

RICERCHE SULL'*ACHROMATICUS VESPERUGINIS* DIONISI

DOTT. GIAN MARIA GHIDINI E DOTT. MELITA MORIGGI

Istituto di Zoologia della R. Università di Roma.

Direttore: Prof. Edoardo Zavattari.

PREMESSA.

Nel 1899 DIONISI comunicava la scoperta di un nuovo emoparassita che egli aveva rinvenuto in *Nyctalus noctula* della Campagna romana e che presentava in alcuni stadi del suo sviluppo fortissime somiglianze con le forme giovanili apigmentate dell'agente delle febbri estivo-autunnali.

A tale emoparassita, che in nessuno dei vari stadi di sviluppo riscontrati da DIONISI aveva rivelato presenza di pigmento, fu dato dall'A. il nome di *Achromaticus vesperuginis*.

Pur avendo però studiato il parassita su un grande numero di animali infetti, DIONISI si è limitato a raccogliere in gruppi più o meno omogenei, le diverse forme osservate, preoccupato non tanto di interpretare il loro ciclo di sviluppo, quanto di accertare se il parassita delle nottole non fosse in rapporto con le febbri estivo-autunnali e se le nottole non costituissero, eventualmente, una riserva di virus. Le sue ricerche lo portarono così a concludere che *Anopheles maculipennis (claviger auct.)* non punge i vesperugini e che il parassita delle nottole non si sviluppa nell'uomo.

KISSKALT, nel 1906, riscontrando nel sangue di un pipistrello infetto da *Achromaticus* anche la presenza di tripanosomi, sospettava, malgrado ricerche accurate non gli avessero permesso di confermarlo, che i due organismi non fossero che stadii differenti di uno stesso parassita.

È dello stesso anno un lavoro di GONDER, in cui l'A. ritrovando in strisci di sangue di *Pipistrellus kuhli*, infetto da *Achromaticus*, alcune

(*) Vivamente ringraziamo l'amico Prof. B. BABUDIERI per i consigli di cui ci è stato largo.

di quelle forme piroplasma-simili, già osservate da DIONISI, prende spunto per sostenere che il genere occupi una posizione intermedia fra i parassiti della malaria e quelli delle piroplasmosi, quasi stesse a segnare il termine di passaggio fra gli *Haemosporidiidea* e i *Piroplasmidea*.

È poi del 1909 un lavoro di NEUMANN in cui l'A. riprende l'ipotesi del KISKALT della probabile relazione fra tripanosomi e *Achromaticus* specialmente in base al reperto di forme flagellate in *Pteropus vespertilionis* (catturato su *Nyctalus noctula* infetto da *Achromaticus*) forme simili a quelle che si conoscevano nell'agente vettore di *Trypanosoma cruzi*.

Ma questa ipotesi è scartata nel modo più categorico da YAKIMOFF, STOLNIKOFF e KOHL-YAKIMOFF, che nel 1912 pubblicano un lavoro di 16 pagg. corredato da tre tavole, per illustrare un parassita da essi riferito ad *Achromaticus vesperuginis*, trovato in uno striscio di sangue di una specie non determinata di pipistrello del Turkestan: questi AA. infatti considerano il parassita come un « vrai piroplasma » e di esso tracciano in linea di massima, il ciclo di moltiplicazione e gametocito, tentando per primi di dare una interpretazione alle varie e diversissime forme riscontrabili in circolo contemporaneamente.

COLES nel 1914 ritrova *Achromaticus* in 7 *Pipistrellus pipistrellus* su 24 pipistrelli esaminati (di cui 3 *N. noctula* e 1 *Plecotus auritus*). Descrive le forme riscontrate nel sangue e in strisci di vari organi ravvicinando infine il parassita a *Nuttallia microti* e *N. muris*.

WENVON (1926) accoglie nei *Piroplasmidea* *Achromaticus vesperuginis*, che prende perciò il nome di *Babesia vesperuginis*, cadendo il gen. *Achromaticus* in sinonimia con quest'ultimo. Questo in conformità ai criteri sistematici che egli adotta nel suo trattato, criteri che si basano sulla presenza o assenza di pigmento per distinguere i due grandi gruppi degli *Haemosporidiidea* dai *Piroplasmidea*.

Nella seconda edizione del suo « Précis de parasitologie », BRUMPT pone pure nel sott'ordine dei *Piroplasmidea* il gen. *Achromaticus* mantenendolo però distinto dai generi vicini, ed aggiungendo al testo una figura originale illustrante alcuni stadi del parassita da lui trovato in *Pipistrellus* sp.

Come appare da quanto abbiamo detto, uno studio più attento di questo parassita si mostrava di particolare interesse, sia per confermare i dati precedenti, se ciò fosse stato possibile, sia per vedere se un più attento esame di numeroso materiale, non permettesse di chiarire il ciclo di sviluppo del parassita, ciclo che era stato sì tracciato da YAKIMOFF, STOLNIKOFF e KOHL-YAKIMOFF, ma che per ragioni che in seguito chiariremo non poteva venir accettato senza essere passibile di critica.

Abbiamo perciò intrapreso la ricerca di tale parassita in varie spe-

cie di pipistrelli e solo in questi ultimi tempi abbiamo potuto far tesoro di alcuni individui abbondantemente infetti di *Achromaticus*.

MATERIALE STUDIATO.

Abbiamo complessivamente studiato novantatre pipistrelli di cui 28 *Rhinolophus ferrum-equinum* (Schreib.) catturati nella grotta Buco del Frate n° 1 Lo. in provincia di Brescia, 3 *Plecotus auritus* L. e 17 *Myotis myotis* (Bechstein) della stessa località; 25 *Miniopterus schreibersi* (Natt.) della Grotta n° 5 La. presso Bellegra; 8 *Rhinolophus ferrum-equinum* dei dintorni di Roma, ed infine 12 *Nyctalus noctula* (Schreib.) della Campagna romana di cui 6 erano infetti da *Achromaticus*. Fra gli ectoparassiti di questi ultimi esemplari non furono osservati pupipari, ma solamente scarsissimi piccoli acari e numerosissime pulci, che da uno di noi furono determinate come *Ischnopsyllus elongatus*. I *Nyctalus*, che erano in marzo ancora in letargo, causa il prolungato periodo di freddo di questo inverno, furono posti in ambiente di 25-30 gradi, perchè uscissero dal letargo e fosse a noi possibile di osservare con maggior completezza il comportamento del parassita nell'ospite in piena attività vitale, nel periodo cioè che DIONISI non aveva potuto seguire bene per la difficoltà di tenere in vita i pipistrelli.

