

# RICERCHE

## sul comportamento del *Nosema bombycis* Näge. nei tessuti larvali del Filugello ereditariamente infetto

### *Note introduttive*

Sull'atrofia del Baco da seta e sul *Nosema bombycis* che ne è la causa specifica, molto è stato scritto da eminenti Autori.

Data l'importanza patologica del parassita e quella economica nel campo agrario e industriale del suo ospite, ben si comprende l'interesse suscitato negli studiosi, dal primo apparire della malattia fino ad oggi; ma è facile rilevare come gli studi fatti vertano soprattutto sul ciclo di sviluppo del parassita, mentre invece notizie meno complete e meno profonde furono date sull'intima natura dei suoi rapporti con i tessuti dell'ospite. Le stesse ricerche di PASTEUR, famoso capolavoro di sperimentazione e di osservazione di impareggiabile finezza per ciò che riguarda il modo d'insorgere, di svilupparsi e di propagarsi della malattia, non potevano estendersi allo studio istopatologico dei tessuti invasi dal *Nosema*, perchè a quell'epoca (1865-70) la tecnica delle inclusioni in paraffina e relative sezioni al microtomo non era ancora nata. Cosicchè nella sua classica opera il PASTEUR ci ha dato belle illustrazioni di alcuni organi veduti a fresco e invasi dai corpuscoli, ma non potè indagare le alterazioni istologiche.

Solo in questi ultimi anni ricerche particolareggiate sono state fatte sulle uova del Baco da seta, per vedere come e quando avvenga l'infezione dell'embrione nell'uovo ereditariamente infetto, e quali siano le lesioni prodotte dal parassita. Su questo argomento ha condotto recentissime ricerche PEZZINI; quelle da me intraprese continuano, sulla larva, le ricerche da lui condotte sull'uovo del *Bombyx mori*. Scopo del mio lavoro è quello di rilevare quali siano gli organi ed i tessuti più colpiti, determinando il carattere delle alterazioni prodotte dal *Nosema* e le forme in cui esso si presenta.

### *Materiale di studio e metodi di indagine*

Le osservazioni sono state da me fatte su larve ereditariamente infette.

Le mie ricerche sono state eseguite su larve di *Bombyx mori* di razza gialla indigena a farfalla mora, che provenivano da un apposito

allevamento ottenuto da uova deposte, col metodo cellulare, da farfalle dimostratesi all'esame microscopico intensamente pebrinose.

Le larve vennero allevate con la massima cura, per poter seguire lo svolgersi della malattia ai segni esterni e vedere inoltre se fosse possibile ottenere qualche bozzolo. Benchè all'inizio dello sviluppo non si potesse rilevare alcun sintomo dell'infezione, ben presto ne apparve il carattere tipico: la disuguaglianza di sviluppo fra le larve, accompagnata ben presto da una forte mortalità. Inoltre il giallume e la flaccidezza cooperarono alla rovina dell'allevamento, in modo che solo in un lotto poche larve raggiunsero la quarta muta, mentre negli altri pochissime arrivarono alla quarta età.

La comparsa in larga misura di altre malattie in concomitanza con la pebrina è uno dei fatti interessanti rilevato in tali allevamenti, poichè dimostra come essa indebolisca il baco a tal punto da favorire al massimo la recettività ad altre malattie epizootiche, a decorso più rapido e violento; cosicchè, anche se essa non è, apparentemente, il solo processo morboso che conduca alla distruzione dell'intero allevamento, in realtà essa ne è la vera causa diretta o indiretta.

Alla schiusura dell'uovo e durante tutto il periodo di sviluppo, furono fissati, giorno per giorno, dei piccoli gruppi di bachi raccolti a caso sui letti, e che furono oggetto delle successive osservazioni.

Tra i fissativi ho scelto il cromo-acetico, secondo la formula modificata dal Grandori (acido cromico in soluzione acquosa 1% parti 9, acido acetico glaciale parti 1), che dà ottimi risultati istologici non solo per la fissazione dell'embrione, ma anche per i tessuti larvali.

Per le inclusioni dei pezzi usavo paraffina pura a +55°C. +58°C. o una miscela di paraffina e cera vergine con punto di fusione a +52°C. +55°C. a seconda della temperatura ambiente; con tale miscela ottenni i risultati migliori nel taglio al microtomo e nella distensione delle sezioni sui vetrini. Le sezioni venivano generalmente eseguite con uno spessore di 3 micron; ho tentato anche spessori di 1-2 micron, ma con risultati meno buoni, soprattutto per la difficoltà della distensione. Ho fatto sezioni trasversali e longitudinali, sagittali e frontali. Fino al quinto giorno di età ho lasciato le larve integre, per poter osservare anche la regione cefalica; in seguito ho asportato quasi sempre la testa, per evitare che essa, non essendo più sezionabile per lo spessore della chitina, rovinasse le sezioni.

Una delle difficoltà più gravi fu quella della differenziazione delle colorazioni; infatti, per poter rilevare le particolarità morfologiche del parassita, ho dovuto decolorare quasi completamente i tessuti; mentre invece, per far risaltare questi, cosa indispensabile per poter osservare bene i caratteri della alterazione nei vari elementi cellulari, ho dovuto,

nella maggior parte dei casi, rinunciare a una buona colorazione di quelli. Un'osservazione non priva di interesse è che, in taluni casi in cui si ha forte accumulo di *Nosema* ed una avanzata disaggregazione del tessuto ospitante, la colorazione, in quel punto, non riesce così bene come nelle parti vicine che ancora non abbiano subito l'attacco del parassita. Credo che appunto all'azione di questo si possa attribuire tale fatto, dovuto probabilmente ad una alterazione chimica del substrato stesso, la quale provoca un comportamento anormale del tessuto verso la sostanza colorante.

