Mix B76/38 14 38

REALE ACCADEMIA D'ITALIA

MEMORIE DELLA CLASSE
DI SCIENZE FISICHE, MATEMATICHE E NATURALI
VOLUME VII.

ESTRATTO N. 13.

R. CIFERRI E P. REDAELLI

Morfologia, biologia e posizione sistematica di *Coccidioides immitis* Stiles e delle sue varietà, con notizie sul granuloma coccidioide

BIBLIOTECA NAZIONALE ROMA

ROMA
REALE ACCADEMIA D'ITALIA
1936-XIV

REALE ACCADEMIA D'ITALIA
MEMORIE DELLA CLASSE
DI SCIENZE FISICHE, MATEMATICHE E NATURALI
VOLUME VII.

ESTRATTO N. 13.

R. CIFERRI E P. REDAELLI

Morfologia, biologia e posizione sistematica di *Coccidioides immitis* Stiles e delle sue varietà, con notizie sul granuloma coccidioide

ROMA
REALE ACCADEMIA D'ITALIA
1936-XIV

Roma, 1936-XIV. — Tipografia del Senato del dott. G. Bardi.

MORFOLOGIA, BIOLOGIA E POSIZIONE SISTEMATICA DI *COCCIDIOIDES IMMITIS* STILES E DELLE SUE VARIETÀ, CON NOTIZIE SUL GRANULOMA COCCIDIOIDE

Memoria di R. CIFERRI e P. REDAELLI (*)

RIASSUNTO. — Studio monografico morfologico e biologico di sedici ceppi di *Coccidioides immitis;* definizione delle affinità e della posizione sistematica del fungo; patogenicità in rapporto alla diagnosi dell'entità morbosa; è lungamente studiato il fenomeno della coniugazione cellulare, osservato per la prima volta.

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO.

Intorno al *Coccidioides immitis* ed alla forma morbosa da esso determinata abbiamo avuto occasione di pubblicare una serie di note preliminari (REDAELLI, 1930; TIMPANO, 1930; CIFERRI, 1930 e 1932; REDAELLI e CIFERRI, 1934-*a*; 1934-*b*; CIFERRI e REDAELLI, 1934-*a*; 1934-*b*; 1934-*c*; 1934-*d*; 1934-*e*; 1934-*f*; 1934-*g*). La presente contribuzione costituisce il riassunto e le conclusioni generali delle ricerche effettuate dal 1929 ad oggi su una serie di 16 ceppi gentilmente inviati, per la maggior parte, dal Dr. FRED D. WEIDMAN del Laboratorio di Ricerche Dermatologiche dell'Università di Pennsylvania, Philadelphia; dal Senatore prof. Sir A. CASTELLANI, Direttore della Clinica delle Malattie Tropicali e Sub-tropicali di Roma, che ci ha fornito il ceppo base; dal prof. G. POLLACCI, Direttore dell'Istituto Botanico e del R. Laboratorio Crittogamico Italiano della R. Università di Pavia; dal dott. MORRIS MOORE del Dipartimento di Micologia, Scuola Henry Schaw dell'Università di Washington, St. Louis, Mo.; dal prof. OTTAVIO DE MAGALHAES della Sezione di Micologia dell'Istituto OSWALDO CRUZ di Rio de Janeiro (Brasile); dalla prof. JOHª. WE-

(*) Presentata nell'Adunanza del 29 maggio 1936-XIV dall'Accademico DANTE DE BLASI.

STERDIJCK, Direttrice del Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn (Olanda); ai quali ci è gradito porgere i nostri più sentiti ringraziamenti.

Lo scopo del nostro studio è stato essenzialmente quello di chiarire i problemi riferentisi alla morfologia ed alle attività biologiche (comprese quelle biochimiche e patogenetiche) del fungo e delle sue varietà, traendone le necessarie conclusioni in rapporto alla posizione sistematica del fungo e alle questioni tassonomiche e nomenclatoriali ad esso inerenti.

Poichè lo studio è stato portato comparativamente non su uno o pochi ceppi isolati da un solo caso o da pochi casi affini da un punto di vista anatomo-clinico, come è stato fatto sino ad ora, ma su una intera serie di ceppi isolati in regioni geograficamente lontane fra di loro, e provenienti da casi clinici a caratteristiche varie, e con ceppi di recente isolamento o lungamente conservati in cultura, ci è stato permesso non solo l'accertamento di fenomeni mai osservati precedentemente, ma anche la coordinazione di fatti apparentemente contraddittori (con i loro riflessi nel campo clinico ed anatomico) e l'applicazione delle nozioni suddette all'inquadramento del fungo tra i miceti.

CENNI STORICI SU COCCIDIOIDES E SUL GRANULOMA COCCIDIOIDE.

Il POSADAS, sin dal 1892, potè studiare un caso argentino diagnosticato come «micosi fungoide con psorospermia» ritenuto come dovuto ad un Protozoo coccidiforme brevemente descritto ed illustrato, mentre, ancora studente, lavorava nel laboratorio di WERNICKE, il quale, nel 1892, aveva pubblicato una breve nota in lingua tedesca sullo stesso caso. Proseguendo i suoi studi sulla malattia, il POSADAS poteva, nel 1894, confermare la sua origine protozoica e la sua trasmissibilità agli animali di laboratorio con produzione di infezione a focolai multipli e generalizzati. Poichè nel 1897 il paziente morì, il POSADAS potè (1900) pubblicare i risultati della necroscopia e degli esami istopatologici del caso, il cui agente era restato anonimo, salvo una denominazione di «Megalosporidio» da parte di POSADAS, e di «Megalocitosporidio» da parte di WERNICKE, entrambi provvisori. Durante il Primo congresso latino-americano di medicina, il CANTÓN propose di denominare il microorganismo *Coccidium de Posadas*, e quindi *Posadasia esferiformis* (dallo spagnolo «esferiforme» per sferiforme, quindi da rettificare in *sphaeriformis*). Il genere di CANTÓN è invalidato, in quanto *nomen nudum* ed in quanto fu pubblicato, a quanto pare, non a stampa, ma in dispense mimeografate.

