

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCV.

1908

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVII.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1908

cifra relativa alla lunghezza, il diametro trasverso delle due epifisi è maggiore negli animali iniettati con emulsione ipofisaria; in cifra assoluta è uguale al

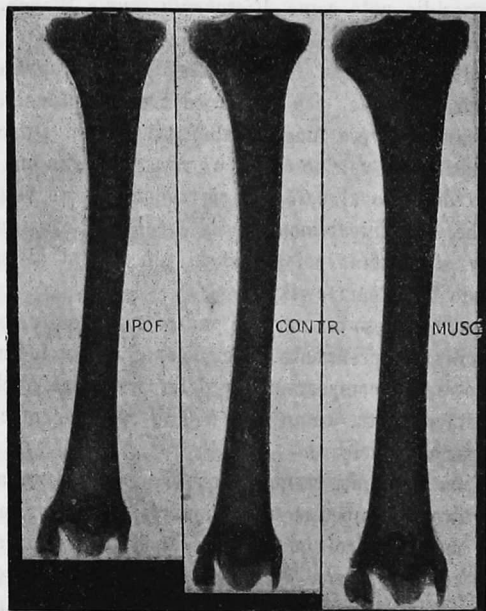


FIG. 8. — Radiografie delle tibie degli agnelli. Vale per questa figura l'avvertimento alla FIG. 1.

diametro delle epifisi dell'agnello di controllo. 3) Il diametro della diafisi, in cifra relativa alla lunghezza, è maggiore nell'animale iniettato. 4) Il peso delle ossa è minore che nell'animale di controllo.

Microbiologia. — *Osservazioni sui Sarcosporidi* ⁽¹⁾. Nota del dott. A. NEGRI, presentata dal Socio B. GRASSI.

Nelle così dette « spore » di alcuni Sarcosporidi, che sono attualmente descritti come specie distinte, ho potuto mettere in evidenza alcune particolarità, sulle quali credo opportuno richiamare l'attenzione.

Io mi limiterò per ora alla descrizione dei reperti che, col sussidio del metodo di colorazione del Romanowsky, ho ottenuto nelle spore. Spero però di poter portare presto altri contributi di fatti alla conoscenza di questi interessanti protozoi parassiti ancora così poco noti sia nella loro morfologia che nel loro ciclo di sviluppo.

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Patologia generale della R. Università di Pavia. Nota presentata nella seduta del 2 febbraio 1908.

Per lo studio delle spore, materiale abbondante mi è stato fornito dal *Mus decumanus* Pall., i cui muscoli con una certa frequenza ho trovato infetti dal Sarcosporidio noto come *Miescheria muris* Blanch. o *Sarcocystis muris* (Blanchard) Labbé.

Dai muscoli infetti, con forme parassitarie sviluppate e visibili ad occhio nudo, non è difficile, con rapida ed accurata dilacerazione, ottenere liberi interi parassiti ovvero lunghi frammenti di essi. Dilacerando poi finalmente tali parassiti, sul vetrino copri- o portaoggetti, in una goccia di soluzione di cloruro di sodio al 0,75 %, si rendono a loro volta libere numerose le spore che, convenientemente distese e lasciate essiccare sullo stesso od altro vetrino, si prestano poi nel modo più adatto ai successivi e noti tempi del metodo del Romanowsky.

A questo metodo, reso oramai così pratico e sicuro per opera del Giemsa, io ho dato di solito la preferenza, in modo speciale per lo studio della struttura del nucleo e del comportamento della cromatina nucleare che viene squisitamente differenziata, come non è dato raggiungere con nessun altro metodo di colorazione nucleare.

Le spore, nei preparati eseguiti con le modalità ora accennate e con quelle cautele atte ad impedire alterazioni di forma, presentano di regola il noto aspetto caratteristico che si rileva anche all'esame a fresco.

Sono corpicciuoli a forma di falce o di semiluna, a contorni regolari, ad estremità rotondeggianti; con il metodo del Romanowsky, nel protoplasma, quasi in totalità finamente granuloso e che assume un'intensa colorazione azzurra, si differenzia, elettivamente colorato in rosso o in rosso violaceo, un nucleo che di rado è situato nella parte mediana, di regola invece è spostato verso uno dei poli dell'elemento.

