

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVIII.

1911

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XX.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1911

Gli è pertanto che alla locuzione « *semi distrutti dai succhi gastrici* » e simili, troverei più proprio e più preciso sostituire l'altra « *semi che, più o meno franti o contusi dall'apparato masticatore, vengono successivamente distrutti o disfatti nel loro passaggio traverso il tubo digerente* » (1).

Botanica. — *Esperienze sulla disinfezione delle piante*. Nota di L. DANESI, presentata dal Socio GRASSI.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.

Patologia. — *Sulla Leishmaniosi e sul suo modo di trasmissione* (2). Nota 5<sup>a</sup> preliminare del dott. CARLO BASILE, presentata dal Socio B. GRASSI.

(Con una tavola di fotomicrografie e disegni).

La frequenza ormai largamente dimostrata nell'Italia Media e Meridionale, di un'anemia da Leishmania, definita Kala-Azar, dal Gabbi, che tanto si rese benemerito in tale studio, imponeva la ricerca dell'insetto trasmissore di sì terribile morbo. Illustri clinici e igienisti, nelle Indie e nelle regioni Mediterranee, hanno già affrontato l'argomento, senza giungere a conclusioni del tutto definitive.

In una pubblicazione in esteso esaminerò singolarmente le ricerche fatte dai vari autori; oggi, in questa Nota, sento piuttosto il dovere di ripetere ancora, che io son giunto a stabilire che « almeno nelle regioni Mediterranee, la pulce *serraticeps* e verosimilmente la pulce *irritans* sono gli insetti trasmissori dei parassiti di Leishman », seguendo metodicamente la via suggerita, per la ricerca dei secondi ospiti (ospiti intermedi o definitivi), sin dal 1892, dal mio maestro prof. Grassi (3) e da lui stesso battuta, con gran vantaggio per gli elminti. Il metodo dell'illustre Maestro si riassume « *nella limitazione delle forme sospette per via di comparazione* ».

Non per puro caso, adunque, sono riuscito a determinare le pulci come insetti trasmissori del Kala-Azar, ma per aver adottato accuratamente quel

(1) In casi molto meno frequenti, come ho detto, i semi passati integri nello stomaco e travolti nel movimento delle materie alimentari, possono, è vero, spappolarsi lungo il percorso del tubo digerente, ma anche qui il tegumento viene offeso per una azione vera e propria meccanica e non per un fenomeno biochimico p. d.

(2) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata della Regia Università di Roma.

(3) Ringrazio sentitamente il prof. Grassi i cui consigli, mi han condotto, prontamente, alla risoluzione dell'importante problema. Ringrazio anche S. E. l'on. Luigi Luzzatti, Presidente del Consiglio dei Ministri, e l'on. R. Santoliquido, Direttore Generale della Sanità Pubblica, per i fondi concessi per le presenti ricerche.

metodo col quale il Grassi, ha potuto prontamente indicare gli *Anopheles* come agenti propagatori della malaria.

Lo studio particolareggiato e continuo delle condizioni di vita degli uomini e dei cani che s'infettavano coi parassiti di Leishman, le ricerche minute di tutti gli insetti succhiatori di sangue presenti nelle case ove essi si trovavano o che potevano arrivare a pungerli, l'epidemiologia stessa del morbo limitavano man mano le forme sospette. Si aggiunga che, nelle regioni mediterranee, la distribuzione geografica della Leishmaniosi del cane andava sempre più rivelandosi identica a quella del Kala-Azar, mentre io andavo dimostrando definitivamente la sua identità etiologica e clinica a questo morbo <sup>(1)</sup>.

Le mie ricerche sul veicolo di trasmissione delle Leishmanie furono iniziate nel 1909 e nei primi mesi del 1910 acquistavo la convinzione, frutto di scrupolose ricerche e rigorosi esperimenti, che alle pulci bisognava rivolgere principalmente l'attenzione.

