ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCC.

1903

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XII.

1° Semestre.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1903

tuale, altre no. Se sia realmente così, e, nel caso affermativo, di quali processi chimici si tratti, tale importante questione, forse molto difficile a risolversi, è per ora completamente aperta.

Venendo ad esaminare quali siano le specie che si sono conservate, e quali no, troviamo, tra le prime, l'Euplotes charon e il Chilodon cucullulus, specie descritte dagli autori come viventi tanto nel mare che nell'acqua dolce; tra le seconde, l'Euplotes harpa, che gli autori descrivono come solo marina, e molte altre specie, delle quali non ho parlato in modo speciale, ma che appartengono unicamente alla fauna marina. Di più, non ha sopravvissuto l'Uronema marinum, specie di cui si dice che viva anche nell'acqua dolce. Ma quanto a questa specie, vi è discussione, e sembra, per quello che ne dice il Blochmann (¹), che non sempre si tratti della medesima specie, tutte le volte che si parla di Uronema marinum; nè io potrei assicurare di quale Uronema marinum si trattasse nelle mie esperienze.

Il caso più caratteristico ci è dunque offerto dai due Euplotes, di cui uno si può adattare alla vita d'acqua dolce, l'altro no. Le mie esperienze hanno perciò confermato sperimentalmente che l'Euplotes charon ed il Chilodon cucullulus marini e di acqua dolce sono realmente la stessa specie, ed hanno dimostrato che l'Euplotes harpa non si trova nell'acqua dolce perchè non vi si può trovare.

Nelle specie studiate, quelle adattabili alla vita nell'acqua dolce non differiscono dunque da quelle non adattabili per proprietà osmotiche o di permeabilità; la ragione della differenza deve risiedere nelle diverse particolarità dei processi chimici che si svolgono nei varî organismi.

Parassitologia. — Studio sui Cytoryctes vaccinae (°). Nota II preliminare della dr. Anna Foà, presentata dal Socio Grassi.

Parte II. — Mentre sottoponevamo la cornea a diversi trattamenti per confrontare le sue proprietà con quelle del vaccino, abbiamo seguito il modo di comportarsi dei *Cytoryctes* in questi varî ambienti.

Le esperienze venivano generalmente condotte in questo modo: si innestava un coniglio in tutti e due gli occhi procurando per quanto era possibile di avere nelle due cornee un'infezione della stessa intensità. Il coniglio veniva ucciso dopo due giorni e mezzo o tre, cioè quando erano già comparse tutte le forme dei supposti parassiti e non erano ancora caduti estesi tratti di epitelio. Le due cornee venivano trattate contemporaneamente nello stesso

⁽¹⁾ Blochmann Fr., Die Mikroskopische Thierwelt des Süsswassers. Abth. I Protozoa. Hamburg, 1895 (pag. 99).

⁽²) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Anatomia comparata della R. Università di Roma

modo, poi l'una veniva adoperata per innestare un altro coniglio, l'altra serviva per l'osservazione dei Cytoryctes.

Tutti gli esperimenti furono ripetuti parecchie volte; ne riassumo i risultati.

Azione della glicerina. — Le cornee di coniglio innestate con vaccino furono messe in glicerina concentrata. Ne furono staccati frammenti di epitelio una volta dopo tre ore, un'altra volta dopo 24 ore, con questi frammenti furono innestati altri conigli; si ebbe in tutte e due i casi un'infezione notevolissima. Non abbiamo insistito ulteriormente perchè altri (Gorini) aveva già dimostrato che il virus corneale si conserva in glicerina per un tempo assai lungo. Più importante era l'osservare il comportarsi dei Cytoryctes, e per questo, raschiati dei frammenti di epitelio, ne furono fatti dei preparati chiudendoli nella glicerina stessa. Questi preparati esaminati parecchi mesi dopo, presentavano ancora i Cytoryctes coi loro granuli perfettamente conservati, eguali a quelli osservati nei preparati a fresco.

Questo aveva fatto nascere la speranza di riconoscere nei Cytoryctes i veri parassiti.

Disseccamento. — Anche il virus corneale disseccato, come le pustole cutanee di vitella, si è dimostrato attivo. Le cornee disseccate, adoperate per lo studio dei Cytoryctes furono fissate con sublimato, colorite coll'emallume o coll'ematossilina ferrica.

Maggiori particolari saranno pubblicati nel lavoro in esteso, qui accenniamo ai resultati.

Nelle cellule epiteliali si vedevano i nuclei assai raggrinzati, e a volte accanto ad essi si notavano con gran difficoltà dei corpicciuoli intensamente coloriti che per la loro posizione nella cellula potevano ritenersi Cytoryctes enormemente rimpiccoliti. Non era escluso tuttavia che i Cytorytes anche così ridotti potessero essere attivi, ma in tal caso era logico supporre che, rimessi in un mezzo adatto, potessero riprendere i caratteri primitivi. Per accertarcene abbiamo ripetuto gli esperimenti rimettendo le cornee disseccate nell'acqua distillata e lasciandovele uno o due giorni. Esse si dimostrarono ancora attive, ma conservate coi soliti mezzi, sezionate ed esaminate con gran cura solo con grandissima difficoltà lasciavano scorgere qualche traccia dei corpuscoli vaccinici. Nelle vicinanze del luogo d'innesto le cellule epiteliali presentavano i nuclei alterati ed alcune mostravano nel protoplasma piccoli corpicciuoli intensamente coloriti, circondati da un alone chiaro. Se questi corpicciuoli erano i Cytoryctes certamente non avevano ripreso l'aspetto primitivo, ma erano ancora assai raggrinziti.

Azione dell'acqua distillata. — Abbiamo dimostrato sperimentalmente che anche il virus corneale si mantiene attivo per lungo tempo nell'acqua distillata. Le prime esperienze furono da noi fatte innestando l'epitelio corneale rimasto nell'acqua per tre giorni. Più tardi, avendo tentato esperimenti di

filtrazione col virus corneale, abbiamo ripetuto le esperienze inoculando l'acqua torbida in cui erano state immerse le cornee infette per sette ed anche nove giorni. In tutti i casi si è ottenuta l'infezione in altri conigli.

Per studiare il modo di comportarsi dei Cytoryctes abbiamo esaminato le cornee lasciate in acqua un'ora, un'ora e $^{1}/_{2}$, 6 ore, 24 ore.

Dopo un'ora i Cytoryctes erano poco alterati, dopo un'ora e ¹/₂ il loro numero era già minore perchè parecchie cellule nel luogo dell'infezione non li presentavano più, quelli rimasti presentavano un'alterazione che si manifestava nel diverso modo di comportarsi colle sostanze coloranti; infatti nei preparati fissati coi soliti mezzi, coloriti con emallume ed eosina, invece del solito colore violaceo tendevano ad acquistare una tinta rosea.

Dopo sei ore il loro numero era ancora diminuito. Esaminando con grandissima attenzione a forte ingrandimento i preparati coloriti coll'ematossilina ferrica, in alcune cellule epiteliali nel luogo corrispondente al taglio fatto per l'innesto, si vedevano con gran difficoltà attorno ai nuclei estese macchie di aspetto reticolare, sparse di granuli. Siccome queste macchie non si vedevano che nel luogo dell'infezione, bisogna concludere ch'esse rappresentavano, a così dire, un'ombra dei *Cytoryctes* enormemente rigonfiati. È assai importante notare che spesso non era possibile determinare il limite tra queste ombre ed il protoplasma cellulare.

Dopo 24 ore, neanche nel punto in cui fu praticata l'iniezione, non si è più potuto riscontrare nulla che potesse rappresentare i *Cytoryctes*, comunque modificati.

Non abbiamo potuto proseguire le ricerche microscopiche dopo una più lunga permanenza nell'acqua, perchè i lembi infetti di epitelio si distaccano via e le cellule si separano con estrema facilità sì che non è più possibile conservarlo; ma i risultati ottenuti bastano per conchiudere che mentre l'attività del vaccino non si distrugge nell'acqua distillata, i Cytoryctes si alterano enormemente e finiscono per scomparire.

Azione delle soluzioni di cloruro di sodio. — L'idea di trattare l'epitelio corneale di coniglio con soluzioni acquose di cloruro di sodio fu suggerita dal dubbio che a costituire i Cytoryctes potesse contribuire l'eleidina. Il Ranvier dimostrò che facendo agire sull'epidermide dei mammiferi una soluzione di cloruro di sodio al 10 %, l'eleidina granulosa che si trova nello strato granuloso, si trasforma nell'eleidina diffusa, che si trova nello strato intermedio compreso tra lo strato granuloso e lo strato lucido. Con questo stesso reattivo abbiamo trattata la cornea di coniglio innestata con vaccino.

È facile dimostrare che l'eleidina non ha niente a che fare coi Cytoryctes osservando le sezioni di pustole vacciniche cutanee di coniglio. Noi abbiamo ottenuto queste pustole innestando il vaccino sulle labbra e sul dorso del coniglio. Nelle sezioni della pelle del labbro, fissata con sublimato e colorita coll'emallume si vedono i Cytoryctes analoghi a quelli che si trovano nella

cornea, coloriti meno intensamente dei nuclei delle cellule epidermiche, mentre si distinguono benissimo i granuli di eleidina coloriti fortemente in violetto, tanto intensamente quanto la cromatina dei nuclei cellulari. Collo stesso pezzo abbiamo fatto sezioni colorite col metodo di Biondi; in queste mentre i Cytoryctes si vedono benissimo, l'eleidina non si distingue più nettamente.

Esaminando l'epitelio corneale di coniglio innestato con vaccino, tenuto per 24 ore in soluzione di cloruro di sodio al 10 %, si direbbe a tutta prima che i supposti parassiti fossero scomparsi. Nei preparati a fresco in acqua e glicerina, mezzo in cui i Cytoryctes normali si osservano facilmente, non siamo più riusciti a scoprirne le traccie. Nelle sezioni ottenute fissando l'epitelio in sublimato, colorendolo coll'emallume, non si rinvenne a tutta prima nessun corpuscolo vaccinico. Però con ricerche accuratissime in sezioni molto sottili, si trovarono alcuni pochi corpicciuoli che si riconobbero quali resti di Cytoryctes, perchè si rinvennero solo accanto ai nuclei di alcune cellule in vicinanza del punto in cui fu praticato il taglio, ma che di Cytoryctes non conservavano neanche la più lontana apparenza. Si presentavano infatti come corpuscoli minutissimi irregolari, congiunti quasi sempre con filamenti sottilissimi al protoplasma cellulare.

Prolungando l'azione della soluzione di cloruro di sodio al 10 % per 37 ore, 48 ore, e anche per quattro giorni, i preparati dell'epitelio si presentarono presso a poco nello stesso modo. Non ostante questa profonda alterazione dei Cytoryctes l'epitelio innestato in altri conigli, in tutti i casi ha prodotto ancora la formazione di Cytoryctes normali in quantità certamente non minore di quella ottenuta coll'innesto del vaccino non alterato.

Perfino dopo aver tenuto la cornea in cloruro di sodio per quattro giorni, non era distrutta l'attività del vaccino.

Questi resultati importantissimi ci hanno indotto a continuare le esperienze variando l'intensità della soluzione. Abbiamo perciò trattato il virus corneale con soluzione satura di cloruro di sodio, tenendovelo per 24 ore. In questo caso, forse per l'azione più energica e rapida del reattivo, i Cytoryctes sono rimasti impiccoliti, ma meno alterati che nella soluzione precedente: sembra abbiano subìto una sorta di fissazione. L'epitelio si è dimostrato ancora attivo.

Abbiamo cercato se fosse stato possibile seguire meglio le alterazioni dei Cytoryctes trattandoli con soluzioni deboli, e per questo abbiamo usata la soluzione di cloruro di sodio al 2 %. Le cornee infette furono fissate coi soliti mezzi dopo averle lasciate nel reattivo per sei ore. I Cytoryctes apparivano più piccoli, meno numerosi e si comportavano diversamente colle sostanze coloranti. Nei preparati coloriti con ematossilina ferrica ed eosina, le forme più piccole tondeggianti, invece del solito colore nero intenso prendevano una tinta rossastra, nelle cellule epiteliali più vicine al taglio, dove si trovano sempre le forme più grandi, spesso si vedevano solo tanti granuli

sparsi per il protoplasma e non si riconosceva sotto ai granuli la massa chiara, a volte s'intravedeva ma assai poco colorita.

Riassumendo: questa seconda serie di ricerche ha dimostrato che i *Cytoryctes* possono alterarsi in svariatissimi modi fino a scomparire, senza che il vaccino perda la propria attività.

Parte terza. Studi sulla clavelée. — Queste ricerche furono intraprese in seguito alle pubblicazioni del Bosc, il quale studiando il vaiolo
delle pecore (clavelée) descrisse forme analoghe a quelle che si riscontrano
nel vaccino, ma a quanto appariva dalle figure del Bosc, secondo ogni probabilità, più facili ad essere interpretate. Noi ne intraprendemmo lo studio
colla speranza che ne venisse qualche sulla natura dei corpuscoli vaccinici.

Innestammo la *clavelée* (gentilmente inviataci dallo stesso prof. Bosc e poi dal prof. Nocard) in parecchie pecore, e studiammo le pustole cutanee sviluppatesi su di esse, servendoci degli stessi mezzi di fissazione e colorazione usati per lo studio dei *Cytoryctes vaccinae*.

Senza entrare per ora in una descrizione particolareggiata, possiamo dire in generale che i corpuscoli della clavelée presentano somiglianza coi corpuscoli vaccinici. Nei preparati ottenuti da pezzi fissati in soluzione satura di sublimato con 0,50 % di cloruro di sodio, coloriti colla miscela di Biondi, i corpuscoli della clavelée apparivano costituiti da una massa azzurra di dimensioni svariate, e da una quantità di granuli rossi. A differenza di quanto si osservava nei corpuscoli vaccinici, si notava spesso un granulo centrale assai più grande di tutti gli altri, e tale da apparir quasi come un nucleo, ma questo grosso granulo a volte mancava, spesso era rotondo, talvolta ovale a cifra otto, o doppio. Gli altri granuli erano disposti in maniere variabilissime, per lo più se ne trovavano parecchi alquanto allontanati dalla massa azzurra e congiunti ad essa per mezzo di fili sottilissimi disposti a raggiera, altri erano separati affatto ed isolati nel protoplasma cellulare. Questi corpuscoli si vedevano sopratutto abbondantissimi nelle ghiandole sebacee dov'erano situati accanto ai nuclei, uno per cellula, come i Cytoryctes.

Certamente queste forme di struttura così complicata, a tutta prima per il loro aspetto fanno pensare ad esseri viventi, ed anzi a protozoi, ma anche qui studiando con attenzione, non si riesce a stabilire i confini del supposto parassita, perchè in alcune forme i granuli si spargono in tutte le direzioni e vengono a trovarsi in grandissima parte del protoplasma cellulare. Non si segue un ciclo di sviluppo, che in forme così grandi dovrebbe riscontrarsi facilmente. Inoltre, a contrastare la loro natura parassitaria si aggiunge il fatto che il virus della clavelée può passare attraverso la candela F, di Chamberland. Le esperienze a questo proposito furono fatte da Borrel, il quale ha ottenuto un filtrato attivo col contenuto di una pustola

diluito in 100 cm³ d'acqua. Il liquido filtrato era ancora attivo, diluito 100 volte ed in alcuni casi anche 500.

Questi resultati sono di grandissimo valore anche perchè, dimostrando l'attività delle soluzioni diluitissime, dànno un fondato motivo per dubitare che le supposte culture di vaccino, ottenute dall'Ishigami solo par poche generazioni, non sieno altro che diluizioni del primo virus inoculato.

Conclusioni. — Da quanto abbiamo esposto ci sembra si possano ricavare le conclusioni seguenti:

I. La struttura dei Cytoryctes non rivela in essi nessun carattere che possa farli riconoscere per esseri vivi. I movimenti ameboidi non furono riscontrati non solo da noi, ma neanche dall'Hückel, le cui osservazioni, per comune consenso, sono ritenute esattissime; non si distingue un protoplasma ed un nucleo, e neanche la presenza di cromidi o di rete cromidiale, manca un ciclo di sviluppo. Tutti questi caratteri escludono che si tratti di protozoi.

Alcune forme potrebbero far pensare a bacteri, ma la struttura di bacterio non si può dimostrare (infatti mancano i cromidi, manca la cosidetta membrana, non vi sono cilia, non si ottennero mai fenomeni di plasmolisi. Non si colorano come i bacteri).

La supposizione che i granuli fossero essi stessi i bacteri o forme durature, da noi presa in considerazione, si è dovuta escludere perchè i granuli stanno sempre alla superficie e mai nell'interno del supposto parassita, per la loro somma irregolarità, per il loro modo di comportarsi colle sostanze coloranti ecc.

Infine non si può stabilire un limite tra il supposto parassita e le forme che sono sicure alterazioni del protoplasma cellulare.

II. Mentre il virus corneale sottoposto all'azione del disseccamento, dell'acqua distillata, delle soluzioni di cloruro di sodio, conserva la propria attività, i *Cytoryctes* si alterano enormemente o scompaiono affatto.

In nessun caso, in nessuno stadio si osserva la formazione di cisti protettive, fatto che si verifica in tutti i protozoi capaci di resistere a mutamenti d'ambienti e sopravvivere ad una permanenza in ambienti sfavorevoli. Non si riscontrano forme paragonabili alle spore durature dei bacteri.

III. Il fatto che il virus della clavelée passa attraverso la candela F di Chamberland, pur essendo i corpuscoli della clavelée certamente non più piccoli dei corpuscoli vaccinici, dimostra che i risultati negativi costantemente ottenuti nei tentativi di filtrazione del vaccino, non bastano a provare che i parassiti del vaccino debbano avere dimensioni considerevoli e quindi essere identificati coi Cytoryctes.

Per tutti questi motivi noi riteniamo che i *Cytoryctes* non sono esseri viventi parassiti del vaccino, senza però escludere che essi possano contenere i veri parassiti, non visibili coi nostri mezzi attuali d'indagine.