Il nucleo risulta di un numero rilevante di blocchetti di cromatina più o meno ravvicinati fra loro e che spesso mostrano la tendenza a disporsi in serie lineari; il loro insieme forma un piccolo ammasso ovoidale, a contorni di frequente irregolari, frastagliati, senza limite di divisione netta dal protoplasma. L'asse maggiore del nucleo di solito è disposto in direzione parallela all'asse longitudinale della spora; il diametro trasverso, di regola, è di poco inferiore a quello del corpuscolo falciforme che lo racchiude.

Il protoplasma, come ho accennato, è granuloso, ma non in tutto il corpo della spora: una delle estremità, quella opposta al nucleo, con il metodo del Romanowsky, per un tratto apparisce di frequente jalina, quasi omogenea; tale porzione non assume la caratteristica colorazione azzurra, ma qualche volta rimane incolore, qualche altra presenta una leggera tinta rosea.

Sparsi nel protoplasma si riscontrano inoltre spesso dei granuli rotondeggianti ovvero di aspetto irregolare, che con il metodo del Romanowsky si differenziano in modo affatto simile alla cromatina nucleare.

La grandezza, il numero di tali formazioni e la loro sede non sono costanti: se ne possono trovare fin 4 o 5 in una sola spora, eccezionalmente di più; di regola sono uno o due granuli per elemento, taluni in vicinanza immediata del nucleo, altri invece più o meno da esso allontanati con disposizioni che possono essere le più diverse.

Questi i dati di fatto che ho potuto rilevare, con la tecnica su ricordata, nei « corpuscoli falciformi » di aspetto tipico della *Sarcocystis muris*.

I miei reperti in proposito non fanno che confermare quanto nelle spore di altri Sarcosporidi è già stato reso noto per opera di altri ricercatori; da alcuni dei quali è stato pure adoperato, per lo studio di questi elementi, il metodo di colorazione del Romanowsky ⁽¹⁾.

Accanto alle spore dell'aspetto e della struttura ora descritte, nelle forme di *Sarcocystis muris* bene sviluppate, se ne trovano, sebbene in numero minore, altre in cui il modo di disporsi della cromatina nucleare subisce delle modificazioni più o meno accentuate, unite alle quali procedono modificazioni più o meno rilevanti della forma di tutto il corpo cellulare.

È su questi speciali aspetti del nucleo e del corpo protoplasmatico che non credo inutile soffermarmi.

Anche tra le spore che ho indicato — per riguardo alla forma — come tipiche, si possono rilevare differenze. Ma sono diversità di grado leggero; riguardano il vario modo di riunirsi dei blocchetti della cromatina nucleare, e più che altro l'aspetto d'insieme di tutto l'elemento.

Riferendomi a quest'ultimo, ricordo che, mentre la distanza massima tra le due estremità della spora si mantiene intorno a 13-15 μ , il diametro massimo trasversale presenta oscillazioni relativamente più ampie, in modo che da elementi larghi 2,5-3 μ , si passa ad altri che, pur conservando le peculiari note su descritte e che ho cercato riprodurre nella fig. 1, hanno un aspetto alquanto più tozzo, per il maggior sviluppo assunto dal diametro trasverso.

In alcune di queste spore si riporta inoltre l'impressione che i diametri del nucleo siano superiori alla normale. Se ciò sia in relazione con un aumento reale della cromatina nucleare, ovvero sia da riferirsi a un meno intimo rapporto reciproco dei singoli blocchetti cromatici, io non saprei però decidere con sicurezza.

Si tratta, ad ogni modo, sempre, anche in questi casi, di nuclei la cui

⁽¹⁾ M. Koch, *Ueber Sarcosporidien*. Verhand. des V. Intern. Zoolog. Congresses zu Berlin 1901. Jena, Fischer, 1902. — Laveran, citato da Mesnil nel Bulletin de l'Institut Pasteur, 1907, in una Nota aggiunta al riassunto del lavoro del Perrier: *Structure de la spore de Sarcocystis tenella* (Raill.) ecc.

cromatina è riunita a costituire un corpicciuolo unico, rotondeggiante od ovoidale, con la solita disposizione e sede nell'interno della spora.

