.

5. POLMONE. — Nei ratti uccisi al quarto giorno si osserva un modesto rigonfiamento delle cellule dei setti. Gli istiociti e le cellule endoteliali appaiono già notevolmente impegnate nella funzione fagocitaria.

Nei ratti morti al settimo giorno il parenchima appare ben conservato. La fagocitosi da parte di macrofagi e cellule endoteliali appare molto intensa: il lume di alcuni capillari risulta a volte occluso da ammassi di pigmento.

6. RENI. — Tanto al quarto che al settimo giorno si osserva solo fagocitosi del pigmento da parte di cellule endoteliali del glomerulo e, assai raramente, il pigmento può osservarsi anche nelle cellule interstiziali. Al quarto giorno tale quadro è estremamente tenue.

7. SURRENALI. — Sia al quarto che al settimo giorno non si osservano depositi di pigmento, ma solo dilatazione dei sinusoidi della midollare.

8. INTESTINO. — Mentre i capillari dei villi risultano fin dal quarto giorno d'infezione ricchi di eritrociti parassitiferi, fenomeni di fagocitosi da parte dei macrofagi e degli endoteli appaiono evidenti solo nei ratti morti al settimo giorno e sempre in misura modesta.

9. SISTEMA NERVOSO CENTRALE. — Nessuna alterazione degna di nota.

DISCUSSIONE

Da quanto abbiamo riferito risulta chiaro che l'evoluzione del quadro isto-patologico nelle due fasi dell'infezione da *P. berghei* da noi prese in esame, ci rende piena ragione del decorso rapido e tumultuario dell'infezione stessa.

Il fenomeno fondamentale che costituisce la base dell'interpretazione del decorso dell'infezione è dato dalla reazione dell'apparato eritropoietico allo stimolo morboso. Noi vediamo che già al quarto giorno di infezione, nel midollo osseo gli eritroblasti appaiono aumentati di numero, e che nel fegato già si osservano pro-eritroblasti ed eritroblasti basofili isolati e riuniti a gruppi di due o tre elementi. Nei ratti morti al settimo giorno constatiamo che nell'intervallo è avvenuta un'imponente esaltazione dell'attività eritroblastica: nel midollo osseo si osservano numerosi pro-eritroblasti e una tumultuaria massa di eritroblasti basofili, a volte in mitosi e riuniti in veri nidi eritropoietici. Contemporaneamente nel fegato si verifica una forte moltiplicazione di nidi eritropoietici che si osservano numerosi nei lobuli.

Questa esaltata attività eritropoietica che si istituisce come reazione allo stimolo morboso prodotto da *P. berghei*, risulta in una rapida ed

incompleta maturazione degli eritroblasti, che determina la picnosi e la scomparsa del nucleo prima che l'emoglobina riesca a maturare attraverso la fase policromatofila. Si determina in questo modo *una reazione dell'ospite che paradossalmente favorisce una sempre più intensa invasione parassitaria*, in quanto il tipo di cellula prodotto in questa tumultuaria eritropoiesi è l'eritrocita con emoglobina immatura, che costituisce appunto la cellula preferita da *P. berghei* per il proprio sviluppo.

La moltiplicazione progressivamente crescente dei parassiti, favorita da questa reazione particolare dell'ospite, produce ben presto una massa di materiale da fagocitare, tale da impegnare in pieno a tale scopo l'apparato reticolo endoteliale. Come in altre infezioni da plasmodi, l'apparato reticolo endoteliale esplica anche in questo caso il suo massimo sforzo nella milza, fegato, midollo osseo, polmone e rene, ma la sua azione risulta praticamente inadeguata a fronteggiare la crescente formazione di pigmento e di detriti cellulari e parassitari.

Infatti la milza ha dimostrato un tale progressivo accumulo di scorie a livello dei sinusoidi da rendere in sette giorni di infezione la polpa rossa iperplastica fittamente stipata di pigmento, e sede di fenomeni di necrobiosi. Nel fegato, sempre in sette giorni si son prodotti accumuli di pigmento non solo negli spazi porto-biliari, ma anche negli elementi fagocitanti dei sinusoidi con direzione centro-lobulare. Un particolare aspetto dell'intensità dell'impegno del reticolo endotelio è data dall'esaltata attività a cui si assiste nei linfonodi i cui seni sono risultati dilatati da una folla di elementi costituiti quasi esclusivamente di cellule fagocitanti derivate dal circolo in preda ad alterazioni regressive.

Da quanto si è finora esposto risulta chiara la genesi dei casi mortali di questa infezione. Essa è dovuta alla progressiva tumultuaria invasione parassitaria, favorita da un paradossale comportamento dell'ospite, che reagisce producendo in gran numero proprio il tipo di cellula più adatto allo sviluppo del parassita e alla consecutiva insufficienza dell'apparato reticolo endoteliale incapace di fronteggiare l'enorme produzione di materiali da fagocitare.

Ma mentre questa concatenazione di cause ed effetti, documentata nei nostri esperimenti, ci dà ragione dell'esito fatale nei ratti morti al settimo giorno da noi studiati, ci induce anche ad estendere l'indagine a quei ratti che, pur essendo sottoposti, almeno nella fase ascendente dell'infezione, alla stessa concatenazione di cause ed effetti, vanno incontro, anzichè alla morte, alla crisi parassitolitica e alla guarigione con immunità in assenza di parassiti.

CONCLUSIONI

1. L'infezione da *P. berghei* produce nel ratto albino un'esaltata attività eritropoietica nel midollo osseo e nel fegato, già evidente al quarto giorno di infezione e divenuta imponente in ratti deceduti d'infezione al settimo giorno.

2. Tale esaltata attività ematopoietica costituisce una reazione dell'ospite che paradossalmente favorisce una sempre più intensa invasione parassitaria, in quanto il tipo di cellula prodotto in questa tumultuaria eritropoiesi è l'eritrocita con emoglobina immatura che costituisce appunto la cellula preferita da *P. berghei* per il proprio sviluppo.

3. Nei ratti deceduti al settimo giorno era evidente un'insufficienza dell'apparato reticolo endoteliale a fronteggiare la crescente formazione di pigmento e di detriti cellulari e parassitari.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Parassitologia.

Vittorio Veneto — Istituto di Ricerche Cliniche e Anatomia Patologica dell'Ospedale Civile.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CORRADETTI A. e VEROLINI F. - Riv. Parass., 12: 69 (1951).
(²) CORRADETTI A. - Riv. Parass., 11: 201 (1950).
-