Nel contempo, ma in maniera del tutto indipendente, la stessa malattia e lo stesso agente specifico erano studiati da ricercatori nordamericani e la storia delle prime ricerche è stata recentemente tracciata

dal RIXFORD (1931). Il primo caso nordamericano di granuloma coccidioide fu presentato a San Francisco dal RIXFORD alla Società medico-chirurgica del Cooper College, e pubblicato nel 1894 (1894-*a*) attribuendolo ad un Protozoo. Un secondo caso fu pure presentato da RIXFORD in quello stesso anno all'Accademia di medicina di California (1894-*b*), e questa presentazione sollevò una breve discussione in cui si parlò della analogia con il caso di POSADAS e WERNICKE d'Argentina. Il materiale nordamericano fu distribuito a vari ricercatori, tra cui a MONTGOMERY che, nel 1900, otteneva una cultura del parassita, ma che scartò senz'altro per ritenerla una banale contaminazione, in quanto i dati morfologici offerti dalla cultura erano del tutto differenti da quelli ottenuti dallo studio dell'agente patogeno nei tessuti animali.

Il primo binomio latino apparì per merito di STILES in un lavoro di RIXFORD e GILCHRIST (1896) i quali, ritenendo che i due casi comunicati da RIXFORD fossero dovuti a due microorganismi differenti, mostrarono al protozoologo STILES il materiale, e su proposta di questo ultimo, battezzarono gli agenti patogeni con il nome di *Coccidioides immitis* e *Coccidioides pyogenes*, ritenendoli sempre di natura protozoica, opinione in quei tempi confermata da MONTGOMERY (1900) e forse da altri.

Pure nel 1900 OPHÜLS e MOFFIT potevano studiare del nuovo materiale da un caso del dottor ASH, isolandone una muffa in cui dichiararono di aver potuto osservare dei « corpi protozoarii » del tipo di quelli osservati nei tessuti animali, osservazione che l'OPHÜLS stesso (1905-*a*) smentirà esplicitamente. In quell'anno (1905-*b*) apparve il primo studio abbastanza completo sulle caratteristiche morfologiche e biologiche *in vivo* ed *in vitro* per opera di OPHÜLS, il quale, per l'impossibilità di assegnare al microorganismo una posizione sistematica generica, e malgrado la propria opinione di aver a che fare con un Ascomicete, credette meglio riportarlo al genere *Oidium* sotto il nome di *Oidium coccidioides*, « o, se vi sono obbiezioni all'adozione del nome specifico di *coccidioides*, chiamarlo *Oidium protozoides* ».

Questo stesso autore passa poi a considerare anche le osservazioni sul caso di GILCHRIST e STOKES dovuto ad un fungo che nei tessuti produce forme gemmanti e non sporulanti, ristudiando nello stesso tempo le culture di RICKETTS del microorganismo della « dermatite blastomicetica » od « oidiomicetica ». Non ostante che OPHÜLS per il primo avesse rilevato le fondamentali differenze fra l'agente del granuloma coccidioidico (non gemmante ma endosporulante nei tessuti) e quello della « dermatite verrucosa blastomicetica » (gemmante e non endosporulante nei tessuti), confonde i due microorganismi che pare identifichi con *Oidium coccidioides* od *Oidium protozoides*, dopo di aver osservato come le presunte differenze ammesse da RIXFORD e GILCHRIST per il *Coccidioides immitis* ed il *Coccidioides pyogenes* non hanno valore. In

conseguenza di ciò e per quel tanto che ci è dato di ricostruire dalle osservazioni dell'OPHÜLS stesso, *Oidium coccidioides* e *Oidium protozoides* sarebbero in parte sinonimi di *Coccidioides immitis* ed in parte sinonimi di *Gilchristia dermatitidis* (CIFERRI e LEDAELLI, 1935–*a*).

Dopo ciò la natura fungina del parassita della malattia di POSADAS e WERNICKE resta definita, e non viene più posta in discussione.

A partire da questo punto non è più possibile seguire i singoli casi che si moltiplicano d'anno in anno, nè gli agenti causali attribuiti ad essi, poichè la maggior parte delle volte questi ultimi sono identificati solo indirettamente per l'aspetto clinico od anatomo–patologico dell'affezione indotta, in base al criterio, sino a tempi recentissimi ritenuto esatto, che ogni agente fungino inducesse una malattia tipica e specifica, distinta da quella provocata da altri germi patogeni. Il microorganismo viene raramente isolato in cultura, e se lo è, viene studiato incompletamente ed unilateralmente; ed a complicare ulteriormente le cose sta il fatto che l'aspetto di questi miceti in cultura è così diverso da quello nei tessuti viventi, che di frequente gli investigatori sono del tutto sviati dalla vera strada. A mantenere e ad aumentare la confusione intervenne la generalizzazione del nome « blastomicosi » che, introdotta per designare delle micosi da veri blastomiceti (Saccaromiceti o forme asporigene di essi, includendo gli Endomiceti ed affini) in cui l'aspetto del fungo in cultura non è dissimile da quello del fungo stesso annidato nei tessuti animali viventi, si falsava per le blastomicosi del tipo di GILCHRIST e STOKES, per perdersi completamente nelle forme di granuloma coccidioide. In altre parole, il nome « blastomicosi » creato per le malattie europee indotte da veri o da falsi lieviti, si estendeva alle granulomatosi americane che con tali funghi non avevano nulla a vedere, tale errore essendo facilitato dall'interpretazione Vuilleminiana dei termini « blastomiceti » e « blastomicosi ».

Sotto queste riserve, e tenendo conto per di più che i cambi generici si effettuarono, nella maggior parte dei casi, per ragioni puramente teoriche e seguendo le correnti dominanti nelle varie fasi di evoluzione della micologia medica (e quindi senza che gli inventori delle nuove combinazioni avessero di solito studiato direttamente il materiale riferentesi a questi funghi), riassumeremo l'ulteriore sviluppo nomenclatoriale di essi a seconda delle tendenze a mettere in valore uno dei vari caratteri morfologici presentati dal fungo *in vivo* od *in vitro*. Distingueremo così:

A) Una tendenza a mettere in prima linea i caratteri morfologici del fungo nei tessuti viventi, senza considerare le caratteristiche morfologiche in cultura, che si suddivide in due tendenze secondarie:

a) la valorizzazione dell'endosporulazione nei tessuti, considerando che le endospore fossero l'organo di moltiplicazione meglio differenziato e quindi il più importante per la sistematica del fungo. Questa

tendenza conservativa si polarizzò intorno a *Coccidioides* come nome generico e, di solito, alla specie *Coccidioides immitis*;

b) il fatto della presenza di cellule rotonde formatesi nei tessuti, qualunque fosse la loro origine e la loro ulteriore evoluzione, che si ricollega alla nozione Vuilleminiana di « blastomiceti » e « blastomicosi » in riguardo alle forme fungine nei tessuti patologici. L'adozione di questo criterio portò il CASTELLANI alla creazione del genere *Blastomycoides* come conseguenza della concezione anatomo-clinica unitaria delle vere blastomicosi e di tutto il gruppo delle malattie che fanno capo ai granulomi coccidioide e paracoccidioide ed anche alla dermatite verrucosa nordamericana.