Ho provato anzitutto i coloranti all'ematossilina, secondo i metodi di MALLORY e di CARAZZI. L'ematossilina ferrica mordenzata di MALLORY, in unione all'Eosina come colorante plasmatico, mi diede buoni risultati; essa colora fortemente i nuclei in turchino cupo, mentre la parte plasmatica assume un tono violetto abbastanza trasparente anche a forte ingrandimento e su cui i nuclei stessi spiccano benissimo. Inoltre il metodo di MALLORY è vantaggioso per la sua rapidità, perchè, in poco più di mezz'ora, permette la colorazione dei preparati. I corpuscoli del *Nosema* si colorano in turchino cupo e spiccano con i vacuoli bianchi sul fondo violetto. L'ematossilina CARAZZI mi ha dato risultati discreti con la mordenzatura del preparato in soluzione acquosa di allume ferrico all'1%, sovracolorazione con miscela normale e regressione in soluzione acquosa di acido cloridrico al 0,5%. Con questo procedimento i risultati sono stati migliori che con la semplice colorazione progressiva, sia rapida che lenta, e le spore del *Nosema* si sono differenziate abbastanza bene, senza una eccessiva sovracolorazione delle altre parti. Sapendo poi dalle ricerche di STEMPLE, FOÀ, PAILLOT e PEZZINI che risultati ottimi si ottengono con la miscela di GIEMSA, usai anche questa colorazione, che richiede però molte cure e speciali accorgimenti, soprattutto per evitare la precipitazione del colorante. Dopo diversi tentativi ho avuto i migliori risultati con la mordenzatura del preparato in liquido di LUCOL diluito, sovracolorazione lenta con miscela diluita e regressione con soluzione in alcool a 95° di colofonia 5%, metodo questo riportato dal LANGERON nel suo trattato di tecnica microscopica medica; la differenziazione in soluzione di colofonia è empirica e non si sa come avvenga, ma i toni rossi e turchini si rilevano molto bene. Con tale metodo ho ottenuto in alcuni casi una perfetta visione dei tessuti, in modo da poterne subito rilevare le alterazioni, oppure una rilevabilità ottima delle varie forme di sviluppo del parassita e dei particolari di struttura; le spore si comportano diversamente che con la ematossilina di MALLORY e si presentano più tozze e con i vacuoli meno distinti. Altra colorazione da me usata è quella tricromica, secondo il metodo di MALLORY, con cui si ottengono i vari elementi colorati in rosso, turchino

e giallo. Anche le forme del *Nosema* si presentano diversamente colorate, e i vacuoli delle spore spiccano alquanto per il contrasto della colorazione rossa e gialla delle spore stesse sul fondo turchino della massa circostante. Ben riconoscibili sono anche, con tal metodo, le alterazioni prodotte dal parassita nei varî tessuti.

### Ricerche personali

Ho esteso le ricerche su un gran numero di larve di Filugello per poter meglio rilevare il comportamento del *Nosema bombycis* in esse, ed il variare della infezione sia nella intensità che nella localizzazione. Le osservazioni furono da me eseguite su larve di età progressiva fino al quindicesimo giorno; non oltre, per non incorrere in eventuali errori causati dalla concomitanza della pebrina con altre malattie, che, come ho detto, si svilupparono nell'allevamento dopo la seconda muta.

In parecchi degli individui esaminati non riscontrai alcuna traccia del parassita, sebbene l'osservazione microscopica fosse accuratissima ed estesa all'intero organismo; e questo non solo fra larve neonate, ma anche fra quelle fissate in giorni successivi alla nascita; ma mentre la percentuale di neonati sani era del 30% circa, essa diminuiva gradatamente fino ad un minimo rappresentato da qualche raro caso in quelle di 8-10 giorni; la larva più vecchia in cui ho potuto riscontrare la mancanza assoluta di infezione è stata una di 12 giorni, l'unica però trovata in tutto il gruppo esaminato. Ancora una volta viene così dimostrato che la farfalla non trasmette a tutta la prole l'infezione parassitaria, ma solo ad una parte di essa; fatto questo ormai noto e che si spiega con la possibilità di una infezione pebrinosa sopravvenuta nella madre molto tardi, cioè verso la fine dello sviluppo larvale. D'altra parte nulla ci può far ritenere che il parassita possa infestare l'apparato riproduttore a preferenza degli altri; chè, anzi, la Foà ha ottenuto dei preparati di crisalidi infettissime, fissate pochi giorni prima dello sfarfallamento, in cui si possono notare innumerevoli parassiti intorno alle guaine ovariche e solo alcuni rarissimi penetrati attraverso ad esse, mentre quasi tutte le uova sono ancora indenni. Io stessa ho potuto osservare, in larve di prima età, che l'ovario o il testicolo erano ancora perfettamente sani, mentre già l'infezione era alquanto diffusa negli altri organi. Naturalmente però, venendo le larve insieme allevate, il contagio si diffonde ben presto a tutte, cosicchè anche quelle nate sane s'infettano ben presto; in tal caso l'infezione non è ereditaria ma acquisita per la via del canale digerente.

Già al momento della nascita gli individui eredo-pebrinosi presentano un grado di infezione molto vario; talvolta, difatti, la larva, pochissimo colpita o addirittura indenne negli altri organi, presenta, nel lume dell'intestino, fra i residui della sierosa, innumeri parassiti che cominciano ad invadere la parete intestinale; in altri casi l'infezione si estende, benchè limitatamente, anche a qualche altro organo; in altri casi, invece, si estende a tutti gli organi con tale intensità da far ritenere che l'individuo così colpito non possa sopravvivere che per breve tempo, costituendo frattanto un intenso focolaio di infezione. Si possono vedere in questi casi degli ammassi ingenti di parassiti, i quali, in molti punti, si sono quasi completamente sostituiti all'organo invaso, sì che questo può essere riconosciuto non più dalla forma o dalla costituzione, ma esclusivamente dalla ubicazione dei suoi residui. Questo vario grado di infezione delle larve ha certamente la sua origine nel vario numero di parassiti che sono stati trasmessi dalla madre alle singole uova e che, riproducendosi in seguito, hanno più o meno intensamente attaccato non solo le sfere vitelline ma anche l'embrione in momenti diversi dello sviluppo.

Per quanto riguarda la distribuzione del *Nosema* nell'organismo ospite, non si può dire che essa avvenga di preferenza in determinati organi o sistemi; esso ha invece un andamento del tutto irregolare.

I disegni e le microfotografie sono tratti da bachi diversi e di diversa età, in modo da poter dare un'idea chiara del carattere delle alterazioni e della localizzazione del parassita.

Circa le forme del *Nosema bombycis* riscontrate nei miei preparati, devo ricordare che ho notato forme mononucleate riferibili ai planonti di STEMPPELL (23) anche all'interno delle cellule, e ciò contrariamente a quanto tale Autore sostiene, cioè che essi siano esclusivamente intercellulari. Altre forme da me osservate possono identificarsi con alcune riportate dalla Foà (9) e da essa ritenuti meronti in riposo, a 4 o 5 nuclei, oppure meronti in divisione, con nuclei a S; altre ancora, piuttosto grosse e con nuclei rotondi, sono simili agli sporonti della Foà, altre con nuclei allungati sono identificabili con i meronti di STEMPPELL. Grande varietà ho notato nei particolari di struttura delle spore, alcune delle quali sono riferibili a figure dei suddetti Autori, mentre altre non hanno in quelle alcun riscontro; tali forme si possono rilevare dalla fig. 1 (Tav. I).

Passando alle alterazioni morfologiche e fisiologiche indotte dal *Nosema*, e cominciando dal canale digerente, ricorderò che nelle larve infette ho sempre constatato in tale apparato la presenza del microsporidio con intensità e frequenza molto diversa nelle varie parti. Solo raramente ho riscontrato delle lesioni nel proventricolo e nell'intestino

posteriore, mentre invece il ventricolo propriamente detto, o intestino medio, si è sempre dimostrato più intensamente attaccato dal *Nosema*; gli infarti parassitari sono più o meno numerosi ed estesi, ma in alcuni casi si susseguono in ammassi continui e compatti, sì da non lasciare quasi più traccia del tessuto. Ho trovato infatto tanto l'epitelio dell'intestino medio quanto la tonaca muscolare che lo riveste. Dove tuttavia si localizzano gli ammassi più imponenti è nell'epitelio, ed ivi si possono rilevare benissimo anche a ingrandimenti non molto forti.

Le lesioni sono caratteristiche e si possono riferire a due stadi distinti gradatamente susseguentisi: dapprima, in mezzo al tessuto apparentemente normale, si hanno degli accumuli più o meno estesi di parassiti che inducono a poco a poco nella zona ospitante una ipertrofia leggera; poi via via l'ipertrofia diventa sempre più forte, originando successivamente, attraverso una progressiva delaminazione e distruzione del substrato, delle vacuolizzazioni e delle cavità, talvolta enormi, in cui i parassiti si trovano assieme ai residui più o meno abbondanti del citoplasma e dei nuclei cellulari disfatti. L'azione disgregante del parassita è graduale ma continua, ed induce nella cellula un progressivo disfacimento; il plasma, delaminato e vacuolizzato, si riduce, a poco a poco, ad una informe massa irriconoscibile, nelle cui lacune stanno allontanati i parassiti, che ne continuano la distruzione. Anche i nuclei attaccati divengono ipertrofici e gradatamente si disorganizzano; talvolta se ne possono trovare i minimi avanzi in pochi granuli di cromatina, sparsi nel territorio cellulare, ma ben riconoscibili come residui nucleari. La membrana stessa della cellula, che dapprima lentamente si distende sotto la pressione sempre più forte della massa in continuo aumento, giunta al limite massimo di elasticità, non può più opporre resistenza neppur essa e si lacera e si squarcia, lasciando la via aperta per la diffusione in nuovi territori cellulari.

In alcuni casi l'ipertrofia delle cellule dell'epitelio intestinale è così spinta da provocare nella membrana anista delle lesioni notevoli, tanto che la massa cellulare, infarcita di parassiti, si spinge nel lume dell'intestino; spesso la lesione, ormai estesa in tutta la regione dell'epitelio (Tav. I, fig. 2), comincia a manifestarsi anche nella tonaca muscolare (Tav. I, fig. 3).

In sezioni trasversali dell'intestino si vedono le lesioni più o meno numerose ed estese; il processo di diffusione del microrganismo patogeno si può sinteticamente definire una graduale perforazione dell'intestino (Tav. I, fig. 2).

Nella fig. 4 (Tav. I) la lesione è alquanto progredita ed una intera cellula è stata distrutta con tutti i suoi costituenti; si vede la penetrazione del parassita in altre cellule vicine, nelle quali l'azione plasmo-

litica è già evidente. La fig. 2 (Tav. I) rappresenta una porzione di intestino in sezione trasversa, nella quale si ha già la formazione di due ampie cavità, una delle quali si estende fino alla tonaca muscolare, che è già stata perforata; in corrispondenza delle cellule invase manca anche il caratteristico orlo striato.

Anche nella fig. 3 (Tav. I) si notano elementi trasversali e longitudinali della tonaca muscolare esterna colpiti dal parassita, che già vi ha indotto delle leggere vacuolizzazioni.

Quando l'infezione della parete intestinale è molto avanzata, ogni delimitazione dei territori cellulari scompare e solo si hanno accumuli di parassiti alternantisi con cavità più o meno ampie; in mezzo alle masse cellulari in disgregazione vi sono tuttavia elementi di nuova formazione, piccole cellule che i nidi germinali ancora intatti cercano di sostituire a quelle distrutte: ultima difesa dell'organismo contro l'invasore.

In seguito a tali lesioni la funzione della digestione viene alterata: le cellule invase o funzionano irregolarmente o non funzionano affatto ed è ostacolata o addirittura resa impossibile la secrezione del succo gastrico; la membrana anista, lesa anch'essa, non può più esplicare la sua azione regolatrice sulla diffusione del succo gastrico nella massa delle sostanze ingerite, cosicché la digestione chimica non può compiersi normalmente, ed anche l'assorbimento attraverso un epitelio intestinale così profondamente alterato diventa sempre più imperfetto. Ne consegue che facilmente si verificano processi putrefattivi delle sostanze incompletamente digerite o non digerite, ed una deficienza sempre crescente della nutrizione generale dell'organismo attraverso l'emolinfa circolante. Ha pure notevole importanza l'attacco del parassita sulla tonaca esterna dell'intestino medio, dove risiedono i cosiddetti «nidi germinali», poiché questi, una volta lesi, non possono più provvedere alla reintegrazione della parete ventricolare con la produzione periodica degli elementi cellulari; inoltre, anche le contrazioni muscolari, che favoriscono il processo digestivo, sono alterate o soppresse.

Il sistema muscolare della larva ha pure grande recettività alla infezione; tutte le masse muscolari possono essere parassitizzate in vario grado, indipendentemente dalla loro ubicazione ed estensione. Così ho trovato infette le masse cefaliche, i muscoli motori delle mandibole, quelli cutanei addominali, quelli delle zampette vere e spurie, ecc.; in essi, anche a ingrandimenti non molto forti, si possono rilevare le escrescenze del tutto caratteristiche e più o meno sviluppate, date da ammassi di parassiti, che inducono nel tessuto la disgregazione completa. Alterata o scomparsa è la tipica striatura e il sarcolemma variamente esteso a trattenerne la massa disorganizzata, che assume la forma di tumore, talora

assai sviluppato. Anche nei muscoli il parassita si dimostra cromatofago per eccellenza.

Nella fig. 5 (Tav. I) è rappresentata una fibra isolata con una interessante lesione: tra le fibrille divaricate e parzialmente distrutte, l'infarto parassitario assume una forma conica, allungata, nettamente distinta; alterata è la struttura della fibra, i nuclei ipertrofici o ridotti a irregolari ammassi di granuli cromatici minutissimi, o addirittura distrutti, il plasma disorganizzato. Nella microfotografia della fig. 17 (Tav. II) si vede un gruppo di fibre di un muscolo addominale con numerose strie, mentre la fig. 6 (Tav. I) tratta da muscoli cefalici in sezione trasversa, dimostra come il parassita si diffonda molto profondamente all'interno del tessuto invaso esplinandovi forte azione plasmolitica.

Da siffatte profonde lesioni dei muscoli deriva la loro più o meno completa paralisi, e quindi la graduale soppressione delle rispettive funzioni: la presa degli alimenti è rallentata, resa imperfetta e infine impedita dalla paralisi dei muscoli motori dei pezzi boccali; la deambulazione rallentata e infine impedita da paralisi dei muscoli degli arti toracici e delle false zampe addominali; l'ingresso dell'aria nei tronchi tracheali non può effettuarsi normalmente, oltreché per la paralisi dei muscoli che comandano l'apparecchio stigmatico, anche, in alcuni casi, per l'attacco diretto del parassita sulla parete epiteliale delle trachee, cosa che ho potuto osservare anche in bachi non gravissimamente infetti. Nella fig. 7 (Tav. I), si può notare una di tali lesioni, con vacuolizzazione della parete epiteliale e la penetrazione delle spore nel lume della trachea stessa; qui evidentemente l'azione plasmolitica del parassita ha permesso la perforazione della parete epiteliale e dell'intima esilissima, conseguendone l'ostruzione completa del ramo tracheale e l'asfissia della regione dipendente.

Interessantissime alterazioni ho rilevato nel vaso pulsante, che, contrariamente a quanto dice STEMPPELL, può essere colpito anche quando l'infezione è poco diffusa in altri organi. Ho riscontrato lesioni varie e in punti diversi di questo importante organo; molto istruttiva è la fig. 8 della Tav. I, che rappresenta una sezione longitudinale di un tratto del vaso dorsale: la gravità dell'attacco parassitario si rileva benissimo dal confronto tra le due parti della figura stessa; si vedono due gruppi delle cellule che il VERSÖN (26) ritiene secernenti (ghiandole endocardiche) di cui però è ancora incerto il significato; mentre nell'uno esse sono perfettamente normali e regolarmente conformate (le 5 cellule allineate a ridosso della parete nella parte inferiore della figura) nell'altro si presentano fortissimamente ipertrofiche, e danno una chiara idea di quella che è l'azione disgregatrice del parassita: la massa plasmatica, vacuolizzata, espansa, profondamente alterata, preme contro la mem-

brana dilatata; anche i nuclei hanno subito l'attacco e sono quasi distrutti o del tutto scomparsi; tutto il gruppo cellulare forma un grosso ed esteso tumore, che occupa una parte notevole della cavità vascolare; la parete del vaso ha pure subito l'azione del parassita e presenta tumefazioni, vacuolizzazioni e porzioni semidisfatte.

Anche nella fig. 18 della Tav. II è riportata una analoga lesione; il tumore, in cui è visibilissima la cromatofagia del parassita, si estende verso l'interno del vaso causando l'allontanamento della parete opposta, nella cui membrana si nota pure un altro tumore. La fig. 19 della Tav. II riproduce una lesione del vaso dorsale, nella porzione toraco-cefalica dell'aorta; anche qui l'infarto è localizzato nelle cellule della parete, in forma di tumore allungato, ad un estremo del quale si notano i residui del nucleo cellulare.

La parete cardiaca così alterata non può più regolarmente contrarsi; i grandi infarti parassitari che sporgono all'interno dal vaso, oltre ad alterare il funzionamento delle ghiandole, impediscono il libero movimento dell'emolinfa, alterando così sempre più profondamente tutto il ritmo circolatorio. Sicchè l'affievolimento delle pulsazioni nella larva fortemente infetta non è esclusivamente dovuto, come in generale si crede, alle sue condizioni generali, ma anche ad una causa diretta, cioè alle lesioni specifiche dello stesso organo pulsante.

Ho rilevato il carattere delle lesioni prodotte dal *Nosema* anche in alcuni organi ghiandolari, sia di escrezione che di secrezione. Così i vasi renali presentano, in caso di infezione di una certa intensità, lesioni del solito tipo, come si osserva nella fig. 20 (Tav. II) e nella fig. 9 (Tav. I) che rappresentano rispettivamente una sezione longitudinale e trasversale.

Gli infarti parassitari inducono anche qui la formazione di escrescenze e tumori verso l'interno del canale e un visibile rigonfiamento di tutta la porzione lesa; l'attacco è quasi sempre localizzato in corrispondenza delle cellule secrete, le quali manifestano una spicata ipertrofia, sia nel plasma, che subisce una progressiva vacuolizzazione, sia nei nuclei che vengono a poco a poco distrutti. Alcune volte i tumori si estendono ad interi territori cellulari, e per lunghi tratti del tubulo comprendono parecchie cellule, le quali, ipertrofizzandosi talora enormemente, sporgono nel lume del canale fino a raggiungere la parete opposta, ostruendo così completamente il lume del tubo (fig. 20, Tav. II).

Ne deriva l'impossibilità della eliminazione dei materiali di rifiuto, con gravissime conseguenze di intossicazione generale dell'organismo.

Anche le ghiandole sericogene possono presentare, in varie regioni, lesioni più o meno notevoli, la cui importanza è duplice anche rispetto al loro prodotto specifico, e cioè la secrezione ne è diminuita e la parte

già secreta è direttamente alterata dal parassita. Ciò si può rilevare, anche ad occhio nudo, sul seritterio estratto che presenta, oltre al raggrinzimento, anche la formazione di macchie opache sulla sostanza serica, causate dagli accumuli di parassiti. Le lesioni sono anche qui del tipo già descritto, cioè tumori, più o meno estesi, dovuti alla ipertrofia della zona colpita ed alla plasmolisi e cromatolisi e conseguente vacuolizzazione del substrato e ammassamento di parassiti sempre più forte. La fig. 21 (Tav. II) rappresenta una porzione del canale secerente fibroina in cui è evidente una zona ipertrofizzata della parete, con scomparsa di ogni delimitazione dei territori cellulari. Nella zona intermedia della figura la parete è ancora apparentemente normale e con le cellule ben distinte nelle quali si vedono alcuni meronti. Nella fig. 22 (Tav. II) si vede una porzione della parete del serbatoio con tumore caratteristico e forme varie di sviluppo.

Interessanti lesioni ho pure osservato nelle ghiandole esuviali, fatto questo che spiega il fenomeno della difficoltà di muta, che si verifica molto spesso in larve pebrinose. Appunto una di tali ghiandole è riportata nella fig. 12 (Tav. I); in essa l'infezione è abbastanza grave, la lesione non differisce da quelle finora descritte, l'ipertrofia e la plasmolisi della grande cellula ghiandolare sono molto avanzate.

La secrezione del liquido esuviale è quindi incompleta o alterata, cosicchè la muta avviene con difficoltà o è addirittura impossibile, in modo che, come ho riscontrato io stessa, vi sono bachi che non riescono ad abbandonare la vecchia spoglia, anzi, restano strettamente chiusi in essa, specialmente con la metà posteriore del corpo, e muoiono.

Anche in casi di infezione non del tutto grave ho trovato spesso colpite le ghiandole ipostigmatiche. Nella fig. 10 (Tav. I) si rileva la tipica plasmolisi non ancora molto avanzata e la cromatofagia del parassita, che ha già indotto la disgregazione nella massa nucleare.

Le ghiandole genitali si mostrano meno delle altre recettive al parassita, almeno per quanto ho potuto notare nel primo periodo di sviluppo larvale; in alcuni casi di infezione già alquanto grave, nelle gonadi non si rilevava alcuna traccia di lesioni. In generale poi queste non appaiono del solito tipo, ma l'ipertrofia del tessuto non si verifica e la plasmolisi del substrato è limitata ad una piccola zona intorno al punto di infezione. Ciò si vede bene nella fig. 23 (Tav. II), rappresentante una porzione di testicolo con spore in diversi punti, nei follicoli, nelle tonache, nella regione dell'ilo. Inoltre, per quanto io ho constatato, gli ammassi più forti di parassiti si hanno verso il centro dei follicoli, e molto più raramente alla periferia di essi.

Il tessuto adiposo pure non va esente dagli attacchi del *Nosema*, anzi, in alcuni casi, si trova fortemente colpito e distrutto. Una por-

zione di tale tessuto infetto è riportata nella fig. 11 (Tav. I); non si vede qui ipertrofia apparente della massa, ma si rileva invece benissimo l'azione disgregatrice del parassita sulla costituzione cellulare; il reticolo plasmatico, in cui normalmente si trovano le goccioline di materie grasse, si mostra completamente disfatto in corrispondenza dei punti invasi e contiene, irregolarmente sparse, delle granulazioni cromatiche, residui dei nuclei parassitizzati.

Non solo negli organi interni, ma anche nel tessuto ipodermico, il parassita trova l'ambiente adatto al suo sviluppo, e le lesioni qui prodotte presentano i caratteri già descritti. I due stadi principali delle lesioni si rilevano nelle fig. 13 e 14 (Tav. I); la prima è data da una porzione della cute in corrispondenza di una ghiandola tricogena, in cui l'alterazione di alcune cellule è già notevole a causa degli infarti parassitari che vi hanno causato forte ipertrofia unitamente alla disgregazione delle masse nucleari; in alcuni punti si nota già una leggera vacuolizzazione del plasma. Questa invece è notevole appunto nella fig. 14, in cui la lesione, alquanto grave, è caratterizzata dalla grossa cavità in cui stanno le spore, mentre alcuni meronti proseguono l'infezione in una zona adiacente.

Della massima importanza è la suscettività di infezione del sistema nervoso. In tutti i bachi neonati infetti, esso si presentava sempre già più o meno colpito, ed in alcuni casi le lesioni superavano in intensità quelle di tutti gli altri organi.

Già STEMPPELL e PEZZINI hanno rilevato l'attacco del parassita ai gangli nervosi e quest'ultimo Autore ha giustamente attribuito a questo fatto grande importanza. Difatti, il sistema nervoso è il regolatore di tutto l'organismo e da esso provengono gli stimoli attivatori di ogni funzione. Cosicchè, qualora una lesione o una alterazione si verifichi in un centro nervoso, tutti gli organi che ne dipendono subiscono disturbi funzionali più o meno profondi.

Tutti i gangli e tutti i nervi possono essere infetti, e gravi e diffuse lesioni si possono già trovare in bachi neonati. Le parti più colpite dal *Nosema* sono le zone corticali dei gangli, come si rileva dalle figure; ma anche la zona centrale dei gangli può essere invasa dal parassita.

La fig. 15 (Tav. I) e 24 (Tav. II) rappresentano rispettivamente parte di una sezione e una sezione intera di ganglio addominale con numerose lesioni alla periferia; in cavità non nettamente delimitate e comprendenti più territori cellulari stanno i parassiti a gruppi. Altre interessantissime lesioni sono quelle riportate nella fig. 16 (Tav. I) e nella fig. 25 (Tav. II): la prima di queste rappresenta il ganglio frontale, la cui parte corticale è stata completamente distrutta in modo che il neurilemma non ne trattiene che il liquame residuo ed i pochi granuli

di cromatina dei nuclei disfatti; l'attacco si estende anche alla zona midollare, ai cui margini si inizia già una notevole plasmolisi, ed al tratto di nervo ricorrente, il quale ultimo è addirittura infarcito di spore.

La formazione di tumori tipici, assai rara nei gangli, si vede invece assai bene nei nervi; e in tali tumori si possono notare anche forme giovanili del parassita a uno e a due nuclei (meronti e sporonti).

Quando vi è una forte infezione nell'intestino medio, i gangli addominali possono essere parassitizzati senza che l'attacco arrivi a quelli cefalici; molto più spesso però anche questi sono colpiti e presentano lesioni fortissime, soprattutto il ganglio frontale (fig. 16, Tav. I) e il ganglio sopraesofageo (fig. 25, Tav. II).

L'importanza delle lesioni ora descritte non consiste soltanto nell'alterazione dell'organo, ma soprattutto nella paralisi graduale degli organi innervati dai singoli centri nervosi. Così le lesioni ai gangli esofagei e al ganglio frontale hanno perniciosa influenza sulla nutrizione, poichè i primi innervano tutto l'apparato boccale ed il secondo presiede ai movimenti di deglutizione.

La disfunzione dunque e la disorganizzazione nei vari apparati non solo può essere dovuta alla presenza diretta del parassita in essi, ma anche dipende, nella maggior parte dei casi, dalla sua localizzazione nel sistema nervoso; quando l'infezione è grave e diffusa, le due influenze si sommano e dalla loro azione concomitante si originano i complessi fenomeni morbosi dell'*atrofia* che conduce l'animale a lenta morte.

### Conclusioni

Per quanto riguarda il ciclo di sviluppo del *Nosema bombycis*, ho riscontrato varie forme in organi diversi, fatto questo che mi fa ritenere che la germinazione delle spore possa avvenire in tutti i tessuti del Baco da seta.

La germinazione delle spore è localizzata secondo STEMPPELL nella parte anteriore dell'intestino per opera dei suoi secreti; OHMORI è riuscito a dimostrarla possibile anche nell'intestino posteriore e in quello medio; in quest'ultimo essa è pure ammessa da KUDO ed è appunto nell'intestino medio che io ho sempre riscontrato le lesioni più gravi e numerose di tutto l'apparato digerente. Secondo HUTCHINSON, poi, la possibilità di germinazione non è confinata a tale apparato, ma si estende anche in altri punti per effetto dei fermenti o enzimi dipendenti da processi metabolici diversi dalla digestione, e con l'opinione di tale Autore coinciderebbe la mia; d'altra parte la Foà ammette la germinazione delle pseudospore e PEZZINI quella delle spore stesse nell'uovo.

Altro fatto rilevato, in alcuni casi, è la presenza di forme uninucleate identificabili con i planonti di STEMPPELL, all'interno delle cellule, contrariamente a quanto tale Autore sostiene. Delle numerose forme osservate, parecchie sono riferibili ad alcune raffigurate da STEMPPELL e dalla Foà, mentre altre non trovano in queste alcun riscontro. Probabilmente, secondo me, si tratta di effimeri stadi di sviluppo della spora che non sempre possono essere rilevati.

L'azione parassitaria sulla cellula invasa si esplica press'a poco sempre allo stesso modo, e il decorso del processo istopatologico si esplica in due fasi: la prima consiste nella ipertrofia più o meno accentuata delle cellule e nella formazione di escrescenze e tumori nei vari organi, dati dagli infarti parassitari; da questo si passa, attraverso una graduale e continua plasmolisi e cromatolisi, alla seconda fase, cioè al disfacimento ed alla distruzione completa di tutti gli elementi cellulari, con la formazione, nei vari organi, di più o meno grandi cavità. Nei gangli nervosi e nelle gonadi l'ipertrofia delle cellule e la formazione di tumori si notano meno frequentemente.

Con le mie osservazioni non si accorda l'antica interpretazione del VERNON che il Filugello soccombe « alla meccanica distruzione che i corpuscoli vanno compiendo fra i suoi visceri ». Evidentemente si tratta invece di ben complesse azioni biochimiche, fondamentalmente derivanti dalle secrezioni o dalle dielezioni del parassita nel plasma cellulare da esso inquinato. La vacuolizzazione dei tessuti parassitizzati, la plasmolisi e la cromatolisi che il parassita provoca ne sono prove evidenti. Il processo non differisce, del resto, da tanti fenomeni istopatologici dovuti alla presenza di microrganismi parassiti nei più svariati tessuti di Vertebrati.

## BIBLIOGRAFIA

1. - ACQUA C. - *Le mosche e la trasmissione della pebrina* - Boll. R. Staz. Sperim. Gels. Bach., A. V<sup>o</sup>, n. 4 - Ascoli Piceno, 1926.
2. - ACQUA C. - *Nuovi metodi di colorazione delle spore di Nosema bombycis* - Ibidem., A. V<sup>o</sup>, n. 6 - Ascoli Piceno, 1926.
3. - BASSI C. - *La pebrina, malattia del Baco da seta* - Milano, 1868.
4. - BOLLE G. - *Il Nosema bombycis Näge., il parassita della pebrina* - Boll. R. Staz. Sperim. Gels. Bach. - A. II<sup>o</sup>, n. 1 - Ascoli Piceno, 1923.
5. - CORNALIA E. - *Monografia del Bombice del gelso*. Milano, 1856.
6. - DE FILIPPI F. - *Alcune osservazioni anatomiche e fisiologiche sugli insetti in genere ed in particolare sul Bombice del gelso* - Ann. R. Acc. d'Agricoltura di Torino - V<sup>o</sup> - Torino, 1851.
7. - DE QUATREFACES A. - *Essai sur l'histoire de la sériculture et sur la maladie actuelle des vers à soie* - Revue des Deux mondes - Paris, 1860.
8. - FOÀ A. - *Come si presenta il Nosema bombycis nelle uova del Baco da seta dalla deposizione alla schiusura* - Informazioni seriche, n. 14, 1923.
9. - FOÀ A. - *Modificazioni al ciclo morfologico e biologico del Nosema bombycis Näge.* - Portici, 1924.
10. - GRANDORI R. - *Il filugello e le industrie bacologiche* - Ed. Trevisini; Milano 1924.
11. - HUTCHINSON C. M. W. - *Pébrine in India* - Memoires of the Departement of Agriculture in India - Pusa, 1920.
12. - KUDO R. - *Eine neue Methode die Sporen Nosema bombycis Näge., mit ihren ausgeschöpften Polfäden dauerhaft zu präparieren und deren Länge genauer zu bestimmen* - Zoologischer Anzeiger Bd. XLI, n. 8, 1913.
13. - KUDO R. - *On the structure and life - History of Nosema bombycis* - Bull. of the Imp. Sericul. Experim. Station Japan - Tokyo, 1916.
14. - OHMORI J. - *Zur Kenntnis des Pebrine-Erregers* - Arb. A. D. Kais. Gesundheitsamte - Berlin, 1912.
15. - PAILLOT A. - *Sur le cycle évolutif du Nosema bombycis parasite de la pébrine du ver-à-soie* - Comptes Rendus Société de Biologie. T. XCIX, pag. 81, 1928.
16. - PAILLOT A. - *Traité des maladies du ver-à-soie* - Paris, 1930.
17. - PASTEUR L. - *Etudes sur la maladie des vers-à-soie* - Paris, 1870.
18. - PEZZINI I. - *Ricerche sul comportamento del Nosema bombycis Näge. nell'uovo del Bombyx mori L. durante lo sviluppo embrionale* - Boll. Labor. Zool. Agr. e Bachicolt., Milano, 1932.
19. - PICORINI e TEODORO - *Le mosche e la trasmissione della pebrina* - Ann. R. Staz. Bacol. Sperim. - Padova, vol. XLV, 1927.
20. - PRINGLE YAMESON A. - *Report on the Diseases of Silkworm in India* - Superintendent Government Printing - Calcutta, 1922.

21. - SCHREIBER B. - *I metodi di ricerca del Nosema bombycis nelle uova del Baco da seta in diapausa* - L'Industria bacologica, n. 8 - Milano, agosto 1929.
22. - SCHREIBER B. - *Osservazioni sulla membrana di Amici nel tumore muscolare da pebrina del baco da seta* - Napoli, 1933.
23. - STEMPPEL W. - *Ueber Nosema bombycis Nägeli* - Archiv für Protistenkunde, XVI Bd. - Jena, 1909.
24. - TEODORO G. - *Mosche e pebrina* - Ann. R. Staz. Bacol. Sperim. di Padova, vol. XLV, 1927.
25. - VERSON E. - *Per la storia dei corpuscoli oscillanti* - Atti R. Ist. Veneto di Scienze lettere ed Arti, 1913.
26. - VERSON E. - *Il filugello e l'arte di governarlo* - Milano, Soc. Editr. Libraria, 1917.
27. - VLACOVICH G. P. - *Sulla moltiplicazione dei corpuscoli parassiti nel Bombice del gelso, per scissione trasversa* - Boll. mens. Bachicoltura, 1893.

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

Tutte le figure sono state disegnate con la camera lucida di Abbe, e le microfotografie eseguite a luce artificiale e con obiettivo ad immersione.

### TAVOLA I.

Fig. 1 - Porzione corticale di ganglio nervoso addominale in sezione longitudinale con numerose forme di sviluppo del parassita. Larva di 15 giorni. Color. Giemsa (x 1800).

Fig. 2 - Frammento di intestino medio in sezione trasversale. Si osserva la perforazione della parete intestinale. Larva di 4 giorni. Color. Giemsa (x 600).

Fig. 3 - Tonaca muscolare esterna dell'intestino medio in sezione longitudinale. Si noti la vacuolizzazione del substrato intorno ai parassiti. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1200).

Fig. 4 - Frammento di sezione longitudinale di epitelio dell'intestino medio; distribuzione completa di una cellula e vario grado di invasione nelle altre. Larva neonata. Color. Carazzi-eosina (x 1200).

Fig. 5 - Fibra muscolare striata, in sezione longitudinale, fortemente disgregata dal parassita. Si noti l'azione sui nuclei e la forma dell'infarto. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 6 - Masse muscolari cefaliche in sezione trasversale invase da spore e meronti penetrati profondamente nel tessuto. Larva di 12 giorni. Color. Giemsa (x 1800).

Fig. 7 - Porzione di trachee invase da spore. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1800).

Fig. 8 - Sezione longitudinale di vaso dorsale. Invasione gravissima nelle ghiandole endocardiche e nella parete cardiaca. Confrontare le ghiandole invase dai parassiti (parte

superiore della figura) con quelle sane (parte inferiore della figura). Larva di 1 giorno. Color. Mallory-eosina (x 1600).

Fig. 9 - Tubulo malpighiano in sezione trasversale. Larva di 10 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 10 - Cellule ipostigmate a nucleo vescicolare con ammassi di spore. Si noti la cromatofagia del parassita. Larva di 4 giorni. Color. Giemsa (x 800).

Fig. 11 - Porzione di corpo adiposo con avanzata distruzione del reticolo plasmatico. Forme giovanili e spore. Larva di 1 giorno. Color. Mallory-eosina (x 1600).

Fig. 12 - Ghiandola esuviale addominale invasa e semidistrutta dal *Nosema*, in sezione longitudinale. Larva di 4 giorni. Color. Giemsa (x 1600).

Fig. 13 - Tessuto ipodermico in sezione longitudinale in corrispondenza di una cellula tricogena; spore e meronti. Notare la forte ipertrofia. Larva di 1 giorno. Color. Carazzi (x 1800).

Fig. 14 - Porzione di tessuto ipodermico in sezione longitudinale con forte vacuolizzazione. Spore e meronti. Larva di 1 giorno. Color. Mallory-eosina (x 2000).

Fig. 15 - Parte corticale di un ganglio nervoso addominale in sezione trasversa con numerose lesioni. Larva di 3 giorni. Color. Giemsa (x 1600).

Fig. 16 - Ganglio frontale e porzione del nero ricorrente in sezione longitudinale con enorme cavità e forti ammassi di spore, che occupano, insieme ai detriti citoplasmatici, la maggior parte del volume del ganglio. Larva neonata. Color. Carazzi (x 1600).

#### TAVOLA II.

Fig. 17 - Masse muscolari toraciche in sezione longitudinale con numerosi infarti di parassiti. Larva neonata. Color. Mallory tricromica (x 1000).

Fig. 18 - Porzione di vaso dorsale con tumori sporgenti dalla parete nel lume del canale. Larva di 1 giorno. Color. Carazzi (x 1000).

Fig. 19 - Come la precedente, con tumore nella parete. Si notino all'estremità della cellula i residui del nucleo. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 20 - Tubo malpighiano con tumori alquanto sviluppati e diffusi in tutta la cavità interna e nelle pareti. In mezzo agli ammassi di parassiti si vedono i residui dei nuclei. Larva neonata. Color. Mallory tricromica (x 1000).

Fig. 21 - Porzione di ghiandola setifera (canale secernente fibroina) in sezione tangenziale. Spore e meronti. Larva neonata. Color. Mallory tricromica (x 1000).

Fig. 22 - Parete del serbatoio del seritterio con tumore caratteristico. Larva di 15 giorni. Color. Giemsa (x 1000).

Fig. 23 - Porzione di testicolo con spore nei follicoli e nella regione dell'ilo. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 24 - Ganglio nervoso addominale in sezione trasversale con numerose lesioni. Larva di 3 giorni. Color. Giemsa (x 1000).

Fig. 25 - Porzione di ganglio nervoso sopraesofageo in sezione longitudinale con lesione gravissima estesa in tutta la parte corticale e iniziata anche nella parte midollare, alla cui periferia si vedono forme giovanili del parassita. Larva neonata. Color. Carazzi (x 1000).

Fig. 26 - Sezione longitudinale di una porzione di larva neonata con evidenti lesioni in vari organi. Color. Mallory tricromica (x 500).

R. e L. GRANDORI, L. PROVASOLI, D. GIORGI

## Studi sperimentali intorno agli effetti di sostanze varie sulla crescita del Baco da seta

### PARTE I

#### Piano generale degli esperimenti del 1935

Le esperienze da noi compiute nel 1935 sul *Bombyx mori* trassero la loro origine da incerti accenni di alcuni Autori sulla possibilità di una sorta d'immunità naturale verso i microsporidi da parte degli insetti, e in ispecial modo del Bombyte del gelso verso il *Nosema bombycis*.

KUDO nel 1924 (43) riferiva che « pochi osservatori si erano occupati dell'immunità dell'ospite del *Nosema*. PASTEUR (1870), BOLLE (1898), STEMPPELL (1909) ed altri osservano che i bachi delle razze giapponesi dimostrano essere più resistenti di quelle europee all'invasione di *Nosema bombycis*. Gli allevatori pratici giapponesi di bachi da seta pare abbiano la stessa opinione. I risultati da me ottenuti tendono a dimostrare che ciò è vero ».

Il PAILLOT (49) nel 1933, a questo proposito così si esprime: « Il n'a pas encore été signalé jusqu'ici de cas d'immunité contre les Microsporidies. Cependant, PASTEUR, BOLLE, STEMPPELL ont constaté que les races japonnaises de Vers à soie sont plus résistantes à la pébrine que les races européennes; des constatations analogues ont été faites pour les Abeilles au sujet de leur réceptivité vis-a-vis du *Nosema apis*. Mais on peut se demander s'il s'agit là d'immunité proprement dite; la résistance absolue peut être due semplicemente au fait que les barrières naturelles qui, chez tous les êtres vivants, s'opposent aux infections en général, offrent une résistance plus grande au *Nosema* ».

Pur rendendoci conto che la ricerca su questo argomento presentava molti lati difficili e complessi, l'abbiamo affrontata istituendo due serie di esperimenti.

Una prima serie fu condotta al fine di vedere se, infettando contemporaneamente e con la stessa intensità bachi di razze diverse, talune indigene e alcune anche appena importate dal Giappone, si sarebbe verificata una sensibile differenza nel comportamento delle diverse razze di fronte all'infezione.

Una seconda serie di esperienze fu invece condotta al fine di vedere se una razza giapponese di nuova importazione in Italia, infettata sperimentalmente con *Nosema bombycis* ci potesse fornire, per mezzo di reazioni immunitarie, sostanze che, somministrate ai bachi di razze nostrane,