

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCII.

1905

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVICCI

1905

Resta ora da determinare quali rapporti il grado di acidità delle foglie direttamente o come indice di altre modificazioni dei processi fisiologici normali della pianta ospite, abbia con la vita parassitaria del fungo e più particolarmente nel realizzare le condizioni favorevoli alla germinazione delle ploidiospore. Una tale questione alla quale è strettamente legata la ricerca di un metodo di lotta contro la malattia, sarà oggetto di ulteriori studi.

Istologia. — *Intorno ai reperti del dott. John Siegel sul ciclo dei corpi di Guarnieri* (1). Nota di GIUSEPPE RICCIOLI, presentata dal Socio B. GRASSI.

I corpi di Guarnieri furono oggetto di molti studi nel laboratorio diretto dal prof. Grassi; quivi nel 1893 se ne occuparono Ferroni e Massari e nel 1903 pubblicò sull'argomento una estesa Memoria A. Foà, sostenendo con molti fatti che, come avevano già accennato Ferroni e Massari, tali corpi non potessero ritenersi parassiti, senza escludere che i veri parassiti vi fossero contenuti.

L'anno successivo il dott. John Siegel pubblicava negli Atti dell'Accademia delle Scienze di Berlino una Nota dal titolo: *Beiträge zur Kenntnis des Vaccineregers* (16 Juni 1904).

Il Siegel vuol dimostrare come, inoculando la cornea di conigli o cavie con pus vaccinico, si riesca ad infettare tutto il corpo dell'animale, e come in tutti gli organi interni, ma più specialmente nel fegato e nel rene, si riscontrino mediante opportuni preparati e a fortissimo ingrandimento microscopico, i corpi di Guarnieri in diverse fasi di sviluppo, assomigliandoli, in base alla forma e ai movimenti di cui sarebbero dotati, alle Gregarine e agli Emosporidi della malaria.

Il prof. Grassi nell'ottobre 1904 mi affidava l'incarico di controllare queste interessanti ricerche.

Dovetti cominciare col ripetere gli stessi esperimenti di Siegel attenandomi strettamente e con tutta l'accuratezza possibile ai suoi metodi e ai suoi consigli, sia per la tecnica microscopica, sia per il modo di esperimentare.

Lavorai su circa 60 conigli di specie comune e tutti molto giovani, condizione richiesta per favorire il buon esito dell'esperimento.

Nei primi tempi usavo innestare fortemente le diverse cornee, ma in seguito per suggerimento dello stesso Siegel, che nel gennaio 1905 pub-

(1) Lavoro eseguito nel laboratorio di Anatomia comparata della R. Università di Roma.

blicò sullo stesso argomento un lavoro molto esteso (1), mi valse esclusivamente di iniezioni sottocutanee di pus vaccinicò puro od allungato con un' uguale quantità di acqua distillata e sterile (2). Per poter ottenere ampie ed esaurienti prove mi procurai pus, che mi fu sempre gentilmente favorito, da diversi istituti vaccinogeni (dall' istituto diretto dal prof. Ottavio Leoni in Roma, dall' istituto municipale di Roma diretto dal prof. Santoro, dall' Institut Vaccinal Bacterio-thérapique di Berna; per una sola volta potei sperimentare col pus del Königl. Anstalt zur Gewinnung tierischen Impfstoffes di Berlino, inviatomi cortesemente dallo stesso Siegel).

Uccidevo i conigli con cloroformio, alcuni dopo un giorno, altri dopo 2-3 e più giorni fino a 9 giorni dopo l' iniezione; e d' ognuno osservavo prolungatamente e sempre a forte ingrandimento (oc. 8 comp. ob. 1,5 mm. Apocrom. imm. omog. Koristka, tubo alt. 16 mm.) in preparati a fresco e stabili: i reni, spesso il sangue, talora il fegato. I preparati stabili (ottenuti raschiando il rene) furono fissati, la maggior parte, soltanto coll' alcool assoluto e coloriti secondo i metodi tenuti dal Siegel e cioè coll' Ematossilina del Grenacher e l' Azzurro II, oppure coll' Azzurro I e l' Eosina (metodo Giemsa), raramente col metodo Heidenhain.

Cominciai questo lavoro quasi persuaso di dover riuscire a confermare la scoperta del Siegel, ma oggi, dopo le ricerche da me fatte, credo purtroppo di avere serie ragioni per dover dubitare fortemente della natura parassitaria di molte forme descritte dall' autore, e soprattutto per escludere che si possa per ora almeno parlare di un ciclo di sviluppo dei supposti parassiti del vaccino.

Risultati da me ottenuti.