Una prima modificazione di questo aspetto si ha per la comparsa di un'incisura che divide, per un tratto più o meno esteso, l'ammasso di cromatina in due porzioni. Procede tale divisione da quel lato del contorno nucleare che è rivolto verso il polo della spora più lontano dal nucleo, continua poi verso l'altro polo seguendo un piano parallelo all'asse maggiore del « corpuscolo falciforme ».

Talora appena accennata, in altri casi l'incisura è più manifesta; ne risulta un ammasso di cromatina — il nucleo — dal quale si staccano e si avanzano nel protoplasma due spessi cordoni più o meno lunghi, come si possono osservare nelle figg. 2, 3 e 4; in quest'ultima la cromatina ancora indivisa è in quantità minore che nelle due forme precedenti.

Altre volte poi si trova che la cromatina è disposta in un cordone di spessore quasi uniforme e che descrive un'ansa le cui branche si orientano nella direzione dell'asse maggiore della spora.

Da caso a caso esistono note speciali, per ciò che si riferisce ai particolari, nel modo di presentarsi della cromatina; quello che però mi interessa di far rilevare è che il processo in tutte le spore si svolge essenzialmente nello stesso modo e conduce dall'unico ammasso primitivo nucleare alla formazione di due ammassi allungati che ad un estremo possono ancora presentare rapporti di continuità fra di loro: di tale aspetto può dare una idea la fig. 5.

Il corpo di tali spore è di regola ingrossato per aumento più o meno notevole del diametro trasversale (v. le figg. 2, 3, 4, 5); ciò però non si verifica sempre, in quanto gli stessi reperti si possono ottenere anche nel nucleo di « corpuscoli falciformi » di forma e dimensioni quasi normali.

In altre spore la disposizione della cromatina in due cordoni allungati, ancora uniti fra loro ovvero nettamente divisi, più non si riscontra; invece si notano due ammassi che vanno assumendo i caratteri proprii del nucleo delle spore tipiche.

Sono infatti due corpi, ora di forma piuttosto allungata (fig. 7), ora di forma che si avvicina di più alla ovale (fig. 6), disposti col maggior asse parallelamente fra loro e all'asse longitudinale della spora, talora ancora riuniti da tratti di cromatina (fig. 6), talora invece del tutto indipendenti (fig. 7).

Nella *Sarcocystis muris*, nei parassiti sviluppati, tali spore si trovano relativamente abbondanti; sono caratterizzate da una forma ovale, ovvero a rene colla concavità pochissimo accentuata.

Da esse si passa ad altre nelle quali esistono due nuclei bene individualizzati e distinti fra loro, per forma, dimensioni e struttura simili al nucleo della spora tipica (fig. 8).

Anche queste spore sono contraddistinte da una forma a rene ovvero ovalare; in talune, nel protoplasma finemente granuloso, lungo un piano longitudinale che divide l'elemento in due metà simmetriche, ognuna delle quali contiene un nucleo, si rileva un aspetto più chiaro, come dovuto ad una rarefazione del protoplasma.

È lungo questo piano longitudinale che, ad un dato momento, avviene la divisione della spora in due metà uguali e simmetriche, colla formazione di due nuovi individui.

La fig. 9, la quale riproduce una spora che ad un estremo è ancora per un tratto indivisa mentre ha già dato origine a due spore tipiche quasi complete, riunite a loro volta per l'estremità più appuntita, mi sembra in proposito molto dimostrativa.

A questa credo si possa collegare la fig. 10; si tratta qui di due spore ancora in intimo rapporto ai loro poli, con disposizione così caratteristica da lasciar supporre con ogni fondamento che rappresentino il prodotto ultimo del processo di divisione che si è andato delineando dall'esposizione metodica dei singoli reperti.

Oltre che nella *Sarcocystis muris*, le mie osservazioni sulle spore si sono rivolte anche su di un altro Sarcosporidio, sulla *Sarcocystis Bertrami* Doflein, che pure con una relativa frequenza ho riscontrato in queste regioni nelle fibre muscolari dell'esofago dell'*Equus caballus* L.

Dirò subito che anche nei preparati di spore di *Sarcocystis Bertrami* eseguiti con le modalità tecniche su riferite e colorate con il metodo del Romanowsky-Giemsa, io ho potuto verificare quanto ho già descritto nel Sarcosporidio del topo delle chiacchie.

