

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI  
ANNO CCXCVI.

1899

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME VIII.

1° SEMESTRE



ROMA  
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1899

**Zoologia medica.** — *Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo del zanzarone.* Nota preliminare di B. GRASSI, A. BIGNAMI e G. BASTIANELLI.

Continuando nello studio del ciclo evolutivo dei parassiti della malaria nel corpo dell'*Anopheles claviger* Fabr. (zanzarone), abbiamo seguito due vie. Abbiamo, cioè, esaminato un gran numero di zanzaroni presi in vita libera nelle camere e nelle capanne, ove dormivano uomini affetti da febbri malariche; in questi zanzaroni venivano osservati vari stadi di sviluppo del parassita. Da tale studio, vista la quantità del materiale adoperato, potevamo aspettarci, come avvenne di fatto, risultati notevoli. Contemporaneamente erano studiati i zanzaroni, raccolti nelle stalle e nei pollai, i quali, nutrendosi di sangue di uccelli e di mammiferi domestici, potevano servire fino ad un certo punto come controllo delle osservazioni precedenti.

L'altra via fu di seguire lo sviluppo dei parassiti in *Anopheles*, dai quali si facevano pungere in giorni ed ore determinate i malarici dell'ospedale. Venivano sezionati sistematicamente giorno per giorno e così si seguiva lo sviluppo regolare del parassita, mentre in altri zanzaroni che non avevano punto uomini malarici ed erano tenuti nelle stesse condizioni non si osservavano i parassiti in discorso.

Anche con questo metodo le nostre osservazioni sono state portate sopra un gran numero di individui.

La comparazione dei risultati ottenuti per le due vie diverse doveva servire alla ricostruzione del ciclo evolutivo dell'emosporidio della malaria umana.

Gli *Anopheles* sono stazionari circa dal principio di novembre nelle abitazioni, nelle stalle e nei pollai, senza uscir fuori tranne in casi eccezionali<sup>(1)</sup>. Ciò si verifica anche in Lombardia, dove questa stazionarietà dura dal principio di settembre. I zanzaroni nella campagna Romana seguitarono a pungere, mentre in Lombardia le loro punture andarono diradandosi di molto.

In queste condizioni le femmine<sup>(2)</sup> stazionarie nelle abitazioni di persone malariche dovevano infettarsi molto, e quelle dimoranti nelle stalle e nei pollai, dovevano mantenersi almeno in gran maggioranza non infette. Ciò inducevamo dal fatto che quando i zanzaroni erano abbondantissimi, era difficile trovarne di infetti, tanto che uno di noi, il Grassi, non ebbe a vederne uno solo in tante dissezioni che fece a Locate Triulzi. Conformemente alla nostra induzione, la

(1) Nelle case si trovano però quasi soltanto femmine. Gli ovari si mantengono molto arretrati nello sviluppo nella gran maggioranza dei casi. Le femmine si cibano di sangue: una volta sola ne trovammo una che avea nell'intestino granuli di clorofilla.

(2) Si noti che le femmine continuano a nutrirsi (ad intervallo di circa 2 giorni, se stanno alla temperatura di 30° circa) senza che gli ovari maturino.

percentuale di zanzaroni infetti raccolti in certe abitazioni di malarici andò crescendo fino a raggiungere il 75 %, mentre non abbiamo ancora trovato alcun zanzarone infetto (1) fra quelli presi in una stalla o in un pollaio; ma ciò deve anche mettersi in rapporto colla circostanza che il zanzarone infetto si libera dei parassiti (vedi più sotto).

Come si è detto, negli *Anopheles* catturati nelle abitazioni abbiamo potuto vedere tutte le fasi di sviluppo dell'emosporidio. Per brevità di descrizione riportiamo insieme i risultati di queste osservazioni con quelli ottenuti dalle culture metodiche.