I. Dall' osservazione dei preparati a fresco.

Il dott. Siegel, osservando i preparati di rene infetto (3) ha messo in rilievo dei corpicciuoli rifrangenti di forma arrotondata o a pera, o allungati, dotati di vivaci movimenti, a spinte o a salti simili a quelli di piccoli fla-

(1) John Siegel, *Untersuchungen über die Aetiologie der Pocken und der Maul- und Klauenseuche*. (Abhandl. d. königl. Preuss. Akad. d. Wissensch., 1903).

(2) Essendomi rivolto al Siegel per delucidazioni in proposito, egli, onde assicurarmi il risultato migliore, mi consigliò gentilmente di aggiungere al pus acqua distillata.

(3) Per brevità dirò semplicemente rene infetto, quando esso proviene da coniglio innestato o iniettato con pus vaccinicò, e rene sano quando proviene da coniglio a cui non sia stata praticata alcuna operazione.

gellati; le forme più grandi, a pera allungata, ripiegano su sè stesse la parte assottigliata come può fare l'indice di una mano (1).

Egli attribuisce non poco valore a questi fenomeni, anzi, a suo dire, sono quasi la prova migliore per definire con tutta certezza protozoi (sporozi o flagellati) i detti corpiccioli. Avvalora poi i suoi criteri affermando che simili fatti non si presentano mai nei preparati a fresco di rene sano.

In vero osservando questa specie di preparati a fresco si riscontrano facilmente corpiccioli rotondi rifrangenti: essi circolano in diversi sensi, si presentano isolati o a gruppi di due, di tre, di quattro.

Se si ha la pazienza di prolungare l'osservazione, non è difficile rilevare i corpi allungati in forma di pera raggiungenti i 2μ di cui parla estesamente Siegel. Sono ingrossati ad una estremità e all'altra molto assottigliati, terminanti ad uncino che spesso parrebbe prolungato a guisa di sottilissima coda. Questi sono meno rifrangenti di quelli rotondi, e a volte sembra vedere nel loro corpo come una o due macchiette che a tutta prima si potrebbero supporre nuclei e così infatti sono state interpretate.

Si muovono a piccolissimi intervalli di tempo e difficilmente si spostano dal punto in cui si sorprendono: si aggirano attorno a loro stessi in tutti i sensi e complicatamente, ma il movimento principale da potersi ascrivere a loro caratteristica è quello che il Siegel e il prof. Schulze hanno descritto, quale, cioè, può fare l'indice di una mano distendendosi e ripiegandosi celeramente su sè stesso. Questi corpiccioli a forma di pera allungata difficilmente si osservano isolati, per lo più sono a gruppi di due o tre.

Molte volte tentai di colorire a fresco queste forme coll'Azzurro II, come il Siegel suggerisce, ma non ottenni mai una colorazione soddisfacente.

Questo è quanto di più importante io ho potuto osservare coll'esame a fresco dei reni infetti. Per precisare il significato di questo reperto occorre verificare se nulla di simile si osservasse esaminando allo stesso modo i reni sani. Tale questione mi fu ripetutamente messa innanzi dal prof. Grassi, ed io, mio malgrado, non potei dargli una risposta esauriente che molto tardi.

I preparati che si ottengono aggiungendo acqua distillata (o Azzurro II se si vogliono colorire) a un po' di raschiatura di rene, per quante precauzioni si usino, non si prestano ad essere osservati in modo soddisfacente ad un fortissimo ingrandimento.

Il muovere di continuo la vite micrometrica del microscopio, mentre l'obbiettivo dello stesso sfiora il coprioggetti, e le correnti stabilite dall'acqua distillata aggiunta alla sostanza renale sono due cause inevitabili e sufficienti per mettere in moto ogni più piccola particella che viene a trovarsi libera nel preparato.

(1) Il prof. F. E. Schulze conferma i dati di Siegel nel Berliner Klin. Wochenschr., 1905, n. 21.

Quale fiducia quindi si può avere dei diversi movimenti di tanti corpiccioli che si presentano sotto il campo microscopico? E quanta sicurezza della forma di questi corpi trattandosi di preparati ottenuti per raschiamento? Wasielewski contro questo metodo di sperimentare e di osservare così si esprime (!):

« La tecnica preferita dal Siegel nella osservazione dei preparati a fresco, aggiungere cioè acqua distillata al sangue o ai succhi ed elementi organici, è adatta ad introdurre nei preparati stessi tutti i possibili prodotti artificiali e le più svariate forme derivanti dalla frammentazione delle cellule. Se anche una parte dei corpi descritti dal Siegel dovessero appartenere, cosa che rimane da dimostrare, al ciclo di sviluppo dei Protozoi di cui egli vuol parlare, tuttavia rincesce che il Siegel neppure una volta sia riuscito a differenziare nettamente i pretesi suoi corpi dai prodotti di frammentazione delle cellule e dei corpuscoli sanguigni rossi ».