Non mi diffondo perciò in particolari, per evitare inutili ripetizioni. Ricordo solo che anche nella *Sarcocystis Bertrami* il maggior numero di spore presenta la forma tipica ben nota; evidente pure in molte di esse è l'aspetto jalino di quella porzione del protoplasma che costituisce l'estremità più lontana dal nucleo (v. la spora a sinistra nella fig. 11); rarissimi invece, quasi mancanti, almeno ne' miei preparati, i granuli sparsi nel corpo della spora e che nella *Sarcocystis muris* assumono, con il metodo del Romanowsky, la colorazione della cromatina.

Nel nucleo è possibile accertare in questa specie tutti gli aspetti e le modificazioni sovra esposte. Si possono osservare nuclei che presentano un iniziale disporsi della cromatina in due cordoni. Da questi, attraversando una serie di stadi di passaggio, si giunge ad elementi in cui tutta la cromatina forma un'ansa colle branche nella direzione dell'asse maggiore della spora, aspetto caratteristico non infrequente nel parassita del cavallo, e di cui la fig. 11 può dare un concetto abbastanza preciso.

In modo simile a quanto avviene nella *Sarcocystis muris*, anche in

queste spore si ha poi la formazione di due cordoni nucleari distinti, prima allungati e che poi vanno a mano a mano raccogliendosi in due nuclei figli; contemporaneamente il corpo della spora tende ad assumere una forma che si avvicina sempre più alla ovalare (v. fig. 12).

Non mi è stato possibile nel parassita del cavallo sorprendere spore con la divisione in atto; tuttavia ne ho spesso osservato di quelle riunite a due a due, con la disposizione che ho descritto nella *Sarcocystis muris* e che ho riprodotto nella fig. 10.

Anche questo reperto mi convince che in ambedue i parassiti si svolge nello stesso modo il medesimo ordine di fatti.

Su questi fatti mi soffermo per ora. Io credo che essi si possano tutti riunire e collegare tra loro e interpretare come l'espressione di un processo di divisione delle spore, che si svolge con leggi determinate e costanti, passando attraverso stadi che si susseguono con ogni probabilità nell'ordine col quale li ho esposti.

Si comprende che io non posso riferirmi che alle spore dei *Sarcosporidi* da me finora studiati ⁽¹⁾.

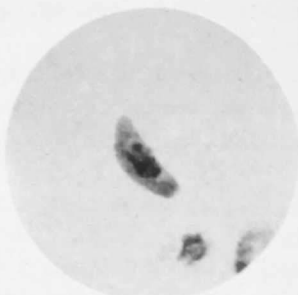
Che i vari aspetti presentati talvolta nelle spore dal nucleo e anche dal corpo cellulare si debbano riferire a vera struttura, io credo di poterlo affermare con sicurezza escludendo in modo reciso che si possa trattare di eventuali prodotti di alterazione rispettivamente del nucleo o del corpo protoplasmatico, dovute o alle modalità di preparazione ovvero alla tecnica adoperata.

A parte altre considerazioni e dati di fatto, a conferma di ciò credo sia sufficiente l'accennare che all'esame a fresco delle spore di una *Sarcocystis muris* o *Sarcocystis Bertrami* provenienti dall'animale ospite appena ucciso (in soluzione di cloruro di sodio 0,75 % nella quale si conserva benissimo la forma degli elementi, ovvero nel succo stesso dei muscoli) si possono — fino a un certo punto — osservare i medesimi fatti che poi nei preparati colorati appaiono nel modo più evidente. Invero, accanto alle forme a falce o a semiluna tipiche, altre se ne riscontrano più tozze, anche ovoidali; in queste ultime non di rado si vedono abbastanza chiaramente due vacuoli chiari, opposti fra di loro, verso la metà del corpo della spora e con caratteri simili a quel vacuolo che nelle spore tipiche a fresco indica la sede dell'ammasso della cromatina nucleare; anche a fresco in alcune spore si osserva che il vacuolo nucleare è come allungato e non della solita forma ovale.

⁽¹⁾ Le osservazioni sulla *Sarcocystis muris* del *Mus musculus* L. hanno dato risultati identici a quelli ottenuti nei parassiti del *Mus decumanus* Pall.