Infatti, nel maggio 1910 io potei già vedere forme di *Leishmania* nell'intestino di pulci *serraticeps*, tolte a giovani cani agonizzanti per Leishmaniosi a decorso acuto. Nell'estate e nell'autunno successivo andai, sempre più, avvalorando le mie prime ricerche e pubblicai allora che « con ogni verosimiglianza le pulci si dovessero ritenere gli insetti trasmissori del Kala-Azar ». Iniziai quindi nuove ricerche tendenti a realizzare la mia ipotesi per via sperimentale e per via naturale.

Tralascio, per ora, di riassumere tutti quei risultati delle mie ricerche che sono stati già pubblicati, e vengo a render noti recentissimi miei esperimenti.

Sei cagnolini nati (25 ottobre 1910) e allevati in laboratorio, in un canile ripetutamente lavato con soluzioni di creolina, e ben protetto da fitte reti metalliche (non stati perciò punti dalle pulci), furono sottoposti all'età di poco più di un mese (primi di dicembre 1910) alla trapanazione della tibia <sup>(2)</sup>; l'esame del midollo così eseguito riuscì negativo per le *Leishmanie*.

Due di questi cagnolini, che dovevano servire di controllo furono tenuti nel suddetto canile.

Gli altri quattro furono portati subito in altro canile, di nuovissima costruzione, ben protetto anch'esso di fitte reti metalliche, difeso dal freddo e posto in luogo lontano dall'abitato; si ebbe anche cura che nelle vicinanze

<sup>(1)</sup> L'identità etiologica era stata ammessa, dal Nicolle, anche in base alla possibilità della trasmissione sperimentale dei parassiti di Leishman dai bambini malati ai cani. Qualcuno, però, suppone ancora che si tratti di due specie di parassiti differenti per quanto affinissime. A eliminare qualsiasi dubbio che, in realtà (dato quanto ho pubblicato nelle note precedenti) mi sembra infondato, ho iniziato nuove ricerche.

<sup>(2)</sup> Questa operazione già proposta dal Pianese per la ricerca dei parassiti di Leishman nel midollo dei bambini con sintomi clinici di Leishmaniosi, fu da me applicata ai cani ai quali riesce innocua.

non vi fossero altri cani. Sin dai primi di dicembre furono messe addosso a questi ultimi quattro cagnolini, alcune pulci tolte ai cani di Bordonaro (Messina) o trovate nelle coltri e nelle materassa di molte famiglie di detto villaggio e subito spedite a Roma. Fu, in questi cani in esperimento, ripetutamente eseguito l'esame del sangue periferico; nei preparati finora osservati ho avuto sempre esito negativo per le *Leishmanie*. Anche la puntura del fegato (1) dapprima fu negativa; i cani però dimagrivano, trascinarono il treno posteriore, mentre la temperatura rettale era affatto irregolare. La puntura epatica ripetuta il 2 marzo si rese, in due di essi, positiva. Da questo giorno in poi, potei notare che tutti e quattro i suddetti cagnolini in esperimento stavano accovacciati l'uno accanto all'altro, rifiutando gran parte del cibo loro quotidiano a base di pane e latte. La mattina del 5 marzo uno di essi fu trovato morto; il 6 marzo, in mia presenza, ne morì, quasi fosse stato fulminato, un secondo. Il terzo ed il quarto morirono in coma il giorno 8 e il giorno 9 marzo. All'autopsia, eseguita quasi subito dopo la morte (2), trovai la milza e il midollo di un colorito rosso cupo; la milza non mi sembrò ingrandita. Allestiti dei preparati per strisciamento della milza, del midollo e del fegato e rinvenni dovunque costantemente le *Leishmanie* in varia quantità.

Tutti e quattro questi cagnolini morirono dunque per una infezione, a decorso acuto, da parassiti di Leishman in seguito a punture di pulci provenienti da luoghi ove esiste la Leishmaniosi (nell'uomo e nel cane).

I due cagnolini di controllo, grassi e vispi, furono in questi ultimi giorni, uccisi; all'autopsia nulla di anormale: sulla cute, com'era da attendersi, nessun ectoparassita: nella milza, nel fegato e nel midollo della tibia la ricerca dei parassiti di Leishman fu negativa.

Questi rigorosi esperimenti, corroborati dai controlli dimostrano che il Kala-Azar, almeno nelle regioni mediterranee (3), si trasmette per mezzo delle pulci (*pulex serraticeps* e probabilmente *pulex irritans*) (4).