Oltre a ciò io per mio conto ho potuto notare:

a) Il Siegel suggerisce le iniezioni di pus vaccinicco per ottenere reni molto infetti: ma a me non è stato mai possibile rilevare alcuna differenza d'infezione tra rene e rene, e ciò nemmeno quando paragonavo il rene di un coniglio fortemente iniettato (16 cm³. di pus) e quello di un altro semplicemente inoculato alla cornea.

b) Esaminando reni sani per controllare le osservazioni sugli infetti, a volte rivedevo tutto quanto avevo osservato nei reni infetti, a volte invece qualche rara forma e molto dubbia; in breve tempo non fui più capace di trovare una differenza tra i preparati positivi e quelli che avrebbero dovuto essere negativi.

Dovetti dibattermi tra le incertezze per lungo tempo, controllare, prolungare le osservazioni, ma in conclusione dall'esame a fresco dei preparati nulla potei ricavare che parlasse in favore della scoperta del Siegel e i due fatti a cui or ora ho accennato, per me di massima importanza, dandomi un concetto sempre più esatto dei fenomeni osservati, mi decisero fermamente a cambiar metodo d'investigazione.

II. *Dall'osservazione dei preparati stabili.*

Mi posi allora con attività allo studio dei preparati stabili, convinto che soltanto da questi avrei potuto ottenere quei risultati sicuri, che mi avrebbero permesso di risolvere la questione.

Di ogni coniglio che io aveva operato, oltre ai preparati a fresco, aveva allestito preparati stabili, colorati. Presi pertanto ad esaminare tutti questi

(¹) Dr. Th. v. Wasielewski, *Ueber die Technik des Guarnerischen Impf-experimentes und seine Verwendung zum Nachweis von Vaccineerregern in den inneren Organen von Impftieren.* Münchener medizinischen Wochenschrift, N. 25, 1905.

preparati e senz'altro cominciai a seguirli con un certo ordine, cioè a seconda della quantità di pus iniettato e del numero dei giorni trascorsi dopo l'iniezione.

Procedendo in questo modo io aveva fiducia di poter rilevare con sicurezza non solo la presenza dei parassiti, ma anche i loro diversi stadi di sviluppo.

Impiegai diverso tempo in questo lavoro ma, purtroppo, nulla di ciò che mi aspettavo potei ottenere e le mie continue osservazioni a poco per volta finirono coll'indurmi alla seguente domanda: l'ottenere o no un preparato positivo, dipende forse dalla minore o maggiore delicatezza usata nel raschiamento del rene piuttosto che dalla iniezione di pus vaccinicco? Siegel infatti, trova più suscettibili alle infezioni i conigli più giovani e, veramente, i reni giovani si raschiano più facilmente dei vecchi come più facilmente per quanto io ho osservato, si disgregano e si spezzettano le loro cellule. Ad un ragionamento dello stesso genere ricorre il dott. A. Carini per dimostrare erronea la Nota di Bonhoff sullo *Spirochaete vaccinae* (Berlin. Klin. Wochenschr. N. 36, 1905) (1).

Sarebbe dunque fondato il mio dubbio? Se fosse fondato dovrei ottenere risultati positivi anche con reni sani. Mi accinsi a questa prova ed ecco infine a quale convinzione sono pervenuto.

Indipendentemente da qualsiasi infezione di pus vaccinicco, a mio credere, nei preparati di rene di un qualunque coniglio, si può trovare una qualunque o anche alcune, secondo il caso, di quelle forme che il Siegel ascrive ai parassiti dei protozoi del vaccino.

Nei miei preparati stabili tanto di reni sani, che di reni infetti, man mano ebbi occasione di riscontrare quasi tutte le figure che si vedono nelle fotografie della tavola I del lavoro in esteso del Siegel sopra citato.

Coll'ematosilina del Grenacher unita all'Azzurro II, colorazione adottata a preferenza dal Siegel, si vedono comunissimi, in qualunque preparato, i corpi rotondi, di cui si è detto, fortemente coloriti in azzurro e circondati da un alone chiaro (vedi fig. 2, tav. I, Siegel). Si trovano isolati o a gruppi di 2 fino a 8 irregolarmente uniti e di diverse dimensioni. Si riscontrano del pari corpi marcatamente a forma di pera, coloriti intensamente e anche essi circondati da un alone chiaro; altri della stessa forma e della stessa intensità di colore, ma più piccoli e uniti a due ed infine altri svariati tipi di corpi in cui si possono identificare tutti i corpiccioli designati dal Siegel.