B) Una tendenza opposta alla precedente, che metteva in prima linea il valore sistematico di organi di moltiplicazione presentati dai ceppi in cultura su substrati artificiali. Questa tendenza si è sviluppata, malgrado le numerose affermazioni in contrario, sino a negare un'endosporulazione di tutti i funghi delle blastomicosi nordamericane. A seconda delle forme di moltiplicazione che sono prese in considerazione, si ebbero varie tendenze secondarie nelle quali possiamo distinguere:

a) la valorizzazione delle artrospore, sia che queste sieno dominanti quali elementi di moltiplicazione nelle culture, sia che semplicemente sieno presenti. Da ciò si sono avute le varie denominazioni che, iniziatesi con il riferimento al genere *Oidium*, hanno poi variato con i suoi equivalenti nomenclatoriali di *Mycoderma*, *Zymonema* e *Geotrichum*;

b) la valorizzazione di tutto il complesso morfologico di certi ceppi nei riguardi della forma e della disposizione delle tallospore apicali ed intercalari che ha portato alla creazione di *Scopulariopsis americana* per un fungo che, almeno in uno dei ceppi studiato da OTA e KAWATSURE (1933), è un *Coccidioides immitis*.

I nomi generici impiegati a designare l'agente del granuloma coccidioide, gli autori principali che li hanno impiegati e le ragioni da loro addotte, possono così riassumersi:

a) Genere *Coccidioides* Stiles in RIXFORD e GILCHRIST.

La storia del genere è già stata riassunta nei tratti principali. Diremo qui solamente che il genere e le due specie inizialmente descritte sono, dalla maggior parte degli autori, attribuite direttamente a RIXFORD e GILCHRIST, mentre solo qualcuno (SARTORY, 1920; VUILLEMIN, 1931) ne attribuisce la paternità a STILES.

Sulle basi di quanto dichiara MOORE (1932) e seguendo l'uso generalizzato nella nomenclatura botanica, la paternità del genere e delle specie deve essere riservata a « STILES in RIXFORD e GILCHRIST », attribuendo ad ognuno i propri meriti.

Delle due specie distinte da RIXFORD e GILCHRIST (1896) vi è da notare che, a ragione, OPHÜLS (1905-*a*; 1905-*b*) le unificò, osservando che la maggiore o minore abbondanza di pus nelle lesioni patologiche, e la formazione prevalentemente periferica o centrale delle endospore nelle cellule madri non costituiscono un carattere differenziale specifico.

VUILLEMIN (1931) situa nel genere *Coccidioides*, oltrechè il *Coccidioides immitis*, lo *Zymonema histosporocellularis* Haberfeld ed il *Cryptococcus farcinimosus* Rivolta et Micellone sotto il nome di *Coccidioides histosporocellularis*. Il primo è stato da noi (1935-*a*) riferito a *Paracoccidioides brasiliensis* (Splend.) Alm. Il secondo situato in questo genere solo per l'aspetto criptococcoide delle cellule fungine nei tessuti del cavallo affetto da farcino, e per le « grosses boules pleines de gouttes refringentes rappellants les entospores des ses congènères » è stato egualmente da noi riferito ad *Histoplasma farcinimosum* (Riv. et Mic.) Cif. et Red. (1934-*b*).

Dopo ciò devesi ritenere che fino ad ora il genere *Coccidioides* comprende una sola specie, vale a dire il *Coccidioides immitis* Stiles.

b) Genere *Oidium* Robin.

La definizione dell'agente del granuloma coccidioide nel genere *Oidium* in senso medico, si deve probabilmente, più che alla osservazione della presenza di vere, per quanto non del tutto tipiche, artrospore in alcuni dei ceppi, alla constatazione della presenza di pseudoartrospore delle quali si parlerà più avanti. I due sinonimi già citati di *Oidium protozoides* e *O. coccidioides*, creati dall'OPHÜLS (1900; 1905-*a* e 1905-*b*) passano in sinonimia come le due combinazioni del VERDUN (?) di *Oidium immite* e *O. pyogenes* che avrebbero dovuto sostituire *Coccidioides immitis* e *C. pyogenes*.

c) Genere *Blastosporidium* Hartmann.

Tale genere dei Protozoi Haplosporidi entra a far parte della letteratura su *Coccidioides* con l'HARTMANN (1912). Quest'autore descrisse insieme a SCHOO (1912) il parassita in tessuti prelevati alla necroscopia di un uomo morto ad Amsterdam per una malattia diagnosticata come cancro. L'evoluzione del parassita è descritta in termini protozoologici, e lo stadio che gli autori paragonano ad una blastula fa loro riferire il microorganismo al genere *Blastosporidium*. A vero dire la figura dell'HARTMANN (1912) non è quella tipica di veri sporangi, mentre ricorda certi aspetti del *Paracoccidioides*; però egli parla di blastula simile al *Coccidioides* endosporulante. La specie venne definita come *Blastosporidium Schooi*, ma in un secondo tempo l'HARTMANN stesso propese per una identità con il *Coccidioides immitis*.

Qualora si potesse confermare che il caso fosse autoctono europeo, e le descrizioni o le figure del parassita tali da permettere una sicura identificazione di esso, il reperto sarebbe assai importante, come quello del primo caso descritto in Europa.

d) Genere *Zymonema* De Beurmann et Gougerot.