Tentativi preliminari ci avevano dimostrato che, quando i pipistrelli escono dal letargo abbisognano di un ambiente a grado igroscopico abbastanza elevato e che nei primi tempi del risveglio essi sono avidissimi di acqua. Abbiamo perciò tenuto i 12 *Nyctalus* in un termostato abbastanza ampio su truccioli di legno inumiditi, introducendo nei primi giorni stracci bagnati, che venivano lambiti dagli animali in osservazione con grande avidità. Successivamente pensammo di dar loro da bere mediante una pipetta, latte non bollito, visto che rifiutavano insetti, pezzetti di carne, brodo di carne di cui avevamo tentato la somministrazione.

Il latte invece era assai gradito e i *Nyctalus* se ne mostrarono ghiotti al punto che dopo alcuni giorni non opponevano più alcuna resistenza ad essere tenuti in mano e a riceverlo goccia a goccia da una pipetta.

Abbiamo nutrito così per circa 16 giorni i nostri pipistrelli e certo molto più a lungo saremmo riusciti a tenerli in vita se non avessimo loro somministrato, con lo scopo di aumentarne il potere nutritivo, latte zuccherato che, per un imponente processo fermentativo, ha determinato in breve la loro morte.

Malgrado questo, le nostre osservazioni sono state abbastanza rapidamente condotte, tanto da consentirci di controllare alcuni fatti e, come successivamente diremo, altri prospettarne.

RICERCHE COMPIUTE

Le ricerche da noi compiute hanno avuto essenzialmente tre scopi: 1° chiarire il ciclo di sviluppo del parassita; 2° vedere se fra letargo e risveglio vi fossero delle sostanziali differenze nel tipo di parassiti; 3° ricercare quale fosse il probabile agente vettore del parassita.

Per il primo gruppo di ricerche ci siamo serviti, per quanto poteva interessare le condizioni di letargo, degli strisci di sangue fatti su *Nyctalus* appena catturati, e, per quanto riguardava il sistema reticolo endoteliale, su strisci di fegato, milza e cervello di un individuo da noi subito ucciso, mentre per le condizioni di non letargo abbiamo fatto strisci corrispondenti in individui tenuti da alcuni giorni alla temperatura di 25°-30°.

Per quanto riguarda il secondo gruppo, abbiamo tentato l'infezione sperimentale di *Anopheles maculipennis*, *Culex pipiens* e *Aedes aegypti* e ricercato, in assenza di altri ectoparassiti, se la pulce *Ischnopsyllus elongatus* non fosse l'agente vettore della malattia.

Del risultato di questi tentativi diremo separatamente nei paragrafi che seguono.

Negli individui di *Nyctalus noctula* leggermente infetti da *Achromaticus* la malattia non è per nulla evidente, né è stato a noi possibile constatare differenze di comportamento degli individui malati rispetto a quelli sani; se ad una osservazione dobbiamo far cenno è che rispetto a quelli sani gli individui malati mostravano una minore vivacità. Quando il grado di infezione era molto alto essi si presentavano in condizioni di estremo dimagrimento e risultavano perciò facilmente riconoscibili fra quelli sani tenuti in identiche condizioni.

Sangue. — Il sangue degli individui sani adulti contiene circa 6.500.000 eritrociti per mmc. e non presenta mai in strisci colorati presenza di policromatofili; solo raramente è stato visto qualche corpo di Jolly.

Negli individui infetti da *Achromaticus* si conteggiano nelle forme più gravi circa 3.000.000 di eritrociti per mmc. Strisci di sangue mostrano un certo grado di monocitosi e per quanto riguarda i granulociti un aumento notevole nella lobatura dei loro nuclei. Un poco più abbondanti sembrano pure essere gli eosinofili.

Negli individui fortemente infetti si nota notevole anisocitosi e poichilocitosi con altissima policromatofilia accompagnata dalla presenza di molto frequenti corpi di Jolly e da meno abbondanti eritroblasti in diversi stadi del loro sviluppo. Il grado di policromatofilia può essere assunto come indice del grado di infezione perchè essa compare già in individui

leggermente infetti crescendo gradualmente di intensità quanto maggiore è il numero degli eritrociti parassitati.

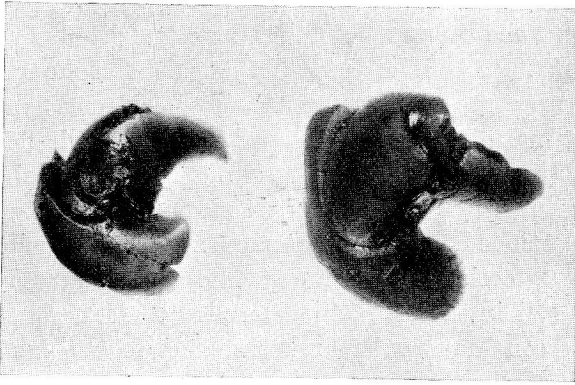


FIG. 1. — Fegato normale (a destra) e ipertrofico (a sinistra) di *Nyctalus noctula*.

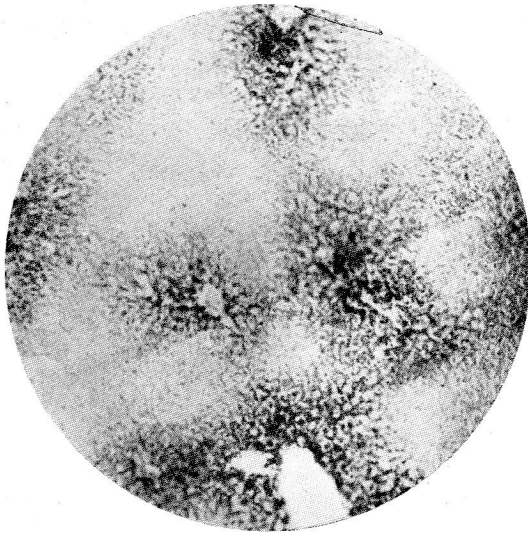


FIG. 2. — Focolai di emosiderina in fegato di animale infetto da sezione colorata con reazione del ferro.

Fegato. — Come appare dall'unita fotografia (fig. 1) il fegato si presenta notevolmente tumefatto; il suo peso per individui molto infetti è circa doppio di quello normale (mgr. 400, mgr. 750).