Ciò che però non ho potuto mai vedere nei miei preparati, sono le così dette spore rappresentate dall'autore con le fig. 35, 36, 39 della tav. I del suo lavoro; ma dubito molto che esse possano servire ad invalidare i risultati delle mie osservazioni.

(1) Dott. A. Carini, *Sind die Vaccinerreger Spirochäten?* Centralblatt f. Bakt. Paras. u. Infekt. Bd. 39. Heft 6. 1905.

Le fotografie del Siegel per quanto ben fatte non arrivano a darci quella idea chiara degli oggetti osservati, che è necessaria e indispensabile per un sì delicato argomento, ma tuttavia dal loro insieme ci si può formare un concetto almeno nella parte essenziale. Or bene, mi duole di dover constatare che io non arrivo a rilevare in esse quel graduale ciclo di sviluppo del parassita che lo stesso Siegel ha schematizzato colle figure 7, 8, 9 della sua prima Nota e ripetuto più chiaramente colle figure a, b, c, d, e, nella sua recente Nota (1).

D'altra parte non arrivo a completare la deficienza delle fotografie del Siegel collo studio dei miei preparati.

Io, ripeto, tanto nei reni infetti come nei non infetti, vedo sempre le medesime figure, gli stessi corpiccioli in maggiore o minor numero; a me sembrano prodotti artificiali o più esattamente forme prodotte dal disgregarsi e dallo spezzettarsi delle cellule, causa il raschiamento e lo strisciamento della sostanza renale sul vetro, che sono i metodi indicati dal Siegel. In nessun modo sono riuscito a modificare questo mio convincimento.

Fra tutti i preparati infetti, che ho esaminato, ne ho però trovati due, due soltanto, che si mostrano veramente diversi da tutti gli altri. Ciò che li distingue dagli altri è la presenza di piccoli corpi sottilissimi e allungati a guisa di un ago, che nella parte leggermente ingrossata hanno due distinti nucleetti.



Protozoi trovati in un rene di coniglio inoculato alla cornea da tre giorni, copiati con la camera lucida (Oc. 8 comp. ob. 1,5 mm. Aproc. imm. Koristka) e poi ingranditi 3 volte in dimensioni.

Essi raggiungono la lunghezza di 3 μ ., e credo che corrispondano ai corpi rappresentati dalla fig. 4 della tav. I del lavoro in esteso del Siegel.

Li ho ottenuti, come ho detto, in preparati a secco, coloriti coll'eosina e l'azzurro I; il loro colore è leggermente turchino, mentre i nuclei sono d'un bel rosso paonazzo. Sono così caratteristici che senza il più lontano dubbio si definiscono per esseri vivi.

Il coniglio, a cui apparteneva il rene dal quale ricavai i preparati in discorso, era stato soltanto inoculato alle cornee e ucciso dopo tre giorni con un colpo alla nuca: condizioni queste che, secondo il Siegel, non sono le migliori per ottenere reni molto infetti.

(1) Mediz. Klinik. N. 18, 1905.

Nonostante che in tanti esperimenti io avessi fatto ogni possibile per ottenere preparati ricchi di parassiti, non potei mai avere simili figure in nessun altro rene.

Infettai ancora altri conigli con la semplice inoculazione e li uccisi al terzo giorno con un colpo alla nuca; ma invano, non trovai mai più niente di simile.

V'ha di più: ho detto che posseggo solo due preparati infetti a questo modo; ebbene essi sono i soli infetti fra tanti che ricavai dallo stesso rene.

Posso io dunque asserire che le forme da me trovate appartengano al *Cytoryctes Vaccinae*?

Non me ne sento autorizzato.

E le figure trovate dal Siegel, sono veramente protozoi appartenenti al ciclo del *Cytoryctes*?

Prima di tentare di rispondere a questa domanda, volli ripetere ancora una volta un esperimento che mi era stato suggerito dal prof. Grassi.

Con reni di conigli iniettati e uccisi al quinto giorno inoculai le cornee di altri; agli occhi di quest'ultimi non comparvero pustole, ma si rese manifesto semplicemente, in qualche caso, un leggiero appannamento della cornea.

Al quarto giorno di questa operazione praticai alle cornee degli stessi conigli altre inoculazioni, ma però di pus vaccinico: questa volta già alla fine del secondo giorno comparvero le pustole. Si poteva da ciò indurre che la prima inoculazione, col rene infetto, non aveva vaccinato l'animale.

