

Ms. B-70/29

29

PROF. GIULIO RAFFAELE

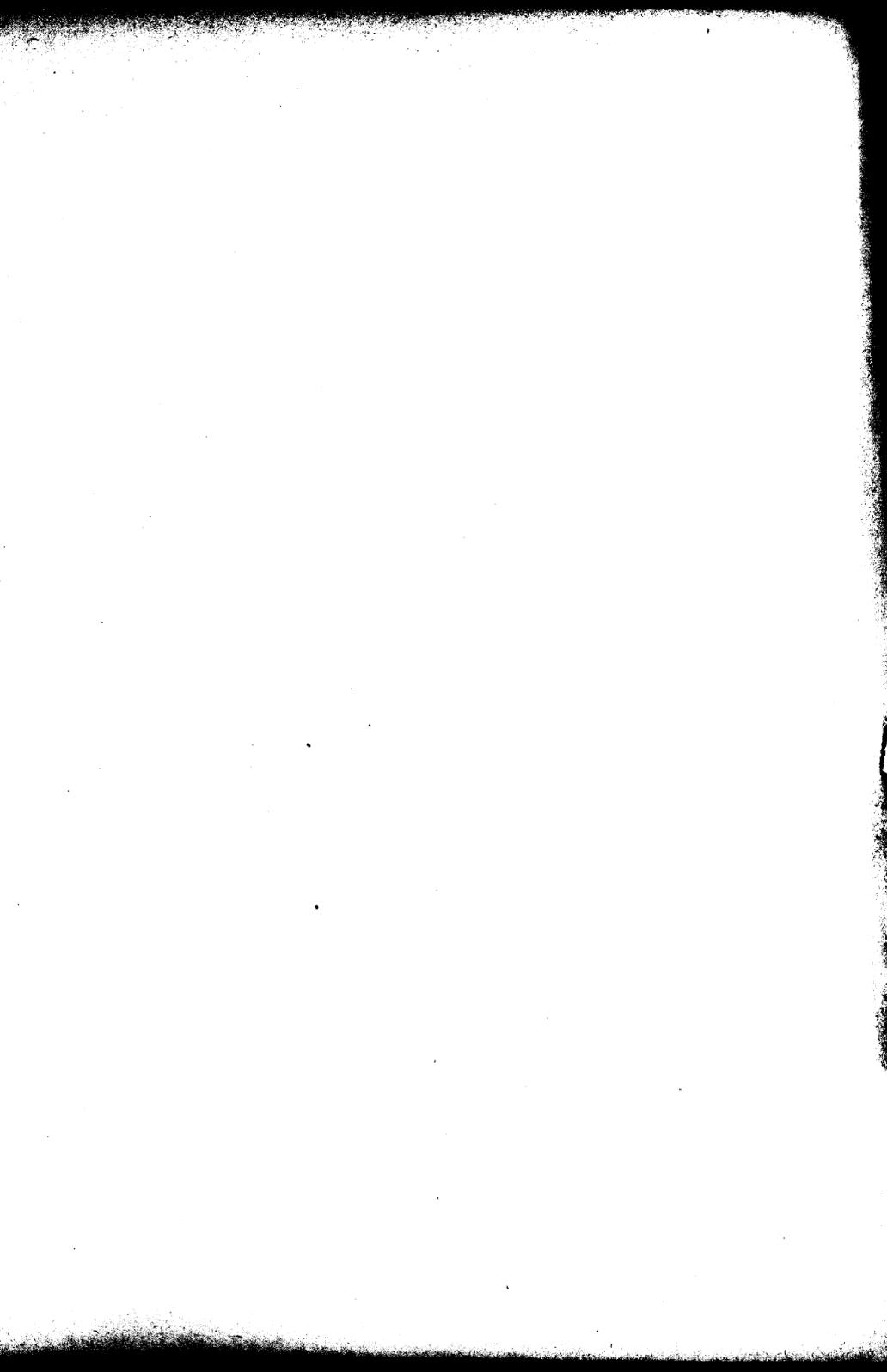


Sviluppo dei parassiti malarici
nei tessuti degli organi interni

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA" - VOL. IV, 1943-XXI

Esemplare fuori commercio per
la distribuzione agli effetti della
legge





PROF. GIULIO RAFFAELE

Sviluppo dei parassiti malarici
nei tessuti degli organi interni

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA" - VOL. IV 1945-XXI

GIULIO RAFFAELE

SVILUPPO DEI PARASSITI MALARICI
NEI TESSUTI DEGLI ORGANI INTERNI

LE indagini sulla biologia dei parassiti malarici iniziate dopo la scoperta di Laveran (1880) e condotte per un ventennio con eccezionale fervore sembrarono concludersi con la dimostrazione data dallo Schaudinn (1902) del meccanismo di penetrazione degli sporozoi nei globuli rossi. Si chiuse così uno dei periodi più fecondi nella storia della ricerca scientifica e le osservazioni di Schaudinn apparvero quasi come corollario naturale delle mirabili ricerche di Marchiafava, Celli e Golgi sul ciclo asessuale dei parassiti nel sangue e di quelle di Mac Callum, Ross, Bastianelli, Bignami e Grassi sul loro ciclo sessuale nelle zanzare. Per analogia con quanto in quel tempo era stato osservato nei coccidi, sembrava tanto naturale pensare che l'inizio dello sviluppo dei parassiti inoculati dalle zanzare dovesse avvenire nei globuli rossi, che la possibilità di una fase particolare di evoluzione degli sporozoi non si affacciava alla mente degli studiosi ed il lavoro di Schaudinn apparve quasi come dimostrazione non necessaria di un fatto già ammesso come postulato. Persino il Grassi che pure, considerando la forma e la struttura degli sporozoi, aveva prospettato (1900) la possibilità di un ciclo intermedio di sviluppo tra lo sporozoite ed il parassita endoglobulare, di fronte all'apparente dimostrazione sperimentale del fenomeno, finì per accettare l'opinione allora corrente.

Dopo tante meravigliose scoperte si ritenne logicamente in quel tempo che il problema della infezione malarica fosse avviato verso la soluzione. Tutto appariva chiaro dopo che l'agente eziologico ed il vettore erano stati individuati; inoltre si era potuto constatare che l'azione della chinina contro la malattia, da secoli già conosciuta, era dovuta al suo effetto letale sui parassiti. Nulla quindi sembrava opporsi ad una rapida e completa eradicazione della malattia nel mondo.

RISULTATI PRATICI DELLA CHININIZZAZIONE.

Ciò che sembrava semplice in teoria doveva tuttavia rivelarsi inattuabile nella pratica e la chininizzazione eseguita su larga scala tra le popolazioni malariche non diede il risultato che si attendeva. Benefici se ne ebbero indubbiamente e molti, ma la malaria permase e si può dire che ancora oggi, fatta eccezione delle regioni in cui a debellare l'endemia è intervenuta la grande bonifica idraulica ed agricola, la sua area di diffusione nel mondo è rimasta presso a poco invariata.

Un vero tracollo per i sostenitori dell'efficacia della profilassi chininica si ebbe dopo la guerra europea del 1914-1918 durante la quale la malaria falciò largamente le truppe operanti in regioni malariche, soprattutto quelle della Macedonia, nonostante la generosa distribuzione di chinina fatta tra esse. Napoleone I diceva: « val meglio dare la battaglia più sanguinosa che mettere le truppe in luogo malsano » e forse mai come allora apparve tanto veritiera la sentenza del celebre condottiero. Il Wenyon, direttore del laboratorio della malaria a Salonico durante la guerra europea, ebbe così ad esprimere le proprie impressioni: « il numero dei casi di malaria fu così enorme da far supporre che non avrebbe potuto essere maggiore senza la chinina. Le spese e il lavoro cagionati dalla somministrazione della chinina preventiva su scala così vasta, sono giustificate? L'opinione unanime, che è anche la mia, è di no ». Il Dionisi (1920) che durante quella guerra fu un vero apostolo della profilassi chininica conchiudeva che i tentativi erano stati molti ma i risultati non soddisfacenti e che: « la cura preventiva chininica, sia quotidiana che bisettimanale, non evitando l'infezione

latente, non contribuendo con la voluta efficacia al risanamento dell'ambiente, ed avendo perciò carattere di indeterminata continuità, debba essere riservata solo a condizioni eccezionali, quando sia impossibile tentare altra difesa, come accadde durante la guerra, e debba essere applicata durante il periodo di risanamento dell'ambiente malarico ».

Ed il James ricordando pochi anni fa (1937) l'insuccesso della profilassi chininica tra le truppe così si esprimeva: « Ognuno che aveva realmente preso parte agli sforzi fatti per combattere la malaria nelle diverse parti del mondo, durante la grande guerra, ritornò a casa con la sconcertante sensazione che le nostre conoscenze intorno a tale malattia fossero molto inferiori a quanto credevamo e che la cosa migliore fosse di mettere da parte la nostra fierezza e ricominciare da capo con umiltà da principianti per tentare di strappare al fato uno dei suoi misteri ».

Gl'insuccessi della profilassi chininica apparivano difficili a spiegare; che il chinino distruggesse i parassiti del sangue non era dubbio, e gli stessi soldati, che nonostante la profilassi avevano contratto la malattia, con la stessa chinina venivano poi curati e guariti, ma rimaneva inspiegabile perchè il farmaco non riuscisse a distruggere i parassiti al loro ingresso nell'organismo.

La pratica della malarioterapia nella paralisi progressiva rese possibile più tardi definire con rigore sperimentale quale fosse in realtà il valore profilattico della chinina e di altri antimalarici sintetici prodotti dopo la guerra. Si poté così constatare che tali farmaci potevano impedire le manifestazioni morbose della malattia ma nella maggioranza dei casi non impedivano che l'infezione attecchisse nell'organismo. Profilassi clinica dunque ma non causale.

Fu appunto in base alle deficienze osservate nell'azione dei farmaci che il James fu indotto (1931) a formulare l'ipotesi che gli sporozoi inoculati dalle zanzare non penetrassero entro i globuli rossi, ma come quelli di altri emosporidi (*Haemoproteus*), entro le cellule del reticolo endotelio degli organi interni ove sarebbero andati incontro ad un ciclo di sviluppo e di sporulazione dal quale avrebbero avuto origine i parassiti dei globuli rossi.

Il problema dell'insufficienza preventiva dei farmaci non era il solo da risolvere; vi era anche quello della loro incapacità a prevenire le recidive ed è ben noto a chiunque abbia esperienza nella terapia della malaria quanto sia difficile spesso, anche con cure energiche e prolungate, impedire le recidive della malattia.

Sulla loro genesi molto si è discusso, e le ipotesi avanzate a spiegarle sono state parecchie.

Il Golgi (1883) riteneva che i parassiti fagocitati non venissero tutti distrutti ma che alcuni sopravvivessero rimanendo così entro i fagociti protetti dall'azione dei farmaci. Bastianelli e Bignami (1898) osservando come nelle recidive a breve distanza della malaria curata o non curata (recrudescenze secondo il James), la durata degli intervalli di apiressia si aggirasse intorno a quelle dell'incubazione della malattia, pensavano che nell'organismo sopravvivessero dei parassiti dotati di peculiare resistenza ai rimedi ed ai mezzi di difesa dell'organismo. Il Bignami in seguito (1902) fece anche un'ipotesi in parte analoga a quella del Golgi suggerendo che alcuni dei parassiti inglobati dai leucociti si circondassero di una membrana che li avrebbe resi resistenti ai farmaci; da questi parassiti incistati avrebbero avuto origine quelli che erano causa delle recidive. Il Carducci (1910) suppose che i parassiti che davano le recidive rimanessero negli organi interni in uno stadio particolare, resistente all'azione dei farmaci.

Diversamente dagli altri lo Schaudinn (1902) sostenne che le recidive fossero determinate dalla riproduzione partenogenetica dei gametociti e ritenne anche di averne data la dimostrazione, interpretando come riproduzione, ciò che secondo la maggioranza degli autori non sarebbe altro che simultanea presenza nel globulo rosso di un gametocito e di uno schizonte (commensalismo). Tuttavia l'interpretazione data dallo Schaudinn al fenomeno incontrò anche parecchi sostenitori.