1



2



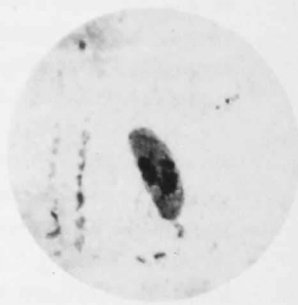
3



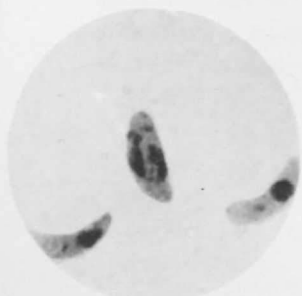
4



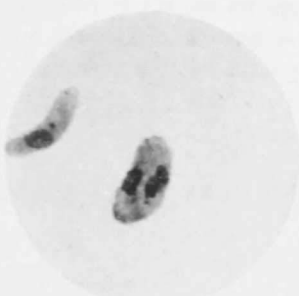
5



6



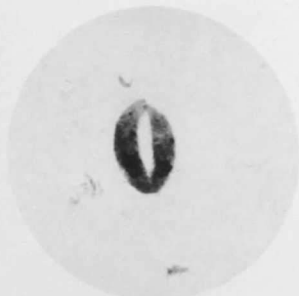
7



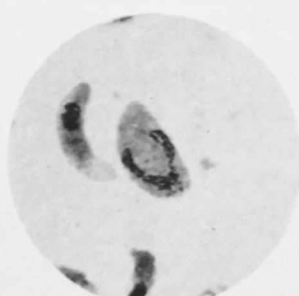
8



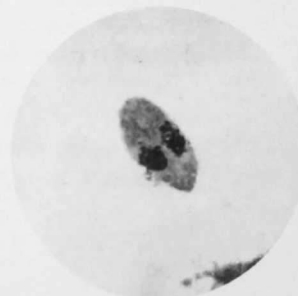
9



10



11



12

Malgrado le più accurate ricerche nella ricca e sparsa letteratura sui Sarcosporidi, non mi è stato possibile trovare una descrizione dei fatti che formano l'oggetto di questa Nota.

Accenni a processi di divisione delle spore si trovano nell'antico lavoro dell'Hessling ⁽¹⁾; ma dalla sua descrizione e dalle figure (fig. 9, tav. X) si rileva chiaramente che i fatti da lui riferiti nulla hanno a che fare con quelli che io ho esposto.

Due stadî invece di quelli da me descritti sono stati forse intraveduti dal Manz fino dal 1867. Il Manz ⁽²⁾ riferisce di aver osservato qualche volta, ma solo nei più piccoli « otricoli di Miescher » del maiale, delle spore di forma normale in cui la « vescicola nucleare » era divisa in due porzioni da una fine linea; inoltre di aver riscontrato, come ultimo stadio della divisione, spore completamente sviluppate e di forma normale, disposte a coppie, con le faccie concave opposte fra loro e ancora riunite ad un'estremità (Tav. XX, fig. 5 d).

Si tratta di due osservazioni isolate, su preparati per dilacerazione in glicerina diluita, ovvero nel succo stesso dei muscoli. Si comprende come su di esse non si sia soffermata l'attenzione; infatti mentre la figura del Manz della *Sarcocystis Miescheriana* Kühn è stata con regolarità riprodotta in tutti i migliori e più diffusi trattati sui protozoi patogeni, nessuno degli autori si intrattiene sul processo che il Manz accenna, in modo però così incompleto.

Dalle mie osservazioni, mi sembra si possa concludere che nelle spore ha luogo un processo di divisione che si svolge con modalità determinate e costanti; quale sia poi lo scopo ed il significato di tale moltiplicazione, lo potranno decidere ulteriori ricerche.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

(v. la tavola annessa).

FIGG. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10: Spore di *Sarcocystis muris* Blanch.

FIGG. 11, 12: Spore di *Sarcocystis Bertrami* Dof.

Colorazione con il metodo di Romanowsky-Giemsa.

Fotografie eseguite con l'obb. 2 mm. apocr. Zeiss apert. 1,40, oculare di proiezione 4, lunghezza camera cm. 60 circa.

Nessun ritocco è stato fatto alle fotografie.

⁽¹⁾ Zeitschrift f. Wiss. Zool., Bd. V, 1854, pag. 197.

⁽²⁾ Arch. f. Mikr. Anat., Bd. III, pag. 349.