In conclusione adunque ogni mia ricerca ed esperimento m'indusse sempre più a credere fondato il mio dubbio e, stando pure alle osservazioni sul sangue dei conigli infetti, delle quali dopo il recente lavoro di Wasielewski (1) non occorre più occuparci, mi riaffermai saldamente nel mio convincimento che cioè: *i corpiccioli designati dal Siegel quali protozoi del vaccino, sono invece, in grandissima parte, prodotti artificiali della tecnica istologica tenuta dall'autore. Alcuni di essi però, molto differenti dai corpuscoli di Guarnieri, rappresentano certamente protozoi che allo stato attuale delle nostre ricerche non si possono senz'altro giudicare specifici del vaccino.*

Prima di chiudere questo brevissimo cenno delle mie ricerche, mi pare opportuno di dire ancora una parola intorno a un ultimo esperimento che ho fatto.

Dilacerai per bene e pestai la quarta parte circa di un rene infetto, che avevo estratto, dall'animale ucciso, con tutte le precauzioni possibili, e lo iniettai, diluito con acqua distillata sterile, a un coniglio sano. Al terzo giorno dopo di questa operazione, inoculai le cornee di questo coniglio con

(1) Wasielewski, *Ueber die Technik des Guarnierischen etc.* Münchener medizinischen Wochenschrift N. 25, 1905.

pus vaccinico, ma non comparvero mai in esse nessuna traccia di pustola, nè il più lieve appannamento. Ora mettendo in correlazione questo fatto coll'esperimento che mi aveva suggerito il prof. Grassi, testè accennato, ne induco che un coniglio *inoculato* (alla cornea) con rene infetto non si vaccina, mentre *iniettato* (sotto cute) con rene infetto resta vaccinato.

Io non intendo discutere l'importanza di questi fenomeni, ma trovo però che i due esperimenti in discorso potrebbero avere una spiegazione comune se si volesse ammettere che l'azione vaccinante del rene consistesse in una sostanza chimica che dirò *x*. Così infatti si avrebbe che la quantità di *x* contenuta in un rene infetto sarebbe tanto scarsa che un frammento di questo (mercè la sola inoculazione alle cornee) non basterebbe a rendere immune un coniglio, mentre lo renderebbe tale la quarta parte circa d'un rene infetto (mediante iniezioni sottocutanee) (1).

Patologia vegetale. — *Intorno ad un caso di emiparasitismo del Rhacodium cellare* Pers. Nota del dott. VITTORIO PEGLION, presentata dal Socio G. CIAMICIAN.

Nelle vecchie cantine ove le regole enologiche sieno più o meno completamente trascurate, sviluppassi frequentemente una caratteristica produzione muffacea che riveste di un fitto ma soffice feltro bruno le doghe delle botti, gli arnesi di legno, le bottiglie conservate a lungo. È questo il *Rhacodium cellare* Pers., di cui si trovano frequenti cenni negli antichi autori georgici; tuttavia fu Persoon a definirne la natura fungina e successivamente parecchi micologi ne illustrarono sommariamente la struttura. E. Fries (1829) fu il primo a segnalare la presenza di speciali fruttificazioni in base alle quali propose l'istituzione di un nuovo genere (*Zasmidium*) in cui collocare questo fungo sino allora ritenuto sterile. Tuttavia lo Schroeter (2) che fece oggetto di accuratissimo studio la muffa delle cantine (1884) non riuscì ad osservare le forme di fruttificazione evoluta segnalata da Fries, bensì descrisse la formazione di speciali fruttificazioni conidiali e la germinazione dei conidi

(1) Mentre la presente era in corso di stampa, ho ricevuto una brevissima Nota del dott. Siegel della quale qui non tengo conto sia per i risultati alquanto diversi dai precedenti a cui è pervenuto l'A., sia perchè la Nota in discorso non mi costringe a modificare le mie conclusioni. Tornerò sopra di essa in un prossimo lavoro.

(2) Nell'ultimo fascicolo dei C. R. de l'Académie des Sciences (20 nov. 1905) il Guégen pubblica una interessante Nota *Sur la structure et l'évolution du Rhacodium cellare*. Cita il lavoro dello Schroeter come pubblicato nel 1893. Non conosco tale lavoro, bensì quello dello stesso Autore: Schröter, *Bemerkungen über Keller- und Grabenpilze*, Jahresber., der Schl. Ges. etc. LXI, 1884, di cui evvi un ampio riassunto in Botan. Centr. XXIII, pag. 174.