Ma l'opinione più universalmente accettata e sostenuta poi anche dallo stesso Bignami (1910) è stata sempre quella che considera le recidive dovute alla sopravvivenza in circolo di un certo numero di parassiti sfuggiti all'azione dei farmaci o per assuefazione o perchè

la concentrazione di questi rimane troppo bassa in alcuni territori dell'organismo.

Ma l'esperienza fatta sulla malaria sperimentale ha messo in rilievo che i paralitici inoculati di terzana benigna mediante sangue infetto non recidivano quasi mai, mentre quelli inoculati con anofeli (come in natura) recidivano nel 50-60% dei casi. Non si può quindi ammettere che nei soggetti infettati con sangue l'assuefazione dei parassiti ai farmaci non possa prodursi e tanto meno che la concentrazione nel sangue dei farmaci risulti in tal caso più uniforme.

Inoltre alcuni paralitici da me inoculati con sangue infetto di *P. vivax* e trattati per 14 giorni con gr. 0.40 di chinina a partire dal giorno dell'inoculazione - cioè con le usuali dosi profilattiche - non hanno contratto la malattia. Quindi, diversamente da quanto accade in quelli infettati con zanzare, la profilassi in tali condizioni è riuscita efficace.

Dunque l'insuccesso della profilassi medicamentosa e quella della prevenzione delle recidive appaiono legati ad una particolare condizione che si determina nei parassiti fin dall'inizio dell'infezione e soltanto se l'inoculazione è avvenuta per mezzo delle zanzare. I due fenomeni appaiono quindi connessi con l'inoculazione degli sporozoit.

La fase negativa del sangue. - Se da un soggetto inoculato con sporozoit (per puntura di zanzare o per iniezioni del contenuto delle ghiandole salivari sottocute o endovena) si preleva una certa quantità di sangue e si inocula in un soggetto sano, l'infezione non viene trasmessa se non sono passati un certo numero di giorni.

Invece il sangue di un soggetto inoculato con sangue infetto diventa rapidamente infettante e se l'inoculazione è stata fatta per via venosa lo diventa immediatamente.

Tale fenomeno è stato osservato concordemente da vari autori, sia nell'uomo (Boyd e Strathman-Thomas, Raffaele e De Sanctis Monaldi, Ciuca) sia negli uccelli (Raffaele, Warren e Coggeshall, Mudrow, Decourt e Schneider). Lo scrivente e De Sanctis Monaldi dimostrarono (1937) che neanche con la trasfusione di cc. 250 di sangue tratto da un paziente infettato con sporozoit si può infettare un paziente sano se non sono trascorsi almeno quattro giorni dall'inoculazione.

Se gli sporozoi penetrassero direttamente nei globuli rossi il sangue dovrebbe riuscire infettante in poche ore, dato che tale penetrazione, secondo lo Schaudinn, avverrebbe in tempo molto breve e che un solo globulo rosso infetto è sufficiente a produrre l'infezione (Demidowa, Manwell e Goldstein).

L'incubazione nella malaria inocolata sperimentalmente. — Se si inocula in un soggetto sano sangue infetto, maggiore è il numero dei parassiti inoculati più breve sarà il periodo d'incubazione. Con dosi adeguatamente elevate di parassiti l'incubazione si annulla e la malattia ha inizio subito (Korteweg e De Jong, Boyd, Assendelft, Raffaele). Inoculando invece sporozoi, comunque se ne aumenti il loro numero, la durata del periodo d'incubazione non scende mai al disotto di un certo limite a raggiungere il quale sono sufficienti anche dosi relativamente piccole di sporozoi (Raffaele).

De Sanctis Monaldi (1935) sperimentando con *Plasmodium vivax* ebbe 15 giorni d'incubazione inoculando 2.500 sporozoi e 17 giorni inocolandone 100.000.

Se gli sporozoi penetrassero direttamente nei globuli rossi, aumentando il loro numero si dovrebbe potere rendere praticamente nullo il periodo d'incubazione come accade se si inocula sangue infetto, cosa che non si verifica.

Dai fatti esposti appare evidente che il comportamento dell'infezione — per quanto riguarda l'incubazione, la fase negativa del sangue, le recidive e la risposta ai farmaci — è profondamente dissimile a seconda che si inocolino sporozoi, come avviene in condizioni naturali, ovvero sangue infetto; la qual cosa sarebbe di per se stessa sufficiente a dimostrare la poca attendibilità dell'assunto, secondo cui l'infezione avrebbe inizio nei globuli rossi. Ma fatti ancora più decisivi hanno definitivamente abbattuta tale concezione.

I PARASSITI APIMENTATI NELLA MALARIA AVIARIA.

Lo studio della malaria degli uccelli è riuscito molte volte a chiarire fenomeni che apparivano oscuri nella malaria umana e gran parte della biologia del parassita malarico umano è stata conosciuta attraverso ricerche compiute sugli uccelli.

Nel 1934, dopo aver inutilmente tentato con i più vari accorgimenti di tecnica di ripetere le esperienze dello Schaudinn sulla penetrazione degli sporozoitii nei globuli rossi, richiamai l'attenzione degli studiosi sul particolare comportamento di un parassita della malaria dei passeracei, *Plasmodium elongatum*, il quale possedeva la facoltà di svilupparsi oltre che nei globuli rossi anche entro le cellule del reticolo endotelio. Poichè le esperienze eseguite mi avevano indotto ad escludere ogni possibilità di una diretta penetrazione degli sporozoitii nei globuli rossi, sostenni che lo sviluppo iniziale dei parassiti malarici dovesse avvenire nelle cellule del reticolo endotelio e come prova di una simile possibilità addussi le mie osservazioni su *P. elongatum*.

Ma ricerche estese e minuziose dell'anno successivo eseguite da Huff e Bloom (1935) su tale parassita sembravano in opposizione con quanto veniva da me sostenuto poichè gli autori americani giudicarono che *P. elongatum* per il suo particolare comportamento andasse invece zoologicamente separato dai parassiti della malaria propriamente detti (plasmodidi).

In effetti la peculiare biologia di *P. elongatum* non appariva da sola sufficiente a trarne una legge a carattere generale. Occorreva perciò dimostrare che il presunto ciclo di evoluzione nelle cellule del reticolo endotelio occorresse anche in altri parassiti.

Pur proseguendo nelle mie ricerche su *P. elongatum*, estesi le indagini ad un altro parassita della malaria aviaria, *P. relictum*, di comportamento affatto simile ai parassiti della malaria umana. Mentre negli uccelli morti d'infezione da *P. elongatum* lo sviluppo di parassiti nel reticolo endotelio appariva rigogliosissimo, in quelli morti d'infezione da *P. relictum* nulla del genere si riusciva ad osservare; il reperto parassitario degli organi interni non presentava aspetti diversi da quello del sangue periferico, condizioni quindi del tutto simili a quelle della malaria umana.

Ma partendo dal presupposto che gli sporozoitii introdotti dalle zanzare nell'organismo penetrassero nelle cellule del reticolo endotelio ove si sarebbe svolto il primo ciclo di evoluzione dei parassiti, ero indotto a pensare che probabilmente in alcune forme d'infezione malarica, e probabilmente in quella da *P. relictum*, lo sviluppo dei parassiti nel reticolo endotelio si sarebbe

potuto osservare più agevolmente nel periodo iniziale dell'infezione, poichè poteva darsi che col passare in circolo dei parassiti già adattati all'evoluzione negli eritrociti, il numero di quelli che continuassero lo sviluppo nelle cellule reticolo-endoteliali fosse così esiguo da rendere la ricerca praticamente inesequibile.

Sviluppo di Haemoproteus. — Tale possibilità veniva suggerita dalla biologia di alcuni emosporidi assai comuni negli uccelli, appartenenti al genere *Haemoproteus*, molto affini ai parassiti della malaria, i quali compiono il loro ciclo asessuale esclusivamente nelle cellule del reticolo endotelio; entro i globuli rossi si sviluppano soltanto i gametociti. In tali infezioni i parassiti della fase asessuale si rinvergono con facilità soltanto all'inizio dell'infezione, cioè dopo l'inoculazione degli sporozoiti, ma quando gli schizonti cominciano a produrre merozoiti destinati ad invadere i globuli rossi per trasformarsi in gametociti, il numero dei parassiti asessuali si riduce rapidamente per cui essi diventano così rari da riuscire praticamente irreperibili. Evidentemente la prima generazione che deriva dagli sporozoiti e quelle immediatamente seguenti danno origine a merozoiti ancora inadatti ad invadere i globuli rossi, i quali penetrano entro nuove cellule del reticolo endotelio e si trasformano ancora in schizonti. Il loro numero quindi aumenta ed essi diventano facilmente osservabili negli organi interni (particolarmente nei polmoni). Ciò si può desumere dal fatto che non è possibile nella pratica ordinaria osservare schizonti negli organi prima di 15, 17 giorni dopo l'inoculazione degli sporozoiti. È necessario un mese circa perchè i primi gametociti compaiano nel sangue, ma una volta comparsi il loro numero cresce rapidamente mentre diminuisce quello delle forme asessuate negli organi. È chiaro quindi che ad un certo punto la maggioranza dei merozoiti prodotti invade i globuli rossi per trasformarsi in gametociti, mentre una piccola parte di essi conserva la facoltà di sviluppare forme asessuate le quali rimangono disperse nell'organismo.

Sviluppo di P. relictum. — Il comportamento ora descritto degli emoproteidi rendeva quindi verosimile l'ipotesi che qualche cosa di analogo dovesse avvenire anche in *P. relictum* degli uccelli e

quindi vennero da me condotte esperienze sul contenuto degli organi interni dei canarini inoculati con dosi massive di sporozoi, nei primi giorni dell'infezione. Potetti così constatare che le mie previsioni non erano errate e che, esaminando soprattutto il fegato e la milza, si osservavano parassiti in evoluzione nelle cellule del reticolo endotelio. Tale reperto era così scarso che furono necessarie lunghe e laboriose ricerche per stabilire le reali relazioni esistenti tra tali parassiti e quelli del sangue dai quali apparivano notevolmente diversi. Ma la costanza del reperto ed il fatto che era osservabile soltanto nei canarini inoculati con sporozoi mentre non lo era in quelli inoculati con sangue infetto, mi indussero nel convincimento che i corpi osservati rappresentassero la fase iniziale prevista di sviluppo degli sporozoi. Ciò appariva comprovato da ulteriori esperienze da me contemporaneamente eseguite su *P. elongatum*, le quali dimostravano che la diffusione del processo infettivo parassitario nelle cellule degli organi interni precedeva quella nei globuli rossi del sangue.

Nel 1936 resi dunque note le mie osservazioni che provavano come lo sviluppo dei parassiti malarici nelle cellule del reticolo endotelio non fosse un fenomeno particolare di *P. elongatum*, come potevano far pensare le osservazioni precedenti mie e di Huff e Bloom, ma che invece andava considerato come fase obbligata di evoluzione dei parassiti malarici.

E che il fenomeno fosse comune tra i parassiti della malaria venne dimostrato dalle ricerche che seguirono a quelle mie, di James e Tate (1937-38) su *P. gallinaceum*, di Kikuth e Mudrow (1937) su *P. cathemerium*, di Manwell e Goldstein (1939) su *P. circumflexum*.

Ciò per quanto riguarda la malaria degli uccelli; per la malaria umana forme di evoluzione simili a quelle osservate negli uccelli vennero osservate nelle infezioni da *P. vivax* da me (1937), da Tarsitano e Lucrezi (1939), da Bianchi (1940), dal Brug (1940); in quelle da *P. falciparum* da me (1938-40), dal Casini (1939), da Jerace (1939), da Paraense e da Silva (1931); in *P. malariae* da me (1940).

Evidentemente quindi tutti i parassiti della malaria compiono parte della loro evoluzione asessuale nelle cellule del reticolo endotelio.