L'esame di sezioni di fegato (*) fissato in formalina hanno mostrato

(*) Siamo grati allo studente M. BENEDETTI che ha eseguito per noi l'allestimento dei preparati istologici.

la presenza in condizioni patologiche di notevolissimi accumoli d'un pigmento giallo ocraceo distribuito in granuli più o meno grossi in tutte le cellule epatiche e particolarmente abbondante attorno ai vasi (fig. 2); questo pigmento che dà una bellissima reazione del ferro è risultato essere emosiderina. Le cellule di Kupfer appaiono molto ingrossate ed in esse pure figurano grosse granulazioni di emosiderina; questo pigmento però differisce morfologicamente da quello riscontrabile nelle cellule epatiche essendo i granuli delle c. di K. molto grossi, quasi un terzo della cellula, mentre quelli delle c. epatiche sono fini ed assai abbondanti. Osservando una sezione a piccolo ingrandimento risulta molto caratteristica la disposizione a focolai di questo pigmento che deve certo la sua origine ad un processo di intensa siderosi determinato nell'organo dal parassita. La colorazione con Mallory ha dimostrato nel fegato patologico una abbondante proliferazione connettiva.

Milza. — Negli individui fortemente infetti si ha una imponente splenomegalia, raggiungendo la milza circa sette volte il peso dell'organo



FIG. 3. — Milza ipertrofica e normale di *Nyctalus noctula*.

normale (norm. mgr. 40, pat. mgr. 290 (*)). La fig. 3 dà del resto una buona idea delle dimensioni raggiunte da questo organo che alla dissezione si presenta compatto, con colorazione rosso-scura, ed esteso in tutta la regione addominale sinistra, dal diaframma alla regione pubica.

Anche nella milza si ha un accumolo veramente imponente di emo-

(*) È necessario aggiungere però che la milza di pipistrelli sani e di peso pressapoco uguale, ha di per sè un certo grado di variabilità.

siderina visibile sia su sezioni non colorate sia e meglio dopo aver fatto loro subire la reazione del ferro. Il pigmento trovasi sparso entro tutta la polpa splenica in granulazioni più o meno grosse di color giallo ocraceo addensate a volte a formare blocchi di considerevole grandezza. L'ubicazione del pigmento è predominantemente endocellulare; esso manca nei corpuscoli del Malpighi.

In strisci dell'organo colorati con Giemsa si osservano le stesse forme del parassita riscontrabili in strisci di fegato; mancano o sono rarissime le forme a croce maltese che presto descriveremo.

Midollo osseo e cervello. — Strisci di midollo osseo e cervello di individui fortemente infetti hanno dimostrato una grande rarità degli eritrociti parassitati; specialmente nel midollo osseo sono difficili a rinvenirsi globuli rossi infetti e ciò contrariamente al reperto di DIONISI.

DESCRIZIONE DEL PARASSITA

Osservando in vivo al paraboloide sangue infetto è possibile riconoscere numerosi eritrociti contenenti il parassita; essi appaiono con un alone chiaro, spesso marginale. In colorazione sopravitale il loro riconoscimento è assai facilitato ed è possibile osservare anche più agevolmente forme libere che come diremo sono state da noi interpretate come merozoiti; esse sono dotate di movimento proprio e si spostano per oscillamento delle estremità. Data la loro piccolezza riesce più facile vederle in vivo che non in strisci colorati.

Lo studio di numerosi strisci di sangue colorati con la soluzione di Giemsa, ci ha permesso di raccogliere in gruppi omogenei le diverse forme del parassita che, per la loro molteplicità, rendono difficile, ad un primo esame, l'interpretazione dei diversi stadi di sviluppo in cui esso si trova e quindi la ricostruzione del probabile ciclo di sviluppo.

Innanzitutto diremo che le forme di gran lunga più abbondanti sono quelle endoeritrocitiche; esse possono schematicamente essere riunite in due gruppi di cui il primo nei pipistrelli non in letargo è assai più frequente nel sangue circolante, mentre, il secondo negli stessi animali, è più frequente negli organi: fegato e milza.

PRIMO GRUPPO. — a) forme di μ $1,5 \times 0,5$, poco frequenti, piriformi, con cromatina compatta, spostata al loro polo maggiore (fig. 1) (*) ed in-

(*) I richiami a figura si riferiscono alla tavola.

tensamente colorata; anche il protoplasma assume una colorazione azzurro intensa, specialmente alla periferia, mentre al centro permane più chiaro.

b) forme di μ 1 di diametro, più abbondanti, piccole, ad anello (fig. 2), con un unico granulo di cromatina e protoplasma colorato solo ai margini, ma anche qui meno azzurro che non nelle forme precedenti.

c) forme di circa 2,5 μ di diametro, anulari, con cromatina disposta alla periferia in forma di un arco cromatico continuo o distinto in una catena di due, tre, quattro segmenti o granuli, che permangono tuttavia in rapporto fra loro; protoplasma diffuso regolarmente alla periferia, che è più intensamente colorata, o raccolto in massa più compatta nel polo opposto dove trovasi la cromatina.

d) forme anulari, che possono anche eccezionalmente apparire piri-formi, di circa 2,5 \times 1,8 μ , in cui la cromatina è rotta in due-quattro piccoli granuli disposti alla periferia dell'anello stesso e più o meno equidistanti l'uno dall'altro. Per eccezione e con assai minor frequenza trovano forme simili con tre-cinque granulazioni di cromatina (fig. 3-5).

e) forme di circa μ 2.8-3, subameboidi con protoplasma abbastanza intensamente colorato e cromatina a granuli più grossi che nelle forme precedenti e meno intensamente colorati; all'interno di questi granuli appaiono spesso blocchetti di cromatina più cupi (fig. 6).

f) forme grandi di circa 3 μ ad aspetto ameboideo; protoplasma vacuolizzato ed abbastanza intensamente azzurro; queste forme presentano alla loro periferia generalmente quattro espansioni pseudopodiformi, disposte a raggera o raccolte tutte da un solo lato. Al fondo di queste espansioni si trova di regola un blocco di cromatina, poco intensamente colorabile e per nulla compatto, in cui sono evidenti granulazioni più scure (fig. 7).

g) forme abbastanza rare di circa 5 μ , nelle quali si notano quattro corpi subpiriformi riuniti al centro da una porzione protoplasmatica comune; la cromatina si presenta all'estremità distale di tali corpi ed è più compatta e più intensamente colorata che non nelle forme precedenti.

h) forme costituite da quattro corpi subpiriformi di μ 1.8 \times 0.8 riuniti medialmente per le loro estremità più sottili, ma senza massa di protoplasma comune e con cromatina compatta e meno espansa che non nelle precedenti. La disposizione di questi quattro corpi è spesso a forma di una tipica croce maltese, ma frequentemente essi stanno anche disposti come i raggi di un ventaglio (fig. 9).

i) forme a fuso, lunghe μ 2 e larghe μ 0.3 circa. Hanno protoplasma intensamente azzurro e cromatina costituente un blocco spesso, centrale, a volte raccolto ad una estremità e molto colorato (fig. 10).

