

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVI.

1909

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1909

Microbiologia. — *Ulteriori osservazioni sulla struttura del *Neuroryctes hydrophobiae* Calkins* (1). Nota del dott. A. NEGRI, presentata dal Socio B. GRASSI.

Nella comunicazione che ha avuto l'onore di essere accolta tra le Memorie di questa Accademia (2), io ho illustrato fin dal principio dell'anno in corso una serie di interessanti reperti sulla struttura del parassita della rabbia che stanno a dimostrare l'esattezza di quanto già da alcuni anni ho affermato: « che nell'interno dei « corpi specifici » della rabbia esistono delle parti nucleari; che questi corpi inoltre presentano delle intime modificazioni che si svolgono con leggi costanti, tali da non poter essere interpretate che l'espressione del ciclo di un essere vivente, di un protozoo ».

Più precisamente, nella mia ultima Memoria, io ho dimostrato — riassumo in breve le conclusioni — che, colorando nei preparati per strisciamento il *Neuroryctes hydrophobiae* con il metodo del Romanowsky, la massa fondamentale del parassita si colora in azzurro, le cosiddette « formazioni interne » assumono una tinta rosea.

In queste ultime, con tale metodo, si possono distinguere due sostanze: una, in apparenza omogenea, che dà la forma e le dimensioni, l'aspetto d'insieme, delle singole « formazioni interne » e che, come ho detto, si colora debolmente in roseo. In ogni formazione interna vi è poi un'altra sostanza, sotto forma di granuli e di blocchetti, che di fronte al metodo del Romanowsky si comporta come la cromatina dei protozoi, differenziandosi in rosso violaceo intenso.

I blocchetti di cromatina, come ho reso noto, mostrano dei processi di divisione, sebbene, data la piccolezza estrema delle immagini, non se ne possono determinare con esattezza i particolari.

In seguito a ripetute divisioni la cromatina si riduce a granuli finissimi di grandezza uniforme, che, ad un determinato stadio, sono distribuiti regolarmente in tutto il corpo del parassita.

A questo stadio un altro ne segue in cui il protoplasma si dispone in aloni, che a mano a mano si differenziano in modo sempre più netto, attorno ad ogni granulo di cromatina. Il protozoo viene in tal modo ad essere costituito da un grande numero di piccoli corpicciuoli, tutti della medesima gran-

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Patologia generale della R. Università di Pavia.

(2) Sulla morfologia e sul ciclo del parassita della rabbia (*Neuroryctes hydrophobiae* Calkins). Memorie della Reale Accademia dei Lincei. (Anno CCCVI-1909).

dezza, stipati tra loro; è però ancora una formazione compatta, a contorni netti, rigidi, regolari.

Queste caratteristiche vanno scomparendo in stadi più inoltrati; i contorni del parassita divengono meno netti, irregolari e talvolta si osserva che da un punto o punti diversi della periferia del *Neuroryctes* si ha come la fuoriuscita di parte dei corpiccioli in cui il parassita si è in totalità trasformato.

Ogni corpicciuolo (spora) risulta di un granulo di cromatina circondato da una capsula protoplasmatica, chiara, compatta, difficilmente colorabile.

Ci si trova di fronte ad una vera sporulazione, ad un processo di coniotomia, in seguito al quale, secondo le leggi note per tanti altri protozoi, vengono a formarsi degli elementi figli, che presentano le parti costitutive di ogni organismo unicellulare, *protoplasma* e *nucleo*, e che riproducono la struttura originaria dell'organismo dal quale derivano.

Di fatti i parassiti più giovani che si riconoscono nelle cellule nervose, e che pure sono assai piccoli, risultano da un unico ammasso nucleare circondato da un alone di protoplasma.

* * *

Ritornando sull'argomento, io desidero soffermare l'attenzione su di una nuova serie di reperti, i quali confermano sempre più che la sostanza che costituisce i granuli e i blocchetti che nelle « formazioni interne » assumono con il metodo del Romanowsky la colorazione della cromatina dei protozoi, è realmente da considerarsi come cromatina.

Invero la proprietà di differenziarsi in modo elettivo con detto metodo, i caratteri dei piccoli ammassi e dei granuli cromatici, il loro modo di comportarsi, erano argomenti di indiscutibile valore a sostegno dell'interpretazione già da me avanzata. Di conseguenza, nella mia ultima Memoria, non entrai in particolari, ma, sebbene avessi già eseguite in grande parte le ricerche che ora espongo, mi sono limitato ad accennare che granuli e blocchetti presentano tutti i caratteri della cromatina (pag. 18). Ripetute e completate in questi ultimi mesi le osservazioni, mi sembra ora conveniente renderne noti i risultati in modo un po' particolareggiato.

All'intento di determinare con esattezza sempre maggiore la natura di quei granuli e blocchetti che si dimostrano nel *Neuroryctes hydrophobiae* col procedimento del Romanowsky e che ho già interpretato come cromatina, io ho fatto agire su di essi quei reagenti che sono riconosciuti come i più adatti per differenziare questa sostanza nucleare.

Ho eseguito di preferenza le osservazioni su parassiti in preparati per strisciamento, a fresco, ovvero dopo breve fissazione nell'alcool assoluto.

Devo premettere che non è uno studio agevole, perchè occorre anzitutto un materiale bene adatto, che contenga cioè abbondanti parassiti e bene svi-

luppati, e perchè è necessaria inoltre una sicurezza nell'identificarli, che non si acquista che con lungo esercizio; il preparato per strisciamento difatti deve essere esaminato, alla ricerca di un punto opportuno, senza il sussidio di alcuna colorazione, nella sola soluzione fisiologica.

Per attenermi alle modalità da me seguite, ricorderò che, trovata una forma indiscutibilmente parassitaria (ho ricorso a strisci di sostanza grigia del corno di Ammone di vacche e cani infettati sperimentalmente e di qualche cane rabbioso vagante), fissavo il preparato e poscia, determinando un'aspirazione da un lato, facevo scorrere sotto il vetrino coprioggetti il reattivo, di cui volevo studiare l'azione, prolungando l'esame per tutto il periodo di tempo necessario; che fu talvolta di diverse ore.

Con questa tecnica, ho seguito il modo di comportarsi del *Neurocytes* di fronte alle soluzioni acide, alle soluzioni alcaline, sottoponendolo alle digestioni artificiali. Alcune di queste prove io aveva già eseguito alcuni anni or sono, richiedevano tuttavia di essere studiate in modo più accurato.

Con le soluzioni deboli di acido cloridrico (ad es. al 0,3 %) i parassiti si rigonfiano, il protoplasma diviene trasparente, si fanno evidenti le formazioni interne e in queste si vedono apparire assai netti dei granuli rifrangenti che per la loro sede, la loro forma, le loro dimensioni, corrispondono senza alcun dubbio ai granuli cromatici che si differenziano in rosso violaceo con la miscela del Giemsa ovvero del Laveran.

Se si prolunga l'azione dell'acido, i granuli non si modificano, anzi talvolta divengono ancora più evidenti; resistono anche se si porta la concentrazione dell'acido cloridrico all'1:100.

Quando invece a queste soluzioni deboli, nei preparati in cui i granuli delle « formazioni interne » sono stati bene messi in evidenza, si sostituisce una soluzione di acido cloridrico assai più concentrata (ad es. acido cloridrico p. 4, acqua p. 3), avvenuta la sostituzione, si assiste ad un rapido impallidirsi dei granuli, che in breve si dissolvono sottraendosi all'osservazione.

Di fronte alle soluzioni di acido acetico le parti costitutive del parassita mostrano un comportamento presso a poco identico.

Dalle soluzioni alcaline — ho adoperato l'idrato di soda dall'1 al 5 per 100 — come è già noto, i parassiti sono distrutti rapidamente e in modo completo.

L'azione degli alcali sui granuli cromatici si può seguire con maggiore precisione in quei preparati nei quali tali granuli sono stati posti in evidenza da una soluzione acida. Sostituendo a quest'ultima la soluzione alcalina — determinando una corrente sotto il vetrino coprioggetti — dopo un certo tempo, senza dubbio quando l'alcali ha sostituito completamente la soluzione acida, si può accertare che i granuli si disciolgono e scompaiono.

Per le prove di digestione artificiale mi sono servito della Pepsin-Glycerin del Grüber, e della Tripsina (*Trypsinum siccum*) della stessa ditta. La prima in diluizioni dall'1 al 4 per 100, in soluzione di acido cloridrico al 0.2 per 100; la tripsina in soluzione debolmente alcalina (*Trypsinum siccum* gr. 0.1 su emc. 30 di soluzione di carbonato di soda al 0.3 per 100).

Senza entrare in particolari, mi limito a ricordare che nella soluzione di pepsina il corpo del parassita viene in breve digerito; i granuli cromatici invece si fanno evidentissimi e resistono a lungo, anche quando il rimanente del corpo del *Neurocytes* è del tutto distrutto.

Nella tripsina i granuli in un primo tempo appaiono, sebbene indistintamente, però a mano a mano che la digestione progredisce divengono sempre più sbiaditi e poi si dissolvono.

* * *

Riassumendo: i granuli, i blocchetti che nel *Neurocytes hydrophobiae* si differenziano con il metodo del Romanowsky ed hanno i caratteri morfologici ed il comportamento della cromatina, danno anche le altre reazioni caratteristiche di tale sostanza nucleare: resistono agli acidi fino ad una certa concentrazione al di là della quale sono distrutti; si disciolgono nelle soluzioni alcaline anche deboli; resistono alla pepsina, vengono invece digeriti dalla tripsina.

Sebbene difficili da eseguire, data la natura dell'oggetto di studio, queste reazioni — per le quali, ripeto, occorre materiale fresco ovvero fissato brevemente in alcool — sono della massima chiarezza.

Io ne ho eseguite anche altre, che pure sono date come specifiche della cromatina, ma su di esse non mi soffermo, sia perchè di alcune il valore è discusso, sia perchè, data la peculiare struttura e le piccole dimensioni del parassita, alcune non le ho potute osservare con quella nettezza che avrei desiderato.

Faccio però notare che le reazioni che ho ora riferito sono le più importanti, tali da autorizzare, insieme cogli argomenti noti, la conclusione che la sostanza in esame è indubbiamente « cromatina », come già io l'aveva interpretata.

Da questa nuova serie di dati di fatto, a me sembra risulti una ulteriore dimostrazione della natura parassitaria dei « corpi della rabbia »; natura parassitaria che ha avuto in questi ultimi tempi autorevolissime conferme.

Non ho creduto superfluo rendere noti questi fatti nella speranza di poter presto addurre ancora altre prove che valgano a dimostrare ancor più luminosamente che la questione della natura dei « corpi specifici » della rabbia è oramai risolta in modo definitivo.