\* \* \*

Ho già comunicato nella Nota precedente (5) che a Bordonaro ho potuto personalmente rinvenire pulci *serraticeps* nelle coltri e nelle mate-

(1) La puntura del fegato fu eseguita secondo le norme consigliate dal Nicolle.

(2) Sulla loro cute furono rinvenute delle pulci, dall'intestino delle quali sono stati già allestiti preparati per strisciamento, che sono in corso di studio.

(3) Io scrivo di « Kala-Azar delle Regioni Mediterranee » perchè, per quanto finora si sa, questo morbo a differenza del Kala-Azar delle Indie è trasmissibile sperimentalmente al cane.

(4) Sebbene le mie ricerche sieno state negative non si può escludere, per ora, che anche il *Cimex lectularius* possa essere, in certi casi, nelle Regioni Mediterranee, il veicolo di trasmissione del Kala-Azar da uomo ad uomo.

(5) Basile Carlo, *Rendic. Acc. Lincei*, volume XX, sem. I, fasc. 4.

rassa di alcune di quelle famiglie che hanno l'abitudine di tenere cani in casa.

Riguardo alla percentuale delle pulci infette, posso dire che su circa mille, finora esaminate, provenienti da Bordonaro (raccattate sui cani e nelle coltri e nelle materassa di molte famiglie), solamente in quattro ho potuto rinvenire forme di *Leishmania*: in una proporzione adunque, per ora, del 4 per 1000.

La *Leishmania* si moltiplica attivamente nella pulce *serraticeps*, ove compie il suo ciclo evolutivo; nella mia terza Nota sull'argomento (<sup>1</sup>), in data 8 gennaio 1911, ho già pubblicato che facendo nutrire, alla temperatura di 22°, delle pulci *serraticeps* con succo splenico di un cane infetto di Leishmaniosi, avevo, sin dal dicembre 1910, osservato « che nel loro intestino le *Leishmanie* si mostrarono di gran lunga più abbondanti di quel che non fossero nel succo splenico di cui esse pulci si erano nutrite » e che i detti protozoi « si presentarono alcuni in via di divisione longitudinale ed altri in altri stadi di sviluppo »; più tardi, nella Nota quarta, in data 19 febbraio 1911, chiarendo questo concetto, scrissi « che i parassiti numerosissimi, disposti frequentemente a rosetta, si erano presentati, alcuni nello stadio preflagellato, in via di divisione longitudinale, altri nello stadio flagellato »; oggi mi sia permesso aggiungere, che negli stessi preparati ho osservato anche delle forme che, per ora, tendo a ritenere come appartenenti allo stadio postflagellato del parassita.

Nei preparati allestiti per strisciamento dell'intestino di pulci infette, dissecati, fissati in alcool assoluto e coloriti al Giemsa, si osservano nell'intestino medio, *Leishmanie* di forma ovale, rotondeggiante o piriformi, perfettamente identiche a quelle che riscontransi nel fegato, nella milza e nel midollo degli infermi e dei cani infetti. Questi protozoi misurano in media  $\mu$  2-3; il nucleo eccentrico appare quasi sempre compatto, qualche volta con un vacuolo centrale, di un colorito lacca-carminio (rosso violaceo intenso); il blefaroblasto alle volte non si vede; ovvero può essere rotondeggiante o bastonciforme, di un colorito identico o più intenso del nucleo; il protoplasma assume una delicata tinta di bleu pallido. Man mano però il protoplasma si ingrandisce e si vacuolizza; si ottengono così delle forme di 4-6  $\mu$  di lungh., 2-3,5  $\mu$  di largh., in alcune delle quali il nucleo invece che compatto si presenta reticolare e spostato verso il centro del parassita.

Verso l'intestino posteriore si riscontrano corpi rotondeggianti o piriformi (6-8  $\mu$  di lunghezza, 1,5-2,5  $\mu$  di larghezza) dei quali alcuni muniti di flagello, che, nelle osservazioni fatte finora, non eccede, in questi corpi, la lunghezza di 3  $\mu$ . La caratteristica delle forme a pera in genere, è che il blefaroblasto, ora puntiforme, ora a bastoncino, ora falceiforme presentasi

(<sup>1</sup>) Basile Carlo, *Rend. Acc. Lincei*, vol. XX, sem. I, fasc. 1.

quasi costantemente dal lato arrotondato che è l'anteriore e dal quale, nelle forme completamente sviluppate, parte il flagello; però ho riscontrato (V. fotomicrogramma) delle forme a pera, di piccole dimensioni, in alcune delle quali la parte anteriore è lievemente assottigliata; in queste forme è da notare però che il blefaroblasto appare costantemente addossato al nucleo. Assieme alle forme a pera flagellate o no, isolate o disposte a rosetta, trovansi delle forme allungate (9-11  $\mu$ ) munite di flagello, e che presentano anch'esse l'estremità anteriore arrotondata e l'estremità posteriore a punta.

Il blefaroplasto ordinariamente unico, qualche volta può essere doppio.

Il flagello può apparire riunito al blefaroplasto; all'esame microscopico qualche forma a pera presenta due flagelli, qualche volta apparentemente agglutinati l'uno all'altro; a questo proposito voglio far notare che l'esame fotomicrografico (a luce monocromatica) rivelò, in qualche altra forma ancora, ritenuta al microscopio monoflagellata, l'esistenza di due flagelli.

Si nota tutta una serie di forme di passaggio sino a giungere così a forme di piccole dimensioni da me, per ora, ritenute postflagellate, caratterizzate, in gran parte, da un blefaroblasto che pare addossato al nucleo.

Chi osserva le fotomicrografie e i disegni da me dati di *Leishmania* nella pulce *serraticeps* e li confronta coi disegni dati dal Rogers delle forme da lui ottenute, nel 1904 coltivando i parassiti del Kala-Azar nel sangue al citrato di sodio (10 per 100) alla temperatura di 22°, ne riconosce la perfetta identità non solo nella forma ma anche nelle dimensioni. Le figure da me date minutamente ripetono poi, le figure date dal Leishman che ha coltivato i parassiti del Kala-Azar nel 1905, nel succo splenico addizionato di acido citrico, e tenuto alla temperatura di 17°-22°, e le figure date dalla maggior parte degli altri autori che hanno ottenute culture di *Leishmania*.

Dalle mie ricerche fatte finora parrebbe che nella pulce *serraticeps* le *Leishmanie* si evolvono completamente alla temperatura di 20°-22°; questo fatto ha un riscontro nell'epidemiologia del Kala-Azar (1).

\* \* \*

Dal complesso delle mie pubblicazioni « sulla *Leishmaniosi* e sul suo modo di trasmissione », risulta che io, per primo, ho segnalato l'esistenza, in Italia (Messina-Roma), di tale infezione naturale nei cani, studiandone accuratamente la sintomatologia e il decorso clinico, il quale, per quanto in oggi è noto, corrisponde al decorso clinico del Kala-Azar. Spetta anche a me (per quanto sono andato pubblicando) la priorità della ipotesi che, oggi, per mezzo delle mie ricerche e dei miei esperimenti viene realizzata, che « la pulce *serraticeps* è l'agente trasmissore dei parassiti di Leishman » e mi sia ancora permesso rivendicare a me la priorità di aver

(1) Sarebbe interessante poter stabilire se ed a quale temperatura le *Leishmanie* arrestano il loro sviluppo nella pulce.

segnalato, nella pulce *serraticeps*, una parte importante del ciclo evolutivo delle *Leishmanie*.

Dopo che io, il 19 febbraio 1911, nella mia quarta Nota presentata alla Reale Accademia dei Lincei, chiarendo quanto avevo scritto in data dell'8 gennaio, pubblicavo che sin dal dicembre 1910 avevo visto le forme flagellate di *Leishmania* nella pulce *serraticeps*, Sangiorgi, assistente nell'Istituto d'Igiene della Regia Università di Torino, ha descritto in *Pathologica*, in data 1° marzo 1911 « il quadro evolutivo completo in natura » di alcuni protozoi della pulce *serraticeps* « rassomiglianti » alle forme di *Leishmania* dei quali in data del 13-15 gennaio 1911 aveva dato alcune prime notizie.

Ognuno noti quante e quali differenze passino fra le *Leishmanie* da me, fino ad ora, ottenute, nei loro vari stadi di evoluzione, in pulci *serraticeps*, nutrite alla temperatura di 22°, con succo splenico di un cane infetto di *Leishmaniosi* (a decorso cronico) ed i protozoi descritti dal Sangiorgi (1).

Io aggiungo che il Patton, che nel 1907 aveva pubblicato di aver seguito lo sviluppo della *Leishmania (Herpetomonas) Donovanii* nel *Cimex rotundatus* (2), essendogli falliti gli esperimenti della trasmissione sperimentale del Kala-Azar ai cani di Madras ed essendo stata notata, nel 1908, da lui stesso e da vari altri autori la presenza di *Herpetomonas* nell'intestino di vari insetti, il 30 gennaio 1909 (3), in uno studio ove tratta dell'*Herpetomonas Lygaei* e dell'*Herpetomonas muscae domesticae* ha scritto: « It seem to me, therefore, that it will be well-nigh impossible to prove finally that *Cimex rotundatus* is the carrier of this dangerous parasite ».

Noto ancora che Balfour (4) nel 1906 ha descritto le prime forme di *Herpetomonas* nel *Pulex (Pulex Cleopatrae)*, ectoparassita di alcuni roditori;

(1) Sangiorgi, dopo aver notato che i protozoi da lui descritti come « forme di *leishmania* nella pulce *serraticeps* », quando son disposti a rosetta, nello stadio flagellato presentano il flagello rivolto verso il centro delle rosette stesse, vorrebbe per questo differenziarle dall'*herpetomonas*; e infatti fra l'altro scrive che « l'*herpetomonas* negli agglomeramenti si sogliono disporre in modo che la parte posteriore, e non l'anteriore, ossia la flagellata, guarda verso il centro della rosetta ». Seguendo queste parole dovremmo ritenere che le forme flagellate a rosetta ottenute dal Pulvirenti, innestando nei terreni di Novy-Neal e Novy-Neal-Nicolle, succo splenico di bambini affetti da Kala-Azar, non sieno *Leishmanie*, e che ad es. l'*herpetomonas ctenophthalmi* (Mackinnon: *Parasitology*, 1909) e l'*herpetomonas iaculum Leger of Nepa Cinerea* (Porter, *ibidem*) non sieno *herpetomonas*. Termine piuttosto ricordando che qualche autore dà perfino il nome di *Herpetomonasiasi* al Kala-Azar ed al Bottone d'Oriente.

(2) Patton, *Scient. Mem. by. off. of the Med. and San. dep. of the Gov. of India*. Calcutta 1907.

(3) Patton, *The Lancet*, 1909.

(4) Balfour A., *Journal of Hyg.* t. VI.

che più tardi nel 1908 Patton <sup>(1)</sup> ha segnalato forme di *Herpetomonas* nel *Ctenocephalus felis* <sup>(2)</sup>, e che nel 1909 il Mackinnon <sup>(3)</sup> ha studiato in *Ctenocephalms agurtes* (pulce del *Mus decumanus*) un *Leptomonas* che egli chiama *Herpetomonas ctenophthalmi* <sup>(4)</sup>.

Data la frequenza di protozoi, spesso morfologicamente simili, nell'intestino degli insetti, a me sembra che chi studia i protozoi, agenti etiologici di forme morbose, nel loro ciclo evolutivo, più che dallo studio morfologico di essi, è dagli esperimenti che, per ora, può trarre rigorose deduzioni; ed è per ciò che oggi, ancora una volta, ripeto che « per molte ragioni, deve ritenersi almeno prematura, per ora, l'identità dei protozoi descritti dal Sangiorgi alle forme di Leishman ».

#### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA.

##### *Leishmanie nella Pulce Serraticeps*

- QUADRO I. — Fotomicrogramma a luce monocromatica (ingr. 2000 d.). Il parassita *a* perfettamente identico a quelli che riscontransi negli organi degli uomini e dei cani infetti: i parassiti *b*, disposti a rosetta, sono in via di evoluzione; fra essi il parassita *c* è in divisione longitudinale.
- QUADRO II. — Fotomicrogramma a luce monocromatica (ingr. 2000 d.). Parassiti nello stadio preflagellato, di cui qualeuno in divisione longitudinale. Parassiti, di piccole dimensioni, muniti di flagello.
- QUADRO III. — Disegni alla camera lucida all'ingrandimento 900 diametri ( $\frac{1}{16}$  semiapocr. e ocul. 6) e riprodotti a circa 2700 diametri per renderne più esattamente i particolari. Parassiti nello stadio preflagellato e nello stadio flagellato.

Le fotomicrografie sono state eseguite dal mio caro amico dott. F. Faure, dell'Istituto di Botanica della R. Università di Roma.

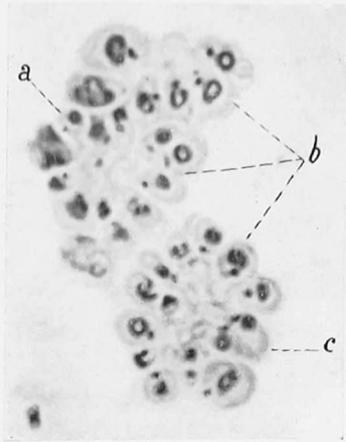
<sup>(1)</sup> Patton. Ann. Rep. upon the Work of the bact. set. of the King Inst. Madras 1908.

<sup>(2)</sup> *Pulex (Ctenocephalus) Felis* e *Pulex (Ctenocephalus) Canis* sono ritenute due varietà di *Pulex (Ctenocephalus) Serraticeps*. (Vedi Tiraboschi, Arch. de Parasitologie, t. VIII.

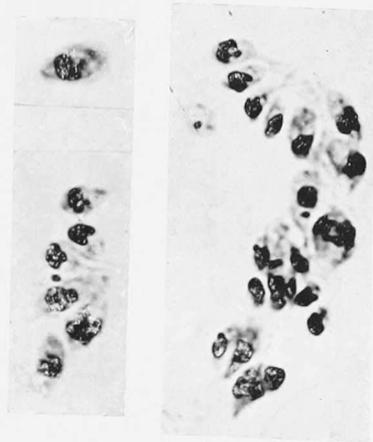
<sup>(3)</sup> Mackinnon, *Parasitology*, 1909.

<sup>(4)</sup> Io mi limito per ora a trascrivere in parte il riassunto che ne dà il Bull. de l'Inst. de Pasteur (anno 1910, pag. 25): « *Herpetomonas ctenophthalmi* est un *leptomonas* à extrémité antérieure pointue et à extrémité postérieure longue et particulièrement ténue; le corps mesure  $21 \times 2 \mu$ ; mais il y a aussi des formes extrêmement petites et parfois des éléments larges et trapus ».

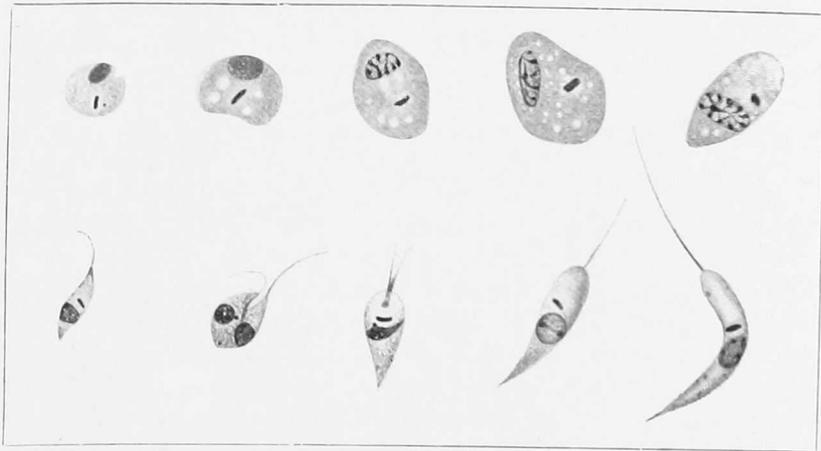
E. M.



Quadro primo.



Quadro secondo.



Quadro terzo.