Di questo genere e del suo significato odierno abbiamo parlato altrove (1929). Per quello che si riferisce a *C. immitis* il nome generico di *Zymonema* è stato impiegato solo dal De Mello (in De Mello e Fernandes, 1918) che crea la combinazione *Zymonema immitis*, senza indicare le ragioni del cambio di genere. È probabile però che essi siano stati indotti a questo da una presunta analogia con *Zymonema Gilchristi* De Beurmann et Gougerot, e con *Zymonema brasiliensis* Splendore. È certo in ogni modo che il significato del genere è stato mal compreso, poichè insieme a questa specie i due autori portoghesi situano il *Rhodomyces Kochii* o *Monilia Kochii* sotto il nome di *Zymonema Kochii*.

Qualunque potesse essere il significato di *Zymonema*, è certo che per essere un lievito asporigeno con blastospore e clamidospore, « oidii » e micelio settato e ramoso, aventi « forme intermediarie tra il tipo lievito ed il tipo con ife (*Endomyces*) » non ha nessun rapporto con *Coccidioides*, tanto più che delle due specie succitate, lo *Zymonema Gilchristi* è stato da noi (1935-*a*) riportato a *Gilchristia* e lo *Zymonema brasiliense* (1935-*c*) a *Paracoccidioides*.

e) Genere *Blastomycoides* Castellani.

La prima notizia su questo genere appare in una delle Gehrman Lectures tenute presso la Tulane University nel 1926, ma pubblicate solo nel 1927 o '28 (1927–28), data questa in cui, a termine delle Regole Internazionali di Nomenclatura Botanica, si inizia la sua validità. La prima diagnosi si trova nella nota 6 a piede della pagina 24 (estratto del lavoro citato) in questi termini: « Oosporaceae che appaiono nelle lesioni come grandi cellule arrotondate di 8 a 20 micron ed anche più, con granuli o sferule protoplasmatiche e membrana chiaramente duplice; in agar glucosato forma un abbondante micelio ». Così come è definito, il genere avrebbe dovuto essere ascritto agli Agonomycetes o Mycelia sterilia, riproducendosi solo per mezzo di ife micceliche; ma l'ascrizione alle « Oosporaceae » e la descrizione delle prime tre specie del genere fanno supporre che la diagnosi sia incompleta. Infatti si arriverà alla diagnosi definitiva mantenuta sino al 1930 (1930-*a*): « Oosporaceae con micelio abbondante ed ife in agar glucosato; micelio abbondante e talvolta conidi laterali quando è coltivato in goccia pendente su brodo glucosato; non fermenta zuccheri. Nelle lesioni si vedono solo delle cellule arrotondate od ovali, con dei ben marcati doppi contorni e granulazione del plasma ». In nessuna delle varie pubblicazioni del Castellani in cui si fa riferimento al genere *Blastomycoides* (1927–'28; 1928-*a*; 1928-*b*; 1930-*a*; 1930-*b*; 1933), nonchè in quelle di Castellani e Jacono (1933), è indicato il tipo; ma in tutte quelle in cui sono elencate le specie del genere, il primo della lista è sempre il *Blastomycoides immitis*, che deve quindi considerarsi come tipo. In un primo tempo solo tre specie vi furono ascritte e cioè:

B. immitis, *B. dermatitidis* (=*Blastomyces dermatitidis* Gilchrist et Stokes e la nuova specie *B. tulanensis*. Nel 1928 (1928-*b*) il CASTELLANI aggiunge una quarta specie (*B. niger* Castellani) di cui però non parlerà ulteriormente in nessuno dei lavori; e nel 1930 (1930-*a*) una quinta specie: il *B. lanuginosus*. La vita di questo genere sarà effimera poichè già nel 1933 non esisterà più essendo stato spezzato da CASTELLANI stesso e da altri autori, incluso JACONO (1933), e sparpagliato in diversi generi (*Geotrichum*, *Monosporium*, *Glenospora*). Ma nel frattempo circolavano nei laboratori le culture del CASTELLANI classificate provvisoriamente come *Blastomycoides* (*B. metamericanus*, *B. metaeuropeus*, *B. louisianoideum* e *B. multifermentans*), binomi di etichetta che non si devono quindi ritenere come validamente pubblicati agli effetti della nomenclatura delle specie stesse.

Per chiudere diremo solo che il genere *Blastomycoides*, genere eminentemente medico, è riconosciuto pure da CASTELLANI ed JACONO (1933) non avere un significato botanico. Ma nemmeno dal punto di vista strettamente medico esso ha ragione oggi di esistere poichè sostituisce (CASTELLANI e JACONO, 1933) « *Blastomyces* sensu lato » ed i funghi delle blastomicosi in genere, malattie che pur nel loro estesissimo polimorfismo possono tuttavia frequentemente venire differenziate anche solo dal punto di vista anatomo-clinico (granuloma coccidioide, dermatite verrucosa nordamericana, istoplasmosi, granuloma paracoccidioide, ecc.).

f) Genere *Mycoderma* Persoon.

La storia del genere *Mycoderma* si riconnette a quella di *Oidium* nel senso medico, e su di essa non insisteremo affatto. L'unico autore che ha situato il *C. immitis* nel genere *Mycoderma* pare essere stato il BRUMPT nel 1927; questa classificazione contrasta anche l'unica caratteristica in comune con tutte le specie di *Mycoderma*, inteso nel senso più lato, cioè la produzione di un velo nei mezzi culturali liquidi, poichè lo stesso BRUMPT nega al fungo questa facoltà. Inoltre le vere artrospore non sono sempre presenti, e quando lo sono, appaiono rare, formate sotto condizioni speciali di vita e mai del tutto tipiche.

g) Genere *Pseudococcidioides* Da Fonseca.

Il genere in questione è stato descritto dal DA FONSECA (1928) sul materiale di un caso argentino di un ascesso perilaringeo, considerato come di origine tubercolare e pubblicato da MAZZA e PARODI (1928). Nei tessuti i due autori trovarono delle forme fungine che li indussero, in un primo tempo, ad identificare il microorganismo con quello di POSADAS; in un secondo tempo essi confermarono le viste precedenti, senza però identificarlo in via definitiva con il *C. immitis*.