Caratteri e sede dei parassiti nel reticolo endotelio. — I parassiti che si sviluppano nel reticolo endotelio sono notevolmente diversi da quelli dei globuli rossi; anzitutto *manca in essi il pigmento* e cioè la cosiddetta melanina (emozoina) che tutti i parassiti malarici elaborano dall'emoglobina dei globuli rossi. Inoltre essi non presentano

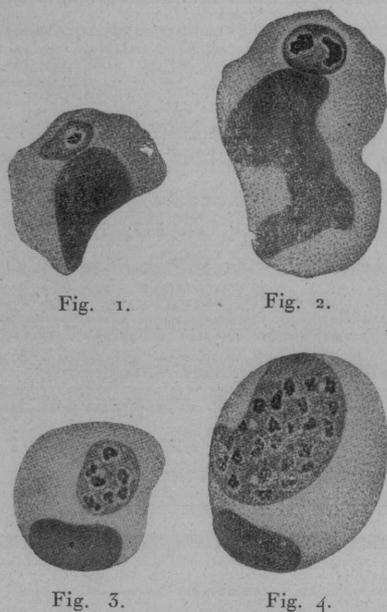


Fig. 1-4. — Trofozoiti e schizonti apigmentati di *Plasmodium catbemerium* entro cellule istiocitarie.

nucleo, ricco di cromatina, occupa la quasi totalità del parassita. È notevole il fatto che mentre i parassiti dei globuli rossi presentano caratteri morfologici che rendono facile distinguere una specie dall'altra, quelli apigmentati sono quasi assolutamente simili nelle diverse specie. Varia soltanto, a volte, il territorio del corpo in cui si diffondono ed il tipo della cellula ospite; alcune specie si sviluppano di preferenza (v. fig. 1-4) in cellule istioidei del fegato, della milza, dei polmoni, del midollo osseo ecc., altre invece invadono anche gli endoteli dei capillari, particolarmente quelli del

evidenti movimenti ameboidi che ne modificano la forma ed i contorni come avviene in quelli degli eritrociti ma, durante l'intero periodo di accrescimento e fino alla segmentazione (schizogonia), conservano forma rotondeggiante od ovalare. Le dimensioni che raggiungono alla fine dello sviluppo sono piuttosto variabili, ma generalmente sono molto più cospicue di quelle dei parassiti del sangue, così pure maggiore è il numero di merozoiti cui danno origine con la sporulazione; sono stati contati in qualche caso oltre 100 merozoiti prodotti da un singolo schizonte ed è frequente quello di 50, 60.

I merozoiti sono più piccoli di quelli prodotti dagli schizonti dei globuli rossi e appaiono meno ricchi di citoplasma, perchè il

cervello. Ad esempio, tra i parassiti degli uccelli, *P. cathemerium* e *P. gallinaceum*, si sviluppano rigogliosamente negli endoteli dei capillari cerebrali (v. fig. 5 e 6).

Col variare della specie dell'ospite può variare anche il comportamento del parassita, così *P. relictum* che nei passeracei (passeri, canarini ecc.) dà luogo ad un reperto di forme apigmentate sempre scarsissimo, e si trova generalmente entro gli istiociti, inoculato nei pinguini si sviluppa invece rigogliosamente in tutti gli organi



Fig. 5.

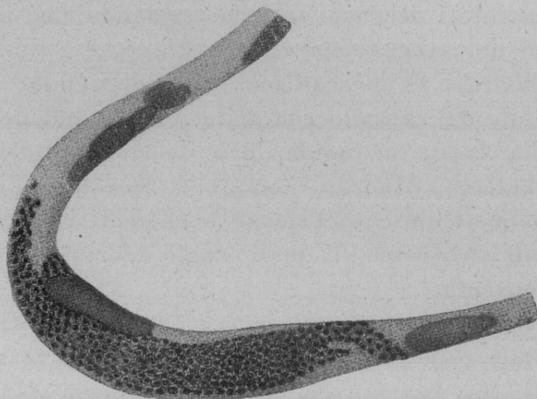


Fig. 6.

Fig. 5 e 6. - Schizonti apigmentati di *Plasmodium gallinaceum* nell'endotelio dei capillari cerebrali.

ed invade diffusamente gli endoteli dei capillari cerebrali (Rodhain) il che nei passeracei non sembra che accada.

I parassiti in evoluzione nei tessuti sono stati denominati *forme apigmentate* o *stadi esocitocitici* o, più brevemente, *stadi E*.

DOPPIO CICLO SCHIZOGONICO DEI PARASSITI MALARICI.

La scoperta delle forme apigmentate e la constatazione della loro presenza negli organi interni durante i primi giorni dell'infezione dopo l'inoculazione degli sporozoitici mi hanno indotto a considerare la fase apigmentata come fase iniziale di sviluppo degli sporo-

zoiti inoculati dalle zanzare. Ho distinto quindi (1938) il ciclo monogonico o asessuale dei parassiti malarici in due fasi: 1° *Fase monogonica primaria*, la quale ha inizio con la puntura di una zanzara infetta (fig. 7). Gli sporozoiti inoculati nell'organismo penetrano nelle cellule del reticolo endotelio ove si trasformano in schizonti apigmentati, i quali, riproducendosi, danno origine a due tipi di merozoiti: *istotropi* i quali ritornano nelle cellule del reticolo endotelio e producono nuovi schizonti apigmentati; *emotropi*, i quali penetrano nei globuli rossi. 2° *Fase monogonica secondaria*. Negli eritrociti i merozoiti emotropi si trasformano nei comuni parassiti pigmentati del ciclo febbrigeno, dando così inizio al processo infettivo del sangue ben conosciuto.

Riguardo al meccanismo di penetrazione degli sporozoiti nelle cellule del reticolo endotelio, esso è difficile ad osservare a causa della facile e rapida loro dispersione nell'organismo. Tuttavia Kikuth e Mudrow (1939) e recentemente la Mudrow (1942) con meticolose esperienze e pazienti ricerche hanno descritto gli stadi attraverso i quali dagli sporozoiti si giunge ai parassiti apigmentati.

Secondo il Missiroli, invece, gli sporozoiti prima di invadere le cellule ospiti si dividerebbero in un certo numero di corpicciuoli figli, tesi ispirata da un antico schema ipotetico del Grassi (*Studi di un zoologo sulla malaria*, 1900) che egli si è prefisso di dimostrare e di cui si è fatto strenuo sostenitore. Tuttavia le varie versioni che egli ha dato del fenomeno ci sembra vadano attribuite ad inesatta interpretazione dell'aspetto della cromatina nucleare degli sporozoiti, la quale per la sua struttura finemente granulare può presentarsi, sia raccolta in una massa unica, sia distribuita in varie massoline più piccole che possono dare l'impressione di una divisione nucleare. Tale giudizio è condiviso dal Reichenow e da Kikuth e Mudrow.

La medesima impressione si ha dalla descrizione fatta recentemente dallo Schulemann (1942) - diversa da quelle del Missiroli - del presunto fenomeno di divisione degli sporozoiti. Afferma però lo Schulemann di aver osservato, già 24 ore dopo l'inoculazione, uno sporozoite in un istiocito ed una forma plurinucleata in un altro. Dopo 48 ore erano osservabili le forme apigmentate nelle

cellule del reticolo endotelio. Accanto a tali forme in evoluzione vi erano numerosi sporozoiti con la cromatina nucleare più o meno suddivisa. È evidente quindi che degli sporozoiti inoculati, soltanto una parte ha trovato la possibilità di evolvere nelle cellule

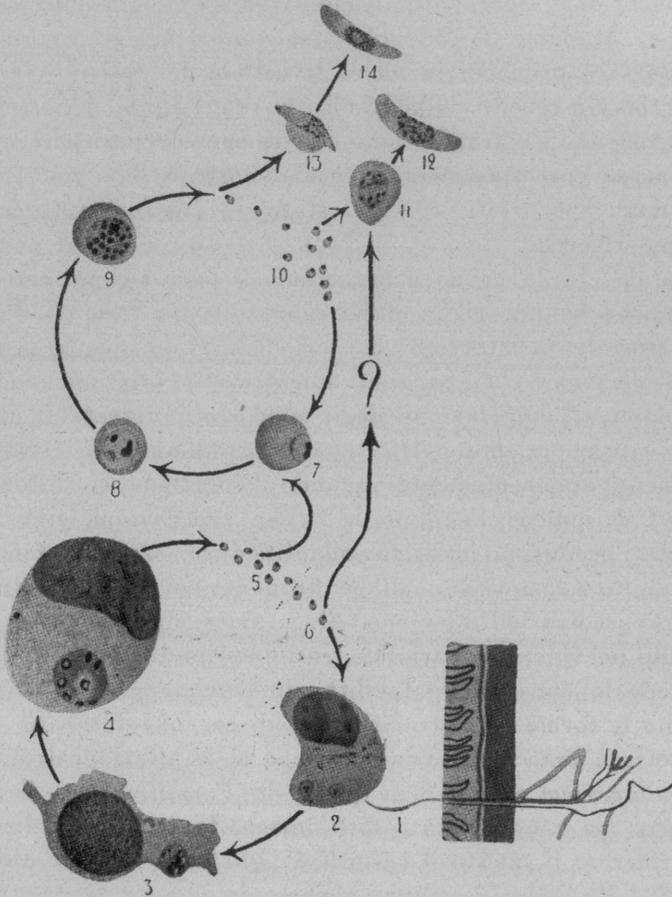


Fig. 7.

Fig. 7. - Schema delle due fasi di sviluppo dei parassiti malarici umani (*Plasmodium falciparum*).

1-6. Fase monogonica primaria esoeritrocitica: 1. Sporozoite; 2 e 3. Trofozoiti apigmentati, 4. Schizonti apigmentati, 5. Merozoiti emotropi; 6. Merozoiti istotropi. 7-12. Fase monogonica secondaria eritrocitica: 7-10. Trofozoiti e schizonti pigmentati; 11-14. Gametociti.

del reticolo endotelio, gli altri hanno finito per degenerare, e difatti vengono descritti come più o meno rigonfi; il fenomeno della dispersione della cromatina nel citoplasma va interpretato poi con ogni verosimiglianza come effetto di cariolisi. Ciò è in accordo con quanto venne osservato da Rozeboom e Shah (1934) e cioè che una buona parte degli sporozoiti inoculati finisce per degenerare.

Kikuth e Mudrow (1939-40) ritenevano che gli sporozoiti si arrotondassero prima di invadere le cellule del reticolo endotelio, ma ricerche più recenti della Mudrow (1942) hanno dimostrato che essi vi penetrano per trasformarsi direttamente in parassiti apigmentati. Rimane così sperimentalmente dimostrato che questi hanno origine dagli sporozoiti, com'era stato da me sostenuto fin dalle prime mie ricerche.

È probabile che la prima generazione di parassiti prodotta dagli schizonti che hanno origine dagli sporozoiti sia formata da merozoiti in prevalenza isotropi; ciò può dedursi da quanto si osserva in *P. relictum* e cioè che i parassiti apigmentati, rarissimi nei 3 giorni che seguono all'inoculazione degli sporozoiti, diventano relativamente più frequenti dopo il 4° giorno per diminuire e scomparire poi, almeno apparentemente, quando l'infezione si diffonde nel sangue. Ciò indica che dopo le prime generazioni, gli schizonti apigmentati producono un'esigua quantità di merozoiti isotropi ed un numero molto maggiore di quelli emotropi per cui i parassiti apigmentati col progredire dell'infezione, diventano sempre meno numerosi. È appunto nel rapporto variabile tra i due tipi di merozoiti prodotti che risiede la causa della facilità più o meno grande con cui si osservano le forme esoeitrocitiche negli organi interni. Se i merozoiti isotropi sono molti, come avviene nelle infezioni degli uccelli da *P. catbemerium* e spesso in quelle da *P. gallinaceum*, il reperto sarà ricco; ma minore sarà il loro numero tanto più difficile diventerà la ricerca. È questo il caso di *P. relictum* e forse di alcuni dei parassiti della malaria umana, almeno da quanto si può dedurre dalle ricerche sinora compiute nell'uomo.

Come è stato da me messo in evidenza (1937) e confermato poi da ogni parte, i parassiti apigmentati possono svilupparsi anche in soggetti inoculati con il sangue e ciò è tanto più facile a verificarsi in quei tipi d'infezione nelle quali il loro sviluppo è molto rigoglioso (*P. elon-*

gatum, *P. cathemerium*, *P. gallinaceum*). Il fenomeno trova la sua naturale spiegazione nel fatto che le forme esoeritrocitiche possono essere presenti nel sangue inoculato, sia perchè passano in circolo per rottura delle cellule endoteliali all'atto della sporulazione, sia per mobilitazione delle cellule istiocitarie che le ospitano e, difatti, quando sono molte, è possibile rinvenirle nei comuni strisci di sangue. Più discussa invece è la possibilità se dagli schizonti pigmentati del sangue possano avere origine merozoiti istotropi, atti cioè a ritornare nelle cellule del reticolo endotelio per svilupparsi come i loro progenitori. Sebbene ciò sia ritenuto regola da molti, personalmente non credo che si possa sempre verificare, e ritengo anzi che in molti casi non avvenga.

Sembrano tuttavia esenti da critiche le esperienze di Coulston e Manwell (1941), i quali con passaggi successivi di *P. circumflexum*, partendo da un canarino infettato (con l'ausilio del micromani-polatore) con un solo globulo rosso infetto hanno osservato le forme apigmentate al 5° ed 11° passaggio. Evidentemente quindi le forme apigmentate in casi eccezionali, inerenti forse alla specie parassitaria o a peculiari condizioni dell'ospite, possono avere origine dai parassiti prodotti entro i globuli rossi. Ho suggerito (1940) che ciò va forse posto in relazione alla facoltà che certe specie di parassiti possiedono di svilupparsi entro gli eritroblasti sprovvisti di emoglobina. In tali cellule ancora non bene differenziate potrebbero eventualmente riacquistare la facoltà di svilupparsi nelle cellule del reticolo endotelio. Infatti in alcune specie che non si sviluppano negli eritroblasti, per esempio *P. relictum*, ciò non sembra che avvenga.

Del resto tali particolari hanno importanza secondaria rispetto all'esistenza dimostrata di una fase di evoluzione dei parassiti malarici diversa da quella che avviene nei globuli rossi, che spiega tanti problemi sinora oscuri dell'infezione malarica.

RESISTENZA AI FARMACI DELLE FORME APIGMENTATE.

Una delle conseguenze, più interessanti della scoperta delle forme apigmentate è stata la constatazione fatta che esse non risentono l'azione di alcun farmaco antimalarico. James e Tate (1938) le

osservarono in un pollo inoculato con sporozoiti di *P. gallinaceum* e trattato preventivamente con 40 mgr. di chinina per 7 giorni a partire dal giorno d'inoculazione. Lo scrivente (1938) in polli infetti e trattati per otto giorni con gr. 0,05 di atebirin rinvenne numerosissime forme esocitocitiche negli organi interni quando i parassiti del sangue erano scomparsi per azione del farmaco. Kikuh e Mudrow (1939) ugualmente osservarono che i canarini inoculati di *P. cathemerium* (con sporozoiti o con emulsione di fegato infetto) e trattati per 5 giorni a partire da quello dell'inoculazione con cospicue dosi di chinina o di atebirin o di plasmochina o di certuna, presentavano negli organi interni un reperto ricchissimo di forme apigmentate. Solo la plasmochina a forte concentrazione mostrò avere una certa azione su di esse.

Si poté quindi dimostrare ciò che si era sospettato in passato per spiegare la causa delle recidive della malaria, e cioè l'esistenza di particolari forme di parassiti, resistenti alla chinina, annidate negli organi interni. Tali forme esistono dunque e sono i parassiti apigmentati, i quali, derivando dagli sporozoiti, sono presenti nell'organismo fin dall'inizio dell'infezione e possono continuare a svilupparsi dopo che l'infezione si è diffusa al sangue. Si deve ad essi l'insuccesso dei farmaci nella profilassi dell'infezione e nella prevenzione delle recidive. Rimane così spiegato uno dei più oscuri enigmi della malaria.

Quando le forme esocitocitiche sono molto numerose negli organi interni e ciò avviene, per quanto si sappia sinora, soltanto in alcuni tipi di malaria degli uccelli, esse possono essere di per se stesse causa di gravi fenomeni morbosi ed anche di morte. Ciò si verifica, ad esempio, nelle infezioni degli uccelli da *P. cathemerium* indotte con sporozoiti, le quali anche se trattate con chinina o atebirina possono avere esito mortale nonostante che i parassiti del sangue vengano continuamente distrutti dal farmaco somministrato. Ma nelle infezioni come quelle da *P. relictum* ed in parecchie di quelle da *P. gallinaceum* il trattamento è sufficiente ad impedire la malattia del sangue o a farla cessare quando è già in corso. In tali casi, sacrificando gli animali dopo la cura, si osserva che le forme apigmentate negli organi interni o sono apparentemente assenti o sono estremamente rare, la qual cosa dimostra che quando

sono in piccolo numero non danno luogo a fenomeni morbosi apprezzabili.

Se invece si lasciano in vita gli animali trattati, si possono rinvenire parassiti nel sangue qualche tempo dopo la fine del trattamento, perchè venendo prodotti nuovi merozoiti emotropi dagli schizonti apigmentati e cessando l'azione dei farmaci questi possono allora svilupparsi e riprodursi nei globuli rossi. I farmaci dunque, se pure non sopprimono l'infezione, agiscono contro i parassiti del sangue e quando la malattia è praticamente data soltanto da questi, come avviene in molte infezioni malariche e soprattutto in quelle umane, il trattamento sia preventivo sia curativo elimina i fenomeni morbosi con le loro incresciose ed a volte mortali conseguenze.

LA FASE MONOGONICA PRIMARIA NELLA MALARIA UMANA.

Come si è già detto sopra, è stata dimostrata l'esistenza di parassiti apigmentati in tutte le forme d'infezione malarica umana. Che vi fossero appariva già naturale per analogia con quanto si era potuto osservare nella malaria degli uccelli in tutto simile a quella umana, ma sembrava a molti strano che esse fossero per tanto tempo sfuggite all'attenzione degli studiosi. Ma ciò non avrebbe dovuto sorprendere; bastava riflettere che anche per la malaria degli uccelli, non meno studiata di quella umana, il fenomeno era sfuggito nonostante la relativa facilità con cui in molti casi si osserva. Nell'uomo le forme apigmentate sembrano essere in numero piuttosto limitato; ma se è tanto difficile in certi casi rinvenirle negli organi di piccoli uccelli quali i canarini, è ben naturale che la ricerca possa riuscire difficile nell'uomo di cui, tranne che nei casi mortali, è impossibile esaminare gli organi interni se non attraverso i pochi frammenti che si possono ottenere per puntura ed aspirazione dagli organi. Aver rinvenuto qualche parassita apigmentato rappresenta già un successo notevolissimo. Abbiamo visto che nelle infezioni degli uccelli da *P. relictum* le forme esoeitrocitiche si osservano soltanto sacrificando l'animale nei primi giorni dell'infezione ed è molto probabile che nella malaria umana la loro maggior diffusione si abbia all'inizio dell'infezione, poichè sono state da me rinvenute soprattutto nel puntato

sternale tra il 5° e il 6° giorno d'incubazione. Ciò almeno per quanto riguarda *P. vivax* e *P. falciparum*.

Tenendo presente il decorso ed il comportamento della malaria umana si direbbe che gli schizonti apigmentati abbiano, di solito, tendenza a produrre merozoiti in maggioranza emotropi, per cui il numero di parassiti apigmentati, dopo le prime generazioni, tende rapidamente a ridursi. A mantenere l'infezione nell'organismo ne bastano pochissimi, ed è quindi solo per caso fortunato o con una ricerca molto prolungata che si possono rinvenire.

I primi merozoiti prodotti dalle forme apigmentate possono trovarsi in circolo dopo il 4° giorno d'incubazione: nelle infezioni da *P. vivax* e da *P. falciparum* il sangue può essere infettante verso un soggetto sano al 5° giorno d'incubazione. Con ricerche in goccia spessa molto prolungate una volta mi è stato possibile rinvenire rarissimi trofozoiti di *P. falciparum* al 5° giorno d'incubazione, e De Sanctis Monaldi (1935) in 70 ore di osservazione ne osservò due nel sangue al 4° giorno. Ciò dimostra che, come si osserva nelle infezioni degli uccelli da *P. relictum* e *P. cathemerium*, lo sviluppo della prima generazione di parassiti apigmentati derivanti dagli sporozoiti si svolge in un periodo di tempo variabile tra 72 e 96 ore. Ma perchè la presenza di parassiti nel sangue sia dimostrabile biologicamente o microscopicamente è necessario tuttavia spesso un tempo maggiore.

Per le infezioni da *P. malariae* non si possono sinora fornire dati sulla durata della prima generazione apigmentata.

Il decorso delle varie forme di malaria umana ci dà approssimativamente un'idea del comportamento ulteriore della fase monogonica primaria.

Nell'infezione da *P. falciparum* le forme apigmentate non sembra che permangano a lungo nell'organismo; difatti la terzana maligna, pur essendo la forma più grave d'infezione è quella che trattata guarisce definitivamente nel tempo più breve: da 5 a 8 mesi, raramente raggiunge un anno di durata (compreso l'attacco primario e le recidive).

L'infezione da *P. vivax* nel 40, 50 % dei casi non recidiva dopo il trattamento dell'attacco primario e quando recidiva non dura di solito più di due anni. Si deve desumere quindi che in circa la

metà dei casi di terzana benigna gli schizonti apigmentati si risolvono facilmente in merozoiti emotropi, i quali possono venir distrutti dai farmaci. Nei casi in cui nonostante il trattamento si hanno recidive più o meno protratte, deve esservi una persistente produzione di merozoiti istotropi, i quali mantengono l'infezione nel reticolo endotelio.

L'infezione da *P. malariae* è quella che può durare più a lungo, nonostante la cura e ne sono citati casi recidivanti dopo molti anni dal loro inizio. Evidentemente le forme apigmentate di *P. malariae* possono persistere molto a lungo nell'organismo, la qual cosa parrebbe indicare che il numero di merozoiti istotropi prodotti dagli schizonti apigmentati possa essere piuttosto abbondante. Ma non sono rari i casi di malaria, soprattutto tra le infezioni da *P. vivax*, i quali guariscono senza trattamento, guarigione spontanea, come si suol dire, che può stabilirsi sia dopo l'attacco primario sia attraverso una o più recidive. In tali casi entrano in gioco i fattori immunitari sviluppati dall'ospite, i quali possono agire sulle forme pigmentate eritrocitiche come su quelle apigmentate esoeritrocitiche. È ovvio quindi che anche nei casi trattati con i farmaci essi debbano avere la loro parte nel determinare la scomparsa dell'infezione, ed è quindi probabile che le forme apigmentate possano scomparire dagli organi interni, sia perchè si esaurisce la facoltà di formare merozoiti istotropi, sia per l'azione che contro di esse esercitano i poteri difensivi sviluppati dall'ospite. Più difficile riesce stabilire perchè nelle infezioni da *P. vivax* inoculate col sangue non si abbiano recidive; certamente il fatto è dovuto all'assenza, in tali condizioni, delle forme apigmentate, ed il fenomeno dimostra che certamente nella terzana benigna le forme apigmentate non hanno mai origine dai parassiti del sangue. A spiegare la loro assenza si possono invocare due cause: o che per la estrema scarsità esse siano così rare in circolo da esser presenti solo eccezionalmente nel sangue inoculato, oppure che non sopravvivano nel nuovo ospite. Ciò non è inverosimile se si tiene presente che le infezioni da *Haemoproteus* degli uccelli non sono inoculabili con il sangue pur essendo presenti in circolo i merozoiti prodotti dagli schizonti degli organi interni ed anche, secondo Aragao, gli schizonti stessi.