Le colture erano fatte mettendo immediatamente dopo la puntura il zanzarone in stufa alla temperatura di 30°. Una serie di osservazioni datanti dai primi di novembre ci fa sospettare che alla temperatura di 14-15° (temperatura ambiente) nelle prime ore dopo la puntura, non si possa avere lo sviluppo dell'emosporidio.

Uno sviluppo si ha certamente tenendo i zanzaroni a temperatura di 20-22°, ma procede più lentamente che non a 30°, e l'esame degli insetti diventa più difficile perchè si liberano più lentamente del sangue. Sicchè i nostri risultati rispetto al tempo, a cui si riferiscono le singole fasi dopo la puntura, sono quelli che si ottengono tenendo l'*Anopheles* a 30° in stufa.

*Per le febbri estivo-autunnali*, abbiamo già detto in una Nota precedente che le forme della fase semilunare dell'uomo si sviluppano ulteriormente nel zanzarone.

Perchè lo sviluppo delle semilune abbia luogo, è necessario che esse siano mature; solo quando esaminando il sangue si riscontrano forme della fase semilunare che si trasformano rapidamente in corpi rotondi e si flagellano, si hanno risultati positivi: si può dire che quando queste forme sono completamente mature, se ne ottiene uno sviluppo regolare, nell'ospite nuovo.

Quale sia il modo di penetrazione della semiluna nelle pareti dell'intestino medio e quali fasi percorra prima di penetrarvi, non è argomento di questa Nota: ce ne occuperemo in un prossimo lavoro.

Dopo 2 giorni si vedono nell'intestino medio tra le fibre muscolari dei corpi subrotondi, od ovoidi, o più di rado rotondi, forniti di capsula (emosporidio in via di sviluppo).

Il pigmento si riconosce identico a quello delle semilune: esso sta vicino alla periferia in ammassi piuttosto grossi: di frequente appare disposto in due file parallele; a metà della lunghezza di ogni fila stanno le masse più grosse. A fresco il corpo dell'emosporidio è molto trasparente, con accenno di vacuoli.

(1) Si eccettua il reperto delle spore (corpi bruni) di cui appresso.

Dopo 4 giorni i parassiti sono aumentati di volume, l'aspetto vacuolare è più evidente: il pigmento sembra in minore quantità ed è qua e là disperso.

Dopo 6 giorni i parassiti sono enormemente cresciuti di volume: stanno nello spessore dell'intestino medio, facendo ernia, ciò che era già cominciato allo stadio precedente, nella cavità del celoma, dalla quale apparentemente li separa una tunica esterna anista dell'intestino medio. Si vedono bene anche coi piccoli ingrandimenti. Vi si distinguono moltissimi corpiccioli: il pigmento è diminuito: si notano inoltre dei corpuscoli splendenti d'aspetto adiposo, che in parte esistevano già in stadi precedenti.

Dopo 7 giorni il parassita contiene un enorme numero di filamenti disposti a raggi attorno a parecchi centri: i filamenti sono lunghi circa 14  $\mu$ . e sono estremamente sottili. In alcuni individui si distingue con nettezza una massa chiara omogenea, in altri se ne distinguono due-tre, in altri infine non si riesce a vederne. Esiste ancora il pigmento: esso sta nelle masse chiare or ora indicate. Da questi parassiti schiacciati escono fuori i filamenti.

Se le singole forme fin qui descritte vengono studiate con i metodi citologici, è facile persuadersi che siamo davanti ad uno sporozoo, di cui seguiamo le varie fasi fino alla maturazione. Il processo trova riscontro in molte altre forme di sporozoi e consiste essenzialmente nell'aumento di volume accompagnato da incapsulamento e da moltiplicazione del nucleo che finisce (sesto giorno) a trovarsi diviso in numerosissimi nuclei piccolissimi, attorno ai quali si dispone un po' di protoplasma (sporoblasti senza capsula), lasciando dei residui di segmentazione (*nucleus de reliquat*).

Gli sporoblasti si trasformano direttamente in altrettanti sporozoiti, molto delicati, filiformi, ad estremità assottigliate, lunghi circa 14  $\mu$ .

Lo sporozoo maturo (settimo giorno) è appunto costituito da una capsula sottile, da innumerevoli sporozoiti e dai residui di segmentazione.

Nei giorni successivi si trovano aderenti ancora all'intestino le capsule rotte e afflosciate, e vicino ad esse gli sporozoiti: essi si disperdono per tutto il celoma. Più tardi si rinvencono accumulati in enorme numero soltanto nei tuboli componenti le glandole salivari: qui stanno, o dentro le cellule, o nel lume da queste delimitato.

In questo stadio si possono trovare ancora nell'intestino le capsule, o i residui di queste, ma in qualche individuo non si trova più nulla. È lecito ammettere che in quest'ultimo caso le capsule siano state riassorbite.

Gli sporozoiti quando sono ancora nella capsula appaiono immobili, così pure nelle glandole salivari: in un caso però, mentre erano dispersi in varie parti del corpo, li abbiamo veduti mobili.

Per le terzane comuni (*primaverili*) le nostre osservazioni sono meno avanzate: fino ad ora abbiamo seguito lo sviluppo dell'Emosporidio soltanto

fino al 5° giorno. Lo studio della terzana presenta maggiori difficoltà perchè le forme mature e non sporulanti, che sono quelle che si sviluppano nell'*Anopheles*, non si trovano nel sangue in così gran numero come le forme semilunari: sicchè il reperto nel zanzarone è senza confronto più scarso.

Gli Emosporidi della terzana si distinguono nel corpo dell'*Anopheles* da quelli delle febbri estivo-autunnali almeno per gli stadi che abbiamo finora osservati. Il corpo dell'Emosporidio è più pallido, meno rifrangente ed un poco più grande ad uguale stadio di sviluppo; il pigmento è assai più scarso e più fino.

Naturalmente negli *Anopheles* che hanno punto parecchie volte si rinnovano uno accanto all'altro i differenti stadi di sviluppo: ciò vale tanto per la terzana primaverile quanto per le febbri estivo-autunnali.

In rari casi (zanzaroni presi nelle abitazioni dei malarici e nelle stalle) abbiamo riscontrato dei corpi speciali che meritano tutta la nostra attenzione.

Questi corpi sono di forma e di lunghezza varie: alcuni a forma di saliscia, più lunghi di uno sporozoite e con strozzamenti, altri lunghi circa la metà di uno sporozoite, ovalari, dritti o curvi. Essi hanno una membrana robusta di color giallobruno e contengono un corpo paragonabile ad uno sporozoite, evidente soprattutto nelle forme corte. Si possono seguire i vari stadi di sviluppo della membrana. I corpi in discorso si trovano in mezzo a masse granulose senza capsula, o incapsulate.

Evidentemente si tratta di spore, quali si riscontrano in altri sporozoi. Come si sviluppano, non abbiamo potuto finora precisarlo.

Talvolta colpisce straordinariamente l'irregolarità loro, la quale può essere tale da far pensare a processi degenerativi.

Rivolgiamo l'attenzione alle glandole salivari di molti *Anopheles*, che hanno punto malarici da parecchio tempo. Nelle glandole salivari si vede *con molta frequenza* che le cellule invece di presentarsi ialine, hanno un contenuto che descriveremo con qualche particolare.

Talvolta tutta la cellula è riempita da corpicciuoli apparentemente rotondi, subrotondi o lievemente allungati, ammassati; di altre cellule essi occupano solo la parte centrale. Talvolta in un tubulo si trovano poche cellule contenenti questi corpicciuoli, ma più spesso uno o più tubuli ne sono ripieni. Se si schiaccia la glandola, fuoriescono dalle cellule suddette corpicciuoli fusiformi, molto più corti degli sporozoi, più tozzi e forniti di nucleo. In qualche caso abbiamo veduto nella stessa cellula in mezzo a questi corpicciuoli corti dei filamenti, che si riconoscevano facilmente essere gli sporozoi ordinari, provenienti dalle capsule apertesi nel celoma. In un caso questi sporozoi furono veduti al microscopio accorciarsi e prendere la forma dei corpicciuoli più corti ora descritti.

Accanto alle cellule contenenti questi corpi, se ne trovano altre contenenti una grossa massa, generalmente rotonda, talvolta curva, quasi a

sembrare una semiluna, ovvero varie masse simili, più piccole, d'aspetto jalino.

Questo reperto è stato osservato: 1) negli *Anopheles* provenienti dalle abitazioni e sezionati a periodi più o meno lontani dalla puntura; 2) negli *Anopheles* che avevano prodotto una terzana primaverile circa un mese prima.

In complesso da quanto finora abbiamo veduto risulta che, mentre il reperto di sporozoiti uguali a quelli delle capsule intestinali è andato diminuendo man mano che ci allontanavamo dal periodo in cui il zanzarone presentava i parassiti maturi nelle pareti intestinali, al contrario è andato aumentando il reperto dei corpi jalini descritti sopra.

Tutti questi fatti si possono spiegare ritenendo che gli sporozoiti non espulsi dalle glandole salivali vadano incontro ad un processo regressivo, si modificano nella forma e nell'aspetto e finiscano per esser digeriti.

Le osservazioni fin qui riportate permettono di ricostruire il ciclo di vita degli Emosporidi umani nel corpo dell'*Anopheles claviger*: esso trova in gran parte riscontro in quello osservato da Ross per il *proteosoma* degli uccelli nel *grey mosquito*.

Tra le fibre della tunica muscolare dell'intestino medio, specialmente nei tre quarti posteriori di questo, i parassiti malarici si sviluppano ulteriormente.

Tale sviluppo si è constatato, sino ad ora, per i parassiti delle febbri estivo-autunnali e per quelli della terzana comune. Ma non tutte le forme di questi due parassiti sono capaci di svilupparsi nell'ospite nuovo. Per le febbri est.-aut. lo sviluppo si verifica quando vi sono nel sangue del paziente semilune adulte capaci di mutarsi in flagellati: per la terzana quando vi sono grossi corpi pigmentati sterili, già descritti da vari osservatori, che possono flagellarsi: cioè lo sviluppo si verifica quando vi sono nel sangue quelle forme che il Grassi e il Dionisi giudicano gameti. Come si è veduto, le prime fasi di vita nell'intestino del zanzarone presentano aspetto alquanto differente a seconda che provengono dalle semilune, o dai corpi pigmentati della terzana, tanto che è possibile, se non facile, la diagnosi differenziale tra le due forme.

L'emosporidio cresce piuttosto lentamente e presto si circonda di una capsula. Sulla rapidità dello sviluppo pare abbia importanza la temperatura dell'ambiente e forse anche la possibilità, in cui si trova il zanzarone di nutrirsi, o no di nuovo. Di mano in mano che lo sviluppo procede, il parassita fa sporgenza nella cavità del celoma. Esso raggiunge il diametro di circa 70  $\mu$ .

Mentre avviene questo progressivo aumento di volume, nell'interno del parassita si producono quegli intimi mutamenti di struttura che conducono alla sporulazione (sporoblasti nudi che si trasformano direttamente in spo-

rozoiti). Ad un certo punto la capsula si rompe e gli sporozoiti si disperdono nel celoma.

In uno stadio più avanzato gli sporozoiti si trovano raccolti entro le cellule delle glandole salivari, alcune delle quali ne possono contenere un numero grandissimo. Dalle cellule vengono eliminati nel lume dei tuboli glandolari, dove qualche volta si possono vedere in tale abbondanza che lo riempiono in gran parte. Così si capisce come, quando l'*Anopheles* punge di nuovo l'uomo, possa infettarlo.

Questo passaggio dall'uomo all'*Anopheles* e da questo di nuovo all'uomo, viene *completamente* dimostrato dalle osservazioni e dagli esperimenti e costituisce il risultato più sicuro delle nostre ricerche.

L'emosporidio presenta un altro ciclo di vita nel corpo del zanzarone, la cui destinazione non è ancora chiarita. Mentre la grandissima maggioranza dei parassiti forma sporozoiti, alcuni terminano con la formazione delle spore giallo-brune descritte sopra.

Queste ultime sono state riscontrate da noi soltanto in rari esemplari. La grossa membrana, di cui sono provviste, fa pensare con fondamento che siano dotate di grande resistenza agli agenti esterni. Certamente colla morte delle zanzare possono passare nell'acqua.

Due ipotesi si possono fare sulla loro ulteriore evoluzione. Esse sono destinate o ad infettare la prole (soltanto?), o direttamente l'uomo che le ingoia coll'acqua.

Contro quest'ultima ipotesi stanno tutti i fatti epidemiologici, che sono stati invocati contro la così detta *teoria dell'acqua*: Bignami e Bastianelli ritengono più che inverosimile il concetto che l'uomo possa infettarsi bevendo le acque dei luoghi palustri. Ma non vogliamo qui entrare in questa discussione, che è stata fatta lungamente in vari scritti recenti.

Malgrado però tutto, nuovi esperimenti sono stati iniziati per vedere se l'ingestione di queste *spore* possa produrre la febbre malarica nell'uomo e ne attendiamo i risultati.

La prima ipotesi include l'idea della infezione ereditaria delle zanzare: include, cioè, il concetto che l'infezione sporozoica possa passare dalle zanzare alla nuova generazione. A favore di questa ipotesi sta, innanzi tutto, l'analogia della febbre del Texas, nella quale il passaggio dell'infezione dalla zecca madre ai figli è dimostrato: stanno inoltre, secondo due di noi, Bignami e Bastianelli, alcuni fatti epidemiologici che sarebbe difficile spiegare altrimenti. Ad esempio, come si potrebbe spiegare l'insorgere, nella campagna di Roma, dei primi casi di febbre estivo-autunnale sulla fine di Giugno o in principio di Luglio, mentre nella primavera malati con semilune non si trovano affatto? Si potrebbe forse osservare che si trovino eccezionalmente. Ma, ammesso anche il fatto eccezionale, come spiegare con esso il fatto costante, a cui si è sopra accennato? Tutto ciò porterebbe di necessità ad am-

mettere l'infezione ereditaria delle zanzare (1), se la difficoltà di spiegare un fatto potesse valere come argomento sufficiente a farne ammettere un altro.

Ma, volendo rimanere nei limiti dei fatti osservati, dobbiamo, per ora, lasciare la questione insoluta. Aggiungiamo soltanto, che tutte le ricerche fatte sulle uova di zanzaroni infetti non ci hanno permesso, sino ad ora, di rilevarvi alcun corpo parassitario: la qual cosa ci allontana dall'ipotesi, che l'infezione ereditaria delle zanzare, se pure avviene, si faccia direttamente dentro le uova.

E però propendiamo per l'idea che l'infezione della prole avvenga per ingestione delle spore da parte delle larve.

Conchiudendo possiamo affermare:

1° Gli Emosporodi della malaria (i fatti sopraesposti e quelli già noti dal punto di vista zoologico permettono di mantenere la famiglia degli *Emosporidi* o *Emamebini*, che si voglia dire), percorrono nell'uomo il ben noto ciclo di vita caratterizzato dalla lunga durata della fase ameboide e dalla mancanza di stadi incapsulati: in questo ciclo si riproducono un numero indeterminato di volte, ma danno anche luogo a forme che per l'uomo restano sterili (gameti di Grassi e Dionisi) (2).

Queste ultime pervenendo nell'intestino dell'*Anopheles claviger* Fabr. (3) allo stato d'insetto perfetto, si sviluppano come sporozoi tipici sino a formare un numero enorme di sporozoi che accumulandosi nelle glandole salivari ritornano nell'uomo all'atto della puntura. Possono invece percorrere un altro ciclo di vita, che dà luogo alla formazione di spore.

2°. Lo sviluppo degli Emosporidii malarici nel corpo del zanzarone è dimostrato per il parassita delle febbri estivo-autunnali e per quello della zanzana ordinaria (4).

3. Mentre è dimostrato il passaggio diretto degli emosporidi dall'uomo al zanzarone e da questo di nuovo all'uomo, il passaggio dalle zanzare alla prole è verosimile, ma in linea di fatto include una questione che resta ancora da studiare.

*Aggiunte ulteriori.* — Nelle larve di certi Culicidi la parete dell'intestino medio presenta degli Sporozoi: avremo presto occasione di stabilire se essi abbiano rapporti cogli Emosporidi.

(1) L. Pfeiffer ha trovato in una larva di *Culex* una *Glugea*, che potrebbe appartenere al ciclo evolutivo degli emosporidi.

(2) La sede di formazione delle semilune è il midollo osseo (Marchiafava e scolari): si può pensare che lo stesso accada per le forme analoghe delle febbri primaverili.

(3) Sinonimi: *Anopheles maculipennis* Meig. e *Zanzarone*.

(4) Ciò non esclude naturalmente che possa verificarsi anche in altre specie di ditteri.

I zanzaroni in certe località presentano spesso le spore, di cui si parla nella Nota.

Nelle uova molto sviluppate di alcuni zanzaroni abbiamo trovato numerosissimi corpi, che potrebbero interpretarsi come spore degli Emosporidi umani.

Abbiamo ottenuto un altro caso di terzana comune colle punture di soli sette zanzaroni.

**Matematica.** — *Sulla convergenza delle frazioni continue algebriche.* Nota del dott. ETTORE BORTOLOTTI, presentata dal Socio V. CERRUTI.

Se indichiamo con  $x$  il punto generico di un insieme infinito ed ordinato  $\Gamma$ , e rappresentiamo con  $t = \rho e^{i\theta}$  un punto qualunque, del piano della variabile complessa, essendo date  $n + 1$  funzioni arbitrarie:

$$a_{0,x}(t), a_{1,x}(t), \dots, a_{n,x}(t),$$

delle due variabili  $x, t$ , dalla forma lineare alle differenze:

$$A(y) = a_{0,x}(t)y_{x+n} + a_{1,x}(t)y_{x+n-1} + \dots + a_{n,x}(t)y_x,$$

si possono immaginare generate infinite specie di algoritmi di cui, nel caso di forme del 2° ordine, il più semplice ed importante è quello delle frazioni continue.

Le condizioni di convergenza di quegli algoritmi sono ancora poco note; il solo ad occuparsene, e per certi speciali algoritmi detti "generalizzati delle frazioni continue", fu il prof. Pincherle (1) il quale peraltro ha sempre ammesso che, in ogni punto  $t$ , di un determinato intorno, convergono regolarmente verso limiti unici, le successioni:

$$a_{s,0}(t), a_{s,1}(t), a_{s,2}(t), \dots \\ (s = 0, 1, \dots, n)$$

Per gli algoritmi periodici, a mo' d'esempio, non si saprebbe applicare alcun criterio di convergenza, e nemmeno si saprebbe rispondere alla domanda: se la frazione continua algebrica PERIODICA:

$$a_0(t) + \frac{b_1(t)}{a_1(t) + \frac{b_2(t)}{a_2(t) + \dots}}$$

possa, in qualche caso, definire una funzione analitica della  $t$ .

(1) Sarebbe troppo lungo ricordare tutti gli importanti lavori del Pincherle su questo argomento; citerò, p. es.: *Contributo alla generalizzazione delle frazioni continue* (Mem. Acc. di Bologna, a. 1894).