Il DA FONSECA (1928) ristudiando i preparati originali di questo fungo che non fu coltivato, lo distinse da *Coccidioides* per « la maniera di formazione delle spore, qui separate in gruppi dentro la cellula madre »

e per la loro forma poliedroide, creando la specie *Pseudococcidioides Mazzai*.

L'ALMEIDA (1932-*b*) ristudiò ancora i preparati dello stesso caso e dimostrò come le caratteristiche di *Pseudococcidioides* rientrano in quelle di *Coccidioides*, ponendo quindi il genere in sinonimia. Nella nostra esperienza possiamo confermare le vedute dell'ALMEIDA, anche per quello che si riferisce alla determinazione di forme cliniche, alla lenta evoluzione con tendenza a localizzazione dei granulomi, altra caratteristica che è alla base di *Pseudococcidioides*, ma che probabilmente è comune ai ceppi di *Coccidioides* meno virulenti.

Incidentalmente possiamo notare che, per ragioni molto logiche e non molto dissimili da quelle di DA FONSECA, RIXFORD e GILCHRIST (1896) avevano distinto il *Coccidioides pyogenes* dal *C. immitis*, e OPHÜLS (1905-*b*) per le stesse ragioni che porterà poi l'ALMEIDA a proposito di *Pseudococcidioides*, aveva rifuso le due specie.

h) Genere *Scopulariopsis* Bainier emend. Thom.

Il nome generico di *Scopulariopsis* per i funghi del gruppo dei *Coccidioides* è stato usato solo da OTA e KAWATSURE (1933). Nel 1928 OTA (1928) pubblicò una *Scopulariopsis americana* per il fungo causante l'« oidiomicosi americana » basato sullo studio delle culture N. 1135, 1136, 1233, 1234 della collezione WEIDMAN. La *Scopulariopsis americana* appare datata dal 1926, ma si tratta probabilmente solo della data di creazione del binomio, non quella di pubblicazione (cioè quella valida ai fini nomenclatoriali); del resto applicando le Regole Internazionali di Nomenclatura Botanica, la specie non risulterebbe validamente pubblicata mancando di diagnosi latina od in lingue europee, e provvista solo di una corta ed incompleta descrizione. Le figure del primo lavoro (1928), che sono le stesse riportate ulteriormente (1933), mostrano anche delle fruttificazioni che nel 1928 l'OTA credette del tipo di *Grubyella*. Egli ritiene distinta la *Scopulariopsis americana* dal *Coccidioides immitis* che, nel riassunto francese del lavoro giapponese, dice essere pure il parassita dell'« oidiomicosi americana », e che avrebbe invece una forma conidica del tipo *Glenospora*.

Secondo OTA e KAWATSURE (1933) il fungo produce delle tallospore portate da un micelio settato di un certo spessore, dove le ife si suddividono in corte cellule a pareti ispessite, o sono visibili alla estremità delle ife; si produrrebbero pure dei conidi che si trovano però solo in culture molto vecchie, e quindi pulverulente, o in goccia pendente (noi abbiamo potuto constatare il fatto solamente nelle culture in goccia pendente). I conidi sono prodotti da conidiofori più o meno evidentemente a forma di bottiglia inseriti direttamente sul micelio o nascenti da corte ramificazioni di esse. I conidi sono di solito brevemente catenulati, in catenelle di tre o quattro elementi, raramente sino a sei o sette,

od isolati. Da giovani sono rotondeggianti, ialini e lisci; da vecchi giallo-crema e scabri; essi misurano da 5 a 6 μ di diametro.

La patogenicità del fungo e lo studio istologico delle lesioni provocate sperimentalmente è stato effettuato da KAWATSURE (1933) con inoculazioni in topi, ratti bianchi, cavie e conigli, usando il ceppo OTA N. 539 che corrisponde al WEIDMAN N. 1136, cioè ad uno che è stato studiato anche da noi.

I reperti delle prove biologiche comparative sugli animali tra *Scopulariopsis americana* e *Coccidioides immitis* starebbero per una azione più circoscritta e benigna a carico della prima specie, mentre la seconda darebbe una forma più grave: nei tessuti malati, il cui quadro istopatologico non ha elementi differenziali al fine della distinzione delle due malattie (che si individualizzerebbero però nelle forme spontanee umane, in quanto la *Scopulariopsis americana* dovrebbe essere ritenuta il più frequente agente della classica malattia di GILCHRIST a decorso relativamente benigno, mentre il *Coccidioides immitis* darebbe delle forme molto più gravi) i parassiti si presenterebbero per la prima delle due specie come corpiccioli rotondi (10–16 μ di diametro) del tipo lievito, mentre per la seconda specie si osserverebbero elementi endosporulanti.

Nelle nostre mani la specie esperimentata da KAWATSURE (ceppo WEIDMAN N. 1136 = *Scopulariopsis americana* Ota) si è comportata nettamente come un *Coccidioides immitis* classico; su questa questione ritorneremo ancora a proposito dello stesso ceppo e di quello N. 2322.

Inoltre, la descrizione data da OTA e collaboratore è troppo laconica ed in ogni caso incompleta per quello che si riferisce proprio a *Scopulariopsis americana* cosicchè, anche ritenendo del tipo *Scopulariopsis* le rudimentali fruttificazioni conidiali osservate in cultura, è innegabile che il ceppo fungino presenta, quando è inoculato nei tessuti animali, delle tipiche endosporulazioni quale *Coccidioides*.

f) Genere *Geotrichum* Link.