Le ultime forme descritte si rinvencono nei globuli rossi, quasi sempre in numero di quattro, otto e sono abbastanza frequenti. Malgrado l'abbondante materiale da noi visto, non abbiamo mai constatato, e ciò non era stato possibile nemmeno ad YAKIMOFF ed al., eritrociti contenenti solo due o tre di queste forme: ciò lascia pensare che queste forme che rappresentano l'ultimo stadio del ciclo schizogonico quale noi lo interpretiamo, passino nel plasma per rottura dell'eritrocita e non per perforazione della sua membrana cellulare. Ciò contrasterebbe con quanto asse-

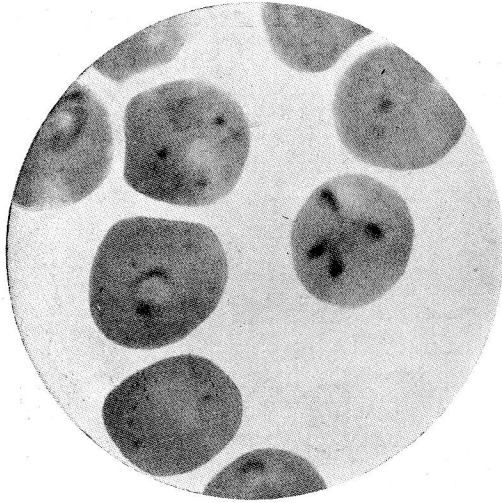


FIG. 4. — Una forma anulare ed una in divisione di *Achromaticus vesperuginis*

riscono NUTTALL e STRICKLAND per *Nuttallia equi* i cui merozoiti uscirebbero dall'eritrocita « without injuring the red blood cell ».

Le forme precedentemente descritte sono quelle che noi interpretiamo come appartenenti al ciclo di moltiplicazione del parassita, ciclo che è rappresentato dallo schema di fig. 5 e la cui successione di stadi corrisponde a quella con cui COLES ha elencato le forme da lui viste.

Naturalmente capita di trovare alcune forme che si staccano un poco da questo che è lo schema tipico; tuttavia esse possono essere facilmente riportate ad una od altra di quelle da noi sopra descritte. Così pure la contemporanea presenza nello stesso eritrocita di più parassiti in diversi stadi di sviluppo, spesso confonde ad un primo esame, pur riuscendone poi agevole il riconoscimento.

In questo ciclo, infatti, noi interpretiamo come stadi merozoitici le piccole forme a fuso o semiluna che si osservano frequenti nel plasma

specialmente quando si esamina il sangue in colorazione sopravvitala. Secondo noi tali forme, subito dopo essere penetrate nell'eritrocita si modificherebbero in piccoli parassiti anulari. Il nucleo di questi, che a poco a poco aumentano in superficie, si distende a formare un arco ad un polo nell'anello, arco che poi si spezzetta in due-quattro granuli di cromatina.

Lo stadio di forma in divisione con quattro granuli di cromatina precede immediatamente la formazione per gemmazione dei quattro merozoiti, tanto frequentemente osservabili nel sangue di animali non in le-

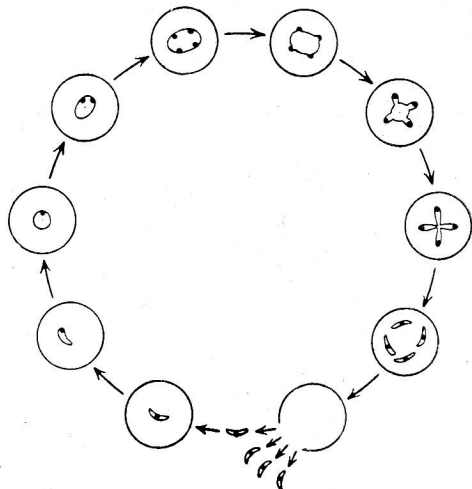


FIG. 5. — Schema del ciclo di moltiplicazione di *Achromaticus vesperuginis* nel sangue.

targo; i quattro merozoiti poi, dopo essere rimasti per un certo tempo riuniti ad una porzione protoplasmatica comune, che viene a poco a poco riassorbita, finiscono per separarsi, perdendo la disposizione a croce maltese o a ventaglio che avevano; per rottura dell'eritrocita passano poi nel plasma per ricominciare il ciclo in nuovi globuli rossi.

Nell'interpretazione di questo ciclo noi discostiamo parecchio da quanto avevano ritenuto nel 1908 YAKIMOFF, STOLNIKOFF e KOHL-YAKIMOFF. Questi AA. infatti, interpretarono le piccole forme affusate non come fossero dei merozoiti, ma « probablement des sporozoites introduits dans le sang de la chauve-souris par un insect ». Tale interpretazione, anche se avanzata con molte riserve, appare abbastanza poco probativa soprattutto in base a due considerazioni. In primo luogo perchè è evidente che la probabilità di ritrovare sporozoiti in circolo in alto numero, facendo un solo striscio di un animale infetto è estremamente piccola;

secondo : perchè avrebbe dovuto colpire il fatto di trovare come tali AA. raffigurano, proprio quattro di queste forme entro un solo eritrocito, in numero, cioè, che corrisponde proprio a quello con cui detti AA. figurano altre fasi di divisione di quello che essi hanno ritenuto il ciclo gametocitico del parassita.

A queste considerazioni oggi ne va aggiunta un'altra e precisamente quella che può desumersi dal fatto che in quasi tutti gli esemplari infetti si trovano le stesse forme affusate, sia libere che endoglobulari, e che quindi appare oltremodo improbabile che proprio in tutti possano trovarsi sporozoiti.

Data la differente interpretazione delle forme iniziali del ciclo di moltiplicazione proposto dagli AA. predetti e quello tracciato da noi, anche l'interpretazione delle restanti forme varia considerevolmente.

Rimandiamo al lavoro citato chi desiderasse rilevare tali divergenze, ritenendo fuori luogo dilungarci in una minuta descrizione.

Ciò che senza dubbio è assai degno di rilievo è che il ciclo da noi proposto è molto simile a quello visto in *Nuttallia equi*, studiata da NUTTALL, STRICKLAND e da CARPANO.

SECONDO GRUPPO. — Mentre le forme descritte nel primo gruppo sono molto abbondanti nel sangue circolante, le forme di questo secondo gruppo sono state predominantemente osservate in strisci di fegato e di milza. Noi le elencheremo seguendo una successione corrispondente alla grandezza dei parassiti entro i globuli rossi.

a) forme a lunga semiluna con protoplasma intensamente colorato ed un'unica massa di cromatina mediana (fig. 11).

b) forme ad anello del tutto corrispondenti a quelle descritte in d) nel primo gruppo.

c) forme ovoidali, piriformi o a banana, variabili da $\mu 2 \times 1$ a $\mu 4 \times 2$ circa, con cromatina spostata alla periferia a formare un arco compatto; il protoplasma è colorato in azzurro ai margini, mentre al centro permane chiaro. Queste forme richiamano molto quelle descritte in c) nel primo gruppo, ma dopo un confronto attento ci si convince che esse hanno protoplasma più compatto e molto più intensamente colorato (fig. 13).

d) forme occupanti circa $1/4-1/3$ del globulo rosso, di forma varia, con cromatina in via di divisione e disposta ad U con concavità rivolta verso l'interno. Vanno riferite a questo stadio anche quelle forme che già presentano due masse cromatiche distinte e compatte, riunite fra loro da un esilissimo filamento (fig. 14, 15).

e) forme ovalari o piriformi, occupanti circa la metà del globulo rosso, con ai loro margini irregolarmente disposti quattro (eccezionalmente tre o cinque) granuli di cromatina; protoplasma abbastanza intensamente colorato in azzurro alla periferia (fig. 16, 17). Le forme a pera occupano spesso tutto il diametro del globulo rosso richiamando in certi casi quelle forme aberranti cui si dà il nome di « Bandformen » e che si sono trovate abbastanza frequenti anche in *Achromaticus*.

f) rarissimi stadi (fig. 18) in cui entro l'eritrocita si trovano quattro lunghi corpi falciformi con protoplasma intensamente colorato ad anello, con le loro estremità subcontigue e non mai a ventaglio o a croce maltese, quali sono stati descritti per il sangue nel primo gruppo. Dobbiamo anzi aggiungere che negli strisci degli organi non abbiamo mai riscontrato tali stadi, per cui ci sembra di poter asserire che vi è una differenza di comportamento del parassita secondo che si consideri il suo modo di divisione nel sangue o negli organi o tessuti.

Lo stadio presentante i quattro individui disposti ad anello sembra dover derivare dalle forme grandi a pera od ovoidali aventi alla periferia i quattro granuli di cromatina. Data però la rarità di queste forme non ci è assolutamente possibile precisare in che modo esse si originino.

FORME LIBERE

Le forme extraeritrocitiche del parassita sono molto rare a trovarsi in strisci colorati, ma si osservano abbastanza agevolmente in colorazione sopravvitale per la loro estrema mobilità.

Esse sono date soprattutto dalle piccole forme falcate descritte in i) nel primo gruppo.

Dalle nostre osservazioni sembra che questi merozoiti, dopo la rottura del globulo rosso in cui erano contenuti, penetrino negli eritrociti maturi (a cui si erano accollati con la parte concava) dapprima con il nucleo e poi con il protoplasma; questo comportamento darebbe così ragione delle piccole forme a pera endocellulari tanto frequentemente osservabili, forme che precedono lo stadio ad anello descritto nel primo gruppo.

Oltre a queste piccole forme falcate che, come abbiamo detto, sono sicuramente dei merozoiti, devonsi aggiungere rare forme, pure falcate, ma di dimensioni maggiori delle precedenti (μ 3.5) riscontrate in strisci di fegato (fig. 24).

In uno striscio di sangue è stata pure trovata la forma rappresen-

tata a fig. 30 μ 2.6×1.5 , subovalare, con protoplasma compatto, intensamente colorato in azzurro e con due ben evidenti granuli di cromatina egualmente colorati.

Malgrado l'unico reperto di questo stadio noi siamo propensi ad in-



FIG. 6. — *Ischnopsyllus elongatus* ectoparassita di *Nyctalus noctula*.

terpretarlo come un gametocita e a ritenere che la presenza di forme simili in numero maggiore possa essere legata a determinate condizioni dell'ospite.

LA REAZIONE NUCLEARE DI FEULGEN.

Su strisci di sangue e di milza di un individuo molto infetto e non in letargo è stata eseguita la microreazione nucleare di Feulgen. Essa è risultata positiva per vari stadi endoeritrocitici.

Infatti, per quanto con difficoltà, riesce possibile ritrovare forme a croce maltese in cui la microreazione mette in evidenza i quattro piccoli granuli nucleari corrispondenti ai quattro merozoiti indivisi, granuli che appaiono molto più piccoli della massa di cromatina che si osserva in preparati corrispondenti colorati con la soluzione di Giemsa.

I merozoiti rimangono Feulgen-positivi anche dopo essere usciti dagli eritrociti ed essere penetrati isolatamente in nuovi globuli rossi. La presenza di un'unica granulazione Feulgen-positiva negli eritrociti potrebbe corrispondere sia ad un merozoite appena entrato sia ad una forma che inizia la divisione (piccolo anello con un solo granulo di cromatina) e potrebbe anche essere confusa con un residuo cromatinico di un corpo di Jolly. È possibile però riconoscere le singole forme e stabilirne le differenze. Prima di tutto le granulazioni dei corpi di Jolly risultano sempre

molto più voluminose e più decisamente positive, quindi a colorazione più intensa, delle granulazioni nucleari del parassita; in secondo luogo fra un merozoite ed una piccola forma anulare si può notare differenza sia nell'alone contornante il granulo di cromatina sia nell'intensità di colorazione del granulo stesso molto minore nelle forme anulari.

Forme in divisione maggiori con due-quattro granuli sono state pure trovate positive alla reazione di Feulgen.

Non siamo mai riusciti invece a trovare in strisci di organi granulazioni Feulgen-positive attribuibili al parassita. Anche in caso di infezione intensa le forme che noi abbiamo descritto per la milza non sono risultate positive alla microrreazione.

Questo fatto depone in favore di una profonda differenza fra le forme del circolo e quelle degli organi.

Data la piccolezza delle granulazioni Feulgen-positive del parassita riscontrate nel sangue circolante non ci è stato possibile rilevarne la minuta struttura come invece ha potuto fare il REY per *Babesia bigemina*.

TENTATIVI DI INFEZIONE SPERIMENTALE.

Come abbiamo detto le prove sono state condotte con *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis* e *Aedes aegypti*. Tutte tre le specie succhiano il sangue delle nottole, sia pure con differente voracità; abbiamo potuto osservare, infatti, che i *Culex* si lanciano subito sugli animali che vengono introdotti nelle gabbiette, mentre gli *Anopheles*, anche se tenuti al buio, stentano parecchio ad attaccarsi. Forse è per questo che DIONISI ha ritenuto che gli *Anopheles* non si cibino sulle nottole, come chiaramente egli dice nel suo lavoro.

L'esame di stomaci di *Culex* e di *Anopheles*, da noi fatto dopo due, quattro, sei giorni dal pasto, non mostrò nulla di particolare. Altrettanto dobbiamo dire per le *Aedes*, di cui però abbiamo esaminato solo due esemplari.

Anche gli strisci di intestini e di ghiandole salivari colorati con la soluzione di Giemsa non hanno dato risultati degni di rilievo. Solo per esemplari ancor parzialmente ripieni di sangue si sono visti su detti strisci eritrociti parassitati con forme indistintamente alterate.

Abbiamo rivolto perciò la nostra attenzione sugli ectoparassiti dei pipistrelli che ne possedevano, e, notata l'assenza assoluta di pupipari, abbiamo raccolto sugli ultimi individui rimasti in vita numerosissime *Ischnopsyllus elongatus*. Queste pulci che, come succede per la maggior parte degli ectoparassiti, abbandonano l'ospite quando questo muore, si

erano raccolte in grandissimo numero sull'ultimo pipistrello rimasto in vita.

Tale esemplare, che all'esame del sangue non era risultato infetto al tempo della sua cattura, presentava al contrario un notevole grado di infezione poco prima di morire. In rapporto a questi reperti, al fatto già accennato, che su questo esemplare si erano raccolte quasi tutte le pulci degli altri pipistrelli e soprattutto in assenza di altri ectoparassiti, noi fummo indotti a pensare che vi fossero buone ragioni per ritenere che le pulci agissero da agenti vettori, non escludendo tuttavia la possibilità che all'epoca della cattura il parassita non risultasse in circolo, ma fosse annidato negli organi interni o l'infezione fosse appena avvenuta.

Su varii esemplari di queste pulci fu fatta la dissezione per l'esame dell'intestino e delle ghiandole salivari a fresco; questo esame però non mostrò nulla di particolare; invece in strisci di intestini isolati e colorati, dopo fissazione con alcool metilico, con la soluzione di Giemsa furono trovate abbastanza frequenti le forme rappresentate dalle figg. 26-29.

Esse possono essere raccolte nettamente in due gruppi: il primo includente forme quasi rotondeggianti di circa 4μ di diametro, con due blocchi di cromatina: uno grosso di circa 1μ di diametro, l'altro più piccolo e più compatto; il protoplasma si tinge in viola pallido e presenta sparsi piccoli granuli di cromatina; nel secondo gruppo si hanno invece forme elissoidali o subpiriformi di circa 3μ di lunghezza per 1 di larghezza, pur essi con due blocchi di cromatina di cui il più grosso è sempre raccolto ad uno dei poli; il loro protoplasma si tinge come nelle forme precedenti, ma non presenta mai granuli più piccoli di cromatina.

In quanto all'interpretazione di queste forme non vogliamo nè possiamo pronunciarci perchè sfortunatamente non abbiamo potuto proseguire le nostre ricerche, ma certo dobbiamo far notare quanto sia rimarchevole il fatto che NEUMANN abbia trovato una forma del tutto simile (tav. I fig. 5, l.c.) nell'intestino di *Pteropus vespertilionis*, forma che egli interpreta come stadio di passaggio tra le forme libere del sangue del pipistrello infetto da *Achromaticus* e le forme flagellate trovate nell'ectoparassita.

La grande somiglianza fra il reperto di NEUMANN e i nostri potrebbe lasciar pensare che *Achromaticus*, sia pure in ospiti differenti, si sviluppi in maniera uguale.

CONSIDERAZIONI GENERALI.

Da quanto siamo venuti esponendo nel corso di questo lavoro risulta come l'emoparassita dei pipistrelli: *Achromaticus vesperuginis* si comporti diversamente secondo che lo si consideri nel sangue circolante di individui non in letargo o negli organi interni.

Mentre nessun dubbio può sussistere per quanto riguarda il suo ciclo di moltiplicazione nel sangue, dove i diversi stadi sono tutti reperibili, non altrettanto può dirsi per le forme che si osservano negli organi interni.

Sono interpretabili queste ultime come appartenenti ad un non ancor chiarito ciclo gametocitico? Certo il loro aspetto molto diversifica dalle forme appartenenti al primo ciclo ed anche l'opposto comportamento fra queste e quelle forme di fronte alla microreazione di Feulgen offre ragione per ben nettamente separarle.

Ma riesce difficile pensare che il ciclo gametocitico avvenga negli organi e non in circolo a meno di non voler supporre che i gametociti passino poi in circolo in determinate condizioni dell'ospite, condizioni che potrebbero essere legate a determinati fattori ambientali o fisiologici e il cui intervento è necessario ammettere per dar ragione della scarsità con cui si rinvenivano forme che potrebbero interpretarsi come gametociti maturi.

Abbiamo già accennato alla corrispondenza di alcune forme trovate da NEUMANN in *Pteropus* e da noi in *Ischnopsyllus* entrambi ectoparassiti raccolti su pipistrelli infetti da *Achromaticus*.

È evidente però che solo ricerche future potranno chiarire quelli che sono i punti tuttora oscuri della questione.

CONSIDERAZIONI SISTEMATICHE.

Passando alla discussione sulla posizione sistematica del genere *Achromaticus* dobbiamo anzitutto premettere che esso va certamente collocato nel sott'ordine dei *Piroplasmidea* e più esattamente nella famiglia *Babesiidae* POCHÉ.

Poichè la sistematica di questa famiglia è tuttora molto controversa specialmente per quanto riguarda i generi in cui è stata smembrata, WENYON ha proposto di riunire i vari generi della famiglia *Babesiidae* nell'unico genere *Babesia*.

Noi affiancandoci a quegli AA. i quali come BRUMPT mantengono le principali divisioni proposte dal DU TOIT nel 1918 riteniamo opportuno considerare ancora valido il genere *Nuttallia* e distinto dal vicino *Babesia*.

Senonchè nel corso del nostro lavoro abbiamo messo in evidenza che il ciclo di moltiplicazione del gen. *Achromaticus* oltre al suo aspetto è del tutto simile a quello di *Nuttallia equi* e di *N. microti* e *N. muris* così come già per queste due ultime specie aveva visto COLES, per cui in assenza di caratteri maggiori il gen. di DIONISI verrebbe a cadere in sinonimia con quello di FRANÇA. Però, poichè il gen. *Nuttallia* è del 1910 e il gen. *Achromaticus* è del 1899, quest'ultimo per diritto di priorità deve essere considerato come valido.

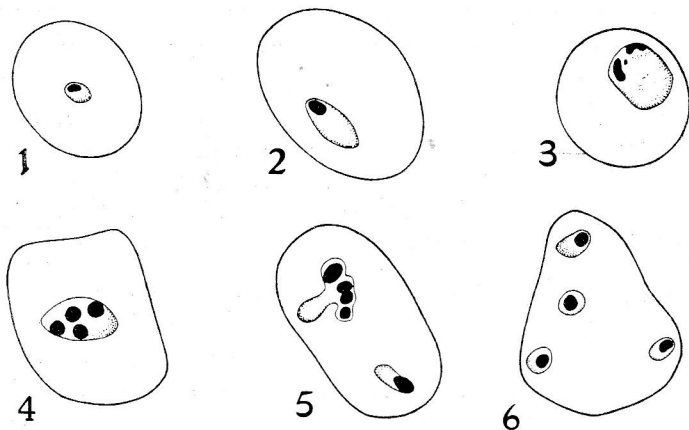


FIG. 7. — *Achromaticus vesperuginis*; disegni schematici riportati dalla tavola pubblicata da DIONISI, corrispondenti progressivamente ai nn. 1, 3, 11, 69, 55 e 54.

Al tempo della descrizione del gen. *Achromaticus* i soli generi conosciuti della famiglia *Babesiidae* erano: *Babesia* STARCOVICI 1893 e *Piroplasma* PATTON 1895. Ora, pur non avendo tracciato DIONISI una descrizione generica particolareggiata del genere che creava, è possibile, in base alla descrizione della forma tipica da lui istituita, vedere che la somiglianza con tali generi non era sfuggita all'autore, dicendo egli specificatamente che nel nuovo parassita si trovano « forme a pera, somiglianti a quelle del piroplasma bigemino » (pag. 398). Ma che la specie riscontrata nei pipistrelli non potesse essere inclusa dal DIONISI nei due generi allora noti, risulta evidente non solo dalle figure con cui viene illustrato il lavoro, ma anche dal testo.

Vien detto infatti (pag. 401) che « Numerose sono le forme parassitarie nelle quali si contengono più masse di cromatina rotonde e intensamente tinte in rosso, che fanno pensare ad un processo di divisione del parassita » e che di tali parassiti « alcuni hanno l'aspetto di un ventaglio

con la cromatina disposta in quattro blocchi... altri di un triangolo, di una croce, ecc. », caratteri questi che non corrispondevano ai due generi conosciuti.

Tutto ciò acquista valore ancora maggiore prestando attenzione a quanto più avanti si può leggere, dove, facendo riferimento a queste forme, vien detto che spesso si trovano associate a forme giovanili che « pare verosimile provengano dalle forme in questione ».

Appare in definitiva che, in base ai caratteri della specie tipica descritta da DIONISI, il genere *Achromaticus* non solo veniva ad essere morfologicamente ben individualizzato rispetto a quelli allora noti della famiglia *Babesiidae*, ma che già da allora veniva prospettato, per quanto con le dovute cautele, parte del suo ciclo di sviluppo.

Ne deriva, quindi, pienamente giustificato, allo stato attuale delle nostre conoscenze, disporre temporaneamente come segue la sistematica del gruppo :

ACHROMATICUS (DIONISI, 1899).

(*Nuttallia* FRANÇA, 1910).

f. typ. *A. vesperuginis* (DIONISI, 1899).

A. equi (LAVERAN, 1901).

A. microti (COLES, 1914).

A. muris (COLES, 1914).

A. macfieii FRANÇA (1918).

ecc.

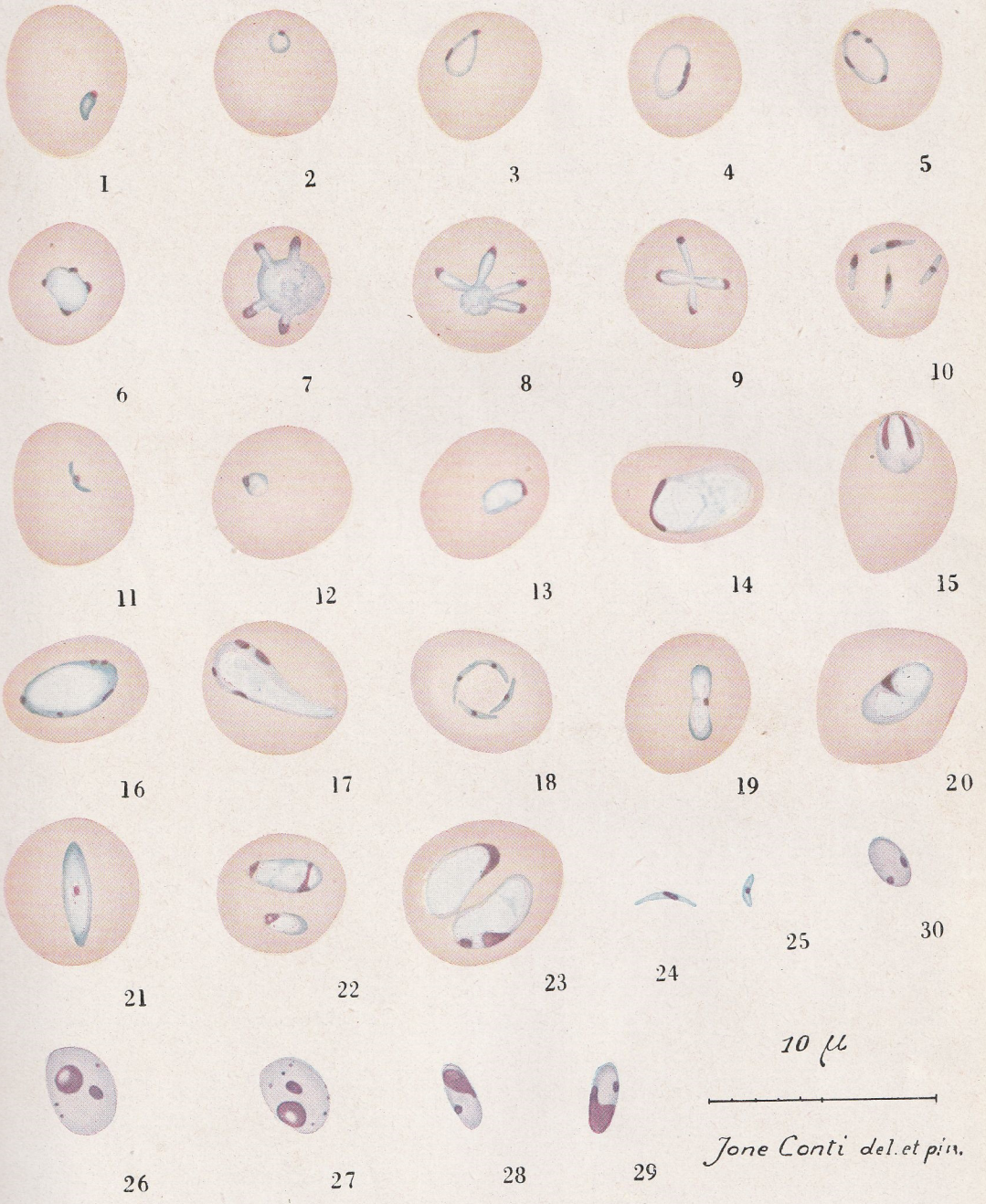
RIASSUNTO.

Gli AA. hanno trovato 6 *Nyctalus noctula* infetti da *Achromaticus vesperuginis*. Il parassita ha potuto così essere studiato su un ricco materiale che ha permesso di precisare chiaramente il ciclo di moltiplicazione del parassita nel sangue, ciclo che si è visto corrispondere a quello noto per *Nuttallia equi*.

Sono state altresì descritte numerose forme riscontrate negli organi interni sulla cui interpretazione gli AA. non si pronunciano definitivamente.

Vengono prese in esame le pulci del genere *Ischnopsyllus* come probabili vettori del parassita.

Infine per criteri di priorità vien posto in sinonimia il genere *Nuttallia* con *Achromaticus*.



G. GHIDINI e M. MORIGGI - *Achromaticus vesperuginis*.

RESUMÉ.

Les AA. ont rencontré 6 *Nyctalus noctula* infectés de *Achromaticus vesperuginis*. En étudiant le parasite sur un riche matériel ils ont pu préciser le cycle de multiplication du parasite dans le sang. Ce cycle correspond à celui déjà connu de *Nuttallia equi*. On donne une description des formes rencontrées dans les organes intérieurs, sur l'interprétation desquelles les AA. ne peuvent pas se prononcer d'une manière définitive. En hommage aux règles de priorité le genre *Nuttallia* est considéré comme synonyme de *Achromaticus*.

SUMMARY.

The A.A. found 6 *Nyctalus noctula* infected with *Achromaticus vesperuginis*. It has thus been possible to study the parasite on abundant material, and to clearly define the multiplication cycle of the parasite in the blood. It has been shown that this cycle corresponds to the already known cycle of *Nuttallia equi*.

Numerous forms met with in the internal organs have also been described, but on the interpretation of these, the A.A. have not yet pronounced themselves definitely.

Ischnopsyllus flees were examined as probable vectors of the parasite. For reasons of priority the genus *Nuttallia* is considered synonymous with *Achromaticus*.

ZUSAMMENFASSUNG.

A.A. haben 6 mit *Achromaticus vesperuginis* infizierten *Nyctalus noctula* vorgefunden. Das Parasit konnte auf reichlichem Material studiert werden, sodass es möglich war die Teilungsformen im Blute deutlich festzustellen. Dieser Cyclus entspricht demjenigen schon bekannt, der *Nuttallia equi*. Man beschreibt zahlreiche Formen in inneren Organen vorgefunden, über deren Auffassung die A.A. keine bestimmte Angaben mitteilen können. Es wird den Floh, gen. *Ischnopsyllus* als möglicher Ueberträger des Parasites betrachtet. Auf Grund der Prioritätsbestimmungen wird die Art *Nuttallia* als Synonym der *Achromaticus* angesehen.

BIBLIOGRAFIA.

- BRUMPT E. (1936). Précis de parasitologie. 5^a ed., Paris, Masson, I: XII+1082 pp.
 CARPANO M. (1913). Piroplasmosi equina, tipi parassitari. *Clinica Veterinaria*,
 34, 254.
 COLES A. (1914). Blood parasites found in Mammals, Birds, and Fishes in England.
Parasitology, 7, 17.
 DIONISI A. (1899). La malaria di alcune specie di pipistrelli. *Ann. di Igiene Sper.*,
 9 377-417.

- FEULGEN R. Die Nuclealfärbung (Mikroskopisch-chemischer Naehweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure). *Abderhal. den Hdb. d. biol. Arbeitsmath.*, Abt. V, Tl. 2, 1055-1073.
- FRANÇA C. (1910). Sur la classification des piroplasmes et description de deux formes de ces parasites. *Arch. R. Inst. Bact. Camara-Pestana*, **3**, 11.
- GONDER R. (1906). *Achromaticus vesperuginis* DIONISI. *Arb. K. Gesundheitsamte*, **24**, 220.
- KISSKALT K. (1905). Blutparasiten bei Fledermausen. *Centralblt.-Bakt.*, **1**, Abt. XL, 213.
- LISON L. (1936). *Histochimie animale*. Paris, Gautier, 320 pp.
- MISSIROLI A. e MOSNA E. (1934). La reazione nucleare nei vari stadi di sviluppo dei parassiti malarici. *Riv. Malar.*, **13**, 553-558.
- NEUMANN R. D. (1909). Ueber Blutparasiten von Vesperugo und deren Weiterentwicklung in den Milben der Fledermause. *Archiv. Protist.*, **18** 1.
- NUTTAL G. e STRICKLAND C. (1912). On the occurrence of two species of parasites in equine « piroplasmosis ». *Parasitology*, **5**, 65.
- REY (1938). On the nuclear structure of *Babesia bigemina* (Smith. Kilb). *Ind. Journ. Vet. Sc. etc.*, **8**, 183-186.
- TOIT (du) P. J. (1918). Zur Systematik des Piroplasmen. *Arch. f. Protist.*, **39**, 84.
- WENYON C. M. (1926). *Protozoölogy*, London Baillière, Tindall e Cox.
- YAKIMOFF W., STOLNIKOFF W. e KOHL-YAKIMOFF N. (1911). Contribution à l'étude de l'*Achromaticus vesperuginis*. *Arch. Prototist.*, **24**, 60.