La storia di questo genere e delle alterne complicate vicende di cui è stato il soggetto attraverso il tempo, è già stata tracciata da LOUBIÈRE (1924), da LANGERON e TALICE (1932) e da noi stessi (1928; 1935-*b*), ed a queste pubblicazioni rimandiamo per una trattazione più completa. Basterà dire qui che il genere, pur essendo stato abbastanza bene descritto da LINK, fu dimenticato a favore di altri generi molto più equivoci, sia perchè basati principalmente su di una caratteristica culturale comune a molti funghi morfologicamente differenti (*Mycoderma*), sia perchè duplicante un altro genere preesistente e valido (*Oidium*). Ripreso, in parte, da LOUBIÈRE (1924) il genere fu ristabilito ed ammesso per i primi da noi stessi (1929) e quindi accettato da vari autori (LANGERON e TALICE 1932; CASTELLANI e JACONO, 1933; ALMEIDA, 1933; AGOSTINI, 1932; ecc.) anche se non correttamente interpretato. Infatti il significato ad esso

attribuito da LINK, da LOUBIÈRE e da noi stessi è già leggermente differente da quello di LANGERON e TALICE, ma è completamente differente da quello di AGOSTINI e di CASTELLANI e JACONO. La caratteristica più importante del genere *Geotrichum* è quella di moltiplicarsi *soltanto* per artrospore: le specie di questo genere non posseggono blastospore (cellule gemmanti) e in quelle più tipiche nemmeno delle tallospore d'altro genere (clamidospore). Le ife semplici o ramose, ialine e settate, si frammentano di solito (ma non obbligatoriamente), a partire dall'estremità libera e centripetamente in pezzetti dapprima ravvicinati ed in catenelle, poi liberi, ognuno dei quali non ha una differenziazione morfologica propria, in quanto un'artrospora è semplicemente un frammento di micelio non modificato. È chiaro che l'artrospora, tra tutte le tallospore, rappresenta quella inferiore in quanto morfologicamente la meno evoluta, e quindi, da un punto di vista sistematico, la presenza di qualunque altro tipo di tallospora ha un valore maggiore. Nel caso nostro e per i ceppi di *Coccidioides immitis* che le presentano, queste ragioni hanno tanto più valore in quanto, di solito, le artrospore sono atipiche, rare, ed appaiono solo in condizioni eccezionali d'ambiente, quasi fossero delle forme di moltiplicazione del fungo in istato di sofferenza.

La definizione del *Coccidioides immitis* quale *Geotrichum* da parte della AGOSTINI (1932), seguita pure da CASTELLANI ed JACONO (1933) che, probabilmente per le stesse ragioni (non illustrate nel testo) trasportano nel genere *Geotrichum* anche il *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist et Stokes, si deve al fatto che l'autrice ha lavorato solo su culture *in vitro* ed era quindi nella impossibilità di osservare le forme endosporulanti del fungo. In questo essa si è riattaccata alla tradizionale definizione di *Coccidioides* come *Oidium* e come *Mycoderma*. È ben vero che l'AGOSTINI non entra in merito alla posizione sistematica di *Coccidioides immitis* Stiles, ma solo del «ceppo CASTELLANI» che lei ha studiato, e crea quindi la combinazione *Geotrichum immite* (Castellani) Agostini; ma siccome *Blastomycoides immitis* Castellani è uguale a *Coccidioides immitis* Stiles, ne deriva pure obbligatoriamente che la combinazione di *Geotrichum immite* deve riferirsi alla specie descritta da RIXFORD e GILCHRIST.

ORIGINE DEI CEPPI STUDIATI.

1. *Blastomycoides immitis* (Stiles) Castellani, proveniente dalla raccolta del prof. CASTELLANI. È questo lo stesso ceppo che è stato studiato in un primo tempo da REDAELLI, poi da TIMPANO e quindi da CIFERRI, e sul quale si sono svolte le principali osservazioni. La sua origine ci è ignota. Nel corso del lavoro questo tipite verrà denominato « ceppo CASTELLANI ».

2. *Geotrichum immite* (Castellani) Agostini, proveniente dalla Micoteca del R. Laboratorio Crittogamico annesso all'Istituto Botanico della R. Università di Pavia: è un trapianto del ceppo precedente, che indichiamo come « ceppo AGOSTINI ».

3. *Coccidioides immitis* Stiles denominato nel presente lavoro come « ceppo CIFERRI »: è un trapianto del « ceppo CASTELLANI ».

4. *Coccidioides immitis* Stiles, « ceppo MOORE », isolato negli Stati Uniti d'America dal MOORE.

5. *Blastomycoides* (*Geotrichum*) *dermatitidis* (Gilchrist et Stokes) Castellani, proveniente dalla raccolta CASTELLANI e di origine a noi ignota.

6. *Coccidioides immitis* Stiles « ceppo WEIDMAN » N. 1136 dal Nord America.

7. *Coccidioides immitis* Stiles « ceppo WEIDMAN » N. 1091 dal Nord America.

8. *Coccidioides immitis* Stiles « ceppo WEIDMAN » N. 1676 dal Nord America.

9. *Coccidioides immitis* Stiles « ceppo WEIDMAN » N. 2322 dal Nord America.

10. *Geotrichum louisianoideum* Castellani, isolato negli Stati Uniti d'America e quindi anche nell'Italia meridionale. Il ceppo in istudio sembra essere quello americano.

11 e 12. *Glenospora metaeuropaea* Castellani, isolata rispettivamente nei Balcani e nell'Italia meridionale.

13. *Coccidioides immitis* Stiles probabilmente di origine Sudamericana e proveniente dalla collezione dell'Istituto OSWALDO CRUZ.

14. *Coccidioides immitis* Stiles « ceppo WEIDMAN » N. 1978 del Nord America.

15. *Coccidioides immitis* Stiles « ceppo del Centraalbureau voor Schimmelcultures » di Baarn (Olanda).

Di questi ceppi cinque sono di origine ignota (NN. 1, 2, 3, 5, 15), ma probabilmente nordamericani); sette di origine certamente nordamericana (NN. 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14); uno di origine sudamericana (N. 13); uno di origine Europea (Italia, N. 12). Il N. 11 non risultò essere un *Coccidioides immitis*.

CARATTERI CULTURALI.

Tutti i ceppi di *Coccidioides* studiati (ad eccezione di quello che appare essere il più aberrante in riguardo alle caratteristiche culturali, e cioè il « ceppo WEIDMAN » N. 2322) hanno una *facies* culturale in comune che li rende indistinguibili l'uno dall'altro. Sui terreni solidi agarizzati, a base di carboidrati e di una forma complessa di sostanze

azotate, l'aspetto è uniforme: si ha una vegetazione composta quasi esclusivamente di micelio sotto forma di ife rasate, semplici, ramose, reptanti o suberette, bianche o biancastre, senza caratteri speciali.

Le culture in mezzi solidi agarizzati ma senza carboidrati, modificano notevolmente l'aspetto della colonia che dal tipo ifomicetico suddescritto, passa al tipo di colonia più o meno nettamente granuloso – plicata sino a cerebroide, consistente, giallognola, con ife profondamente addentrantisi nel substrato stesso. È possibile che, entro certi limiti, queste variazioni sieno subordinate, oltrechè alla composizione del substrato di cultura, anche alla temperatura di incubazione.

In cultura in semianaerobiosi il fungo cresce con molta difficoltà ed assai lentamente, e sotto condizioni di anaerobiosi completa non si sviluppa affatto. In mezzi liquidi le culture sono scarse e lente; si forma talvolta con difficoltà un velo superficiale che, pur variando da ceppo a ceppo, manca di caratteristiche differenziali definite, e si originano delle colonie di fondo assolutamente uniformi ed omogenee.

In rapporto alle temperature ottime di crescita vi è, in generale, una certa elasticità di adattamento dei vari ceppi esaminati: la maggior parte dei ceppi può crescere tanto a 35–38° C. come a temperatura ambiente, ma ve ne sono di quelli che preferiscono quella temperatura ed altri che preferiscono la temperatura ambiente. I casi di mancato sviluppo all'una od all'altra temperatura paiono essere rari.

In generale la temperatura compresa tra 25° e 30° C. pare essere favorevole alla quasi totalità dei ceppi.

In conclusione, sui caratteri culturali non si può basare alcuna differenziazione specifica o subspecifica dei ceppi di *Coccidioides immitis*, a meno che questo carattere non sia correlato con tutto un complesso di caratteristiche morfologiche, biochimiche e biologiche, come per il « ceppo WEIDMAN » N. 2322. Nello stesso tempo si conferma l'omogeneità della specie *Coccidioides immitis* anche attraverso ceppi di varia provenienza, isolati da casi diversi ed in diverse regioni del globo e qualcuno di essi conservato già da vari anni in cultura e sotto condizioni ambientali molto dissimili.

Sino ad un paio d'anni fa non si avevano delle prove dirette di uno stadio di vita saprositico in natura di *Coccidioides*, cosicchè la sua conservazione al di fuori dell'organismo umano od animale restava un mistero. Data però, nella casistica, l'alta percentuale degli agricoltori affetti da granuloma coccidioide, si supponeva che il fungo potesse vivere e conservarsi in substrati inanimati.

Pur avendosi avuto delle variazioni individuali, le nostre esperienze confermano pienamente che i *Coccidioides* vivono di una vita saprositica in natura su substrati organici inanimati, sia di origine animale che di origine vegetale. L'unica condizione necessaria per il loro sviluppo è

la presenza di una sostanza organica azotata a molecola complessa, anche se non obbligatoriamente della più alta organizzazione molecolare. Così abbiamo potuto coltivare *Coccidioides immitis* in sostanze ricche di cheratina o composti analoghi (capelli umani, crini di cavallo, piume, piumino di volatili, unghia cruda di cavallo), che in substrati contenenti sostanze albuminoidee (fungo secco, cariossidi di grano, fieno), o derivate immediatamente da queste: terra letamata e letame maturo. Le colonie si sviluppano molto lentamente e quasi esclusivamente a temperatura di 23–25° C., la temperatura di 35–37° essendo sotto queste condizioni sfavorevole (tav. VIII).

Il fatto che tutti questi substrati, salvo le cariossidi di frumento, sono poveri o poverissimi di carboidrati, confermano le numerose prove colturali della capacità di questo fungo a vivere in substrati privi di zuccheri, a condizione che sia presente una sostanza azotata a complessa organizzazione molecolare (nel nostro caso cheratina, sostanze azotate dell'*humus* e del letame derivate dall'idrolisi di sostanze proteiche contenute nei vegetali, glutine, ecc.). In culture *in vitro* i vari ceppi studiati hanno mostrato di svilupparsi esclusivamente in terreni contenenti polvere di sangue secco, peptone, estratto di carne LIEBIG.

Della funzione dei *Coccidioides* in natura e della speciale attività biochimica che esercitano in queste condizioni si parlerà a proposito delle caratteristiche biochimiche.

CARATTERI BIOCHIMICI.

I vari ceppi di *Coccidioides immitis* da noi investigati manifestano la più completa uniformità in rapporto alle caratteristiche biochimiche saggiate tanto che, su queste basi soltanto, i ceppi non sarebbero in nessuna maniera distinguibili tra loro.

La caratteristica più importante che, secondo CASTELLANI, distingue il *Blastomycoides* o *Geotrichum immitis* da quello che egli chiama *Blastomycoides* o *Geotrichum dermatitidis* (ma che nelle nostre esperienze, è risultato non potersi differenziare dal *Coccidioides immitis*), è la produzione di pigmento brunastro quando sia coltivato in agar al mannitolo e sussidiariamente su agar – glucosio, agar – lattosio, agar alla glicerina, e per la liquefazione della gelatina e del siero. Lo stesso CASTELLANI, del resto, ha implicitamente notate delle variazioni di comportamento facilmente reperibili attraverso le differenti pubblicazioni di questo micologo dal 1928 al 1933, le quali a parte i risultati da noi ottenuti, tolgono ogni valore di una certa importanza alle differenziazioni specifiche ed anche subspecifiche basate sulla pigmentazione in agar del *Coccidioides immitis* che già era stata segnalata da OPHÜLS nel 1905.

Nelle nostre esperienze eseguite contemporaneamente sullo stesso lotto di terreno ed in condizioni assolutamente identiche, abbiamo osservato che una parte dei ceppi di *Coccidioides* abbrunisce il substrato di cultura al mannitolo (*Geotrichum louisianoideum*, *G. immite* « ceppo AGOSTINI », *Blastomycoides metaeuropeus*, *Coccidioides immitis* « ceppo MOORE », « ceppi WEIDMAN » N. 1234, 1676 e 1091, *Coccidioides immitis* «ceppo CASTELLANI ») mentre gli altri non producono pigmento; i ceppi in cui le colonie diventano grigiastre o brunastre sono ancora meno: *Geotrichum louisianoideum*, *Blastomycoides metaeuropeus*, ed il *Coccidioides immitis* « ceppo WEIDMAN » N. 1091.

Si conferma in tal modo la differenza del comportamento su agar al mannitolo tra il *Geotrichum immite* ed il *Geotrichum dermatitidis*, ma nello stesso tempo questa caratteristica perde ogni valore differenziale.

Lo studio delle pigmentazioni su agar al lattosio, su agar al glucosio e su agar alla glicerina non è stato eseguito in vista dei risultati negativi ottenuti con agar al mannitolo da un lato, e dall'altro per il fatto che anche CASTELLANI lo considera di valore sussidiario.

Lo studio della pigmentazione in acqua pepto–glucosata alla temperatura di 23–25° e 35–37° C. ha dato risultati discordi: alcuni ceppi abbruniscono il liquido di cultura alle due temperature (*Coccidioides immitis* « ceppo WEIDMAN » N. 1091, « ceppo MOORE », e *Geotrichum immite* « ceppo AGOSTINI »); alcuni, e sono la maggior parte, pigmentano il liquido soltanto alla temperatura di 23–25° C. (*Coccidioides immitis* « ceppi WEIDMAN » N. 1136, 1676, 2322 e forse pure il « ceppo CIFERRI »); il solo « ceppo CASTELLANI » avrebbe prodotto il pigmento a 35–37° C.

Come si vede da questo breve riassunto, non è possibile attribuire un valore differenziale alla produzione di pigmento in mezzo liquido; al contrario abbiamo potuto osservare che l'imbrunimento del liquido di cultura della composizione e sotto le condizioni notate, si ha soltanto ove si è sviluppata una colonia superficiale capace dell'ostruzione completa del tubo, mentre manca ove questa è incompleta e dove vi sono solamente delle colonie natanti o profonde. Questo si è osservato bene nei ceppi ove in uno solo dei due tubi seminati per ognuna delle temperature si è avuto sviluppo di una colonia superficiale, come nel « ceppo WEIDMAN » N. 1676 coltivato a 37° C. L'unico ceppo che si è comportato in maniera anomala è stato il « ceppo AGOSTINI » in cui si è avuto un leggerissimo abbrunimento senza traccia di colonia superficiale; ma l'intensità della pigmentazione era ben lontana da quella raggiunta nei tubi ove si è formata una colonia superficiale.

Si può emettere l'ipotesi che sotto le condizioni di cultura in mezzo liquido da noi realizzate, la pigmentazione sia funzione delle condizioni di vita quasi anaerobiotiche del fungo, raggiunta per l'ostruzione del tubo dalla colonia superficiale. Essa è indipendente dalla temperatura di

cultura salvochè nei rapporti dello sviluppo generalmente più facile e maggiore di questi ceppi a 23–25°, piuttosto che a 35–37° C. Si conferma che è impossibile trarre dalla pigmentazione nei mezzi liquidi dei caratteri differenziali anche solo di valore subspecifico.

* * *

Per i caratteri fermentativi il fungo manifesta una completa assenza di potere fermentante; e nella quasi totalità le culture vengono lentamente alcalinizzate. Le differenze di comportamento dei vari ceppi sono del tutto trascurabili.

Nessuno dei ceppi è capace di scindere l'esculina.

Tutti liquefanno lentamente la gelatina all'osservazione effettuata dopo 35 o 40 giorni.

Tutti i ceppi producono indolo dopo 15 giorni; la reazione è particolarmente netta nel « ceppo WEIDMAN » N. 2322.

Nessuno dei ceppi ha azione sul latte che, dopo 40 giorni di cultura, viene leggermente alcalinizzato.

Nessuno dei ceppi è capace di svilupparsi in condizioni di completa anaerobiosi.

In riguardo ai vari composti di azoto somministrati (solfato d'ammonio, nitrato di potassio, nitrito di potassio, asparagina, glicocolla, peptone, estratto di carne LIEBIG, sangue in polvere) manifestano una sensibilissima identità di comportamento in quanto si sviluppano bene solamente in presenza delle tre sostanze azotate segnate per ultimo (peptone, estratto carne LIEBIG, sangue in polvere).

In riguardo alla azione inibente delle differenti diluizioni di violetto di genziana, manifestano delle leggere differenze, ma in generale una discreta resistenza: il più tollerante è apparso essere il « ceppo WEIDMAN » N. 2322, il quale si sviluppa anche in substrati liquidi con violetto di genziana 1 : 10.000.

L'azione inibente del Trypanrot è stata, in linea generale, molto più intensa di quella del violetto di genziana, ma i ceppi si sono comportati in maniera abbastanza analoga, quelli relativamente più resistenti essendo stati il « ceppo WEIDMAN » N. 2322, ed il « ceppo CIFERRI ».

L'influenza degli idrati di carbonio, come ci si poteva attendere per il fatto che *Coccidioides immitis* può fare a meno della presenza di essi, è stata abbastanza variabile, ma non tale da poter permettere qualche conclusione d'insieme.

Come si vede, le nostre conclusioni portano ad ammettere una molto sensibile omogeneità nelle caratteristiche dei diversi ceppi di *Coccidioides immitis* studiati: da un lato e dall'altro coincidono con le non troppo abbondanti osservazioni da parte dei differenti autori su questo argo-

mento. Alcune delle caratteristiche erano state notate fin dal 1905 da OPHÜLS, come la liquefazione della gelatina: non la peptonizzazione del latte dopo 30–60 giorni senza cambio di reazione. WOLBACH (1911) accertò che *Coccidioides immitis* non è capace di fermentare il glucosio, il saccarosio e la mannite, e BROWN e CUMMINGS (1915) che non fermenta il glucosio, il lattosio e la destrina; per BUMP (1925) non fermenta destrosio, maltosio, saccarosio e lattosio; e secondo questo autore è aerobio obbligato. Secondo MOORE (1932) liquefà lentamente la gelatina e cresce scarsamente in condizioni di vita anaerobiotiche; il miglior terreno è l'agar al brodo di carne contenente il 6 % di glicerina e cresce in terreni con un pH variabile da 4,2 a 7,5. BUMP (1925) ha potuto far crescere il fungo in un pH variabile da 2,02 a 12,13. Secondo questo autore si conferma che cresce bene in agar semplice, agar sangue, brodo di carne, soluzioni di peptone e brodo senza zucchero, alcalinizzando lentamente o non alcalinizzando affatto i liquidi di cultura.

Secondo CASTELLANI liquefà rapidamente il siero e la gelatina (meno rapidamente il ceppo *Geotrichum dermatitidis*), non coagula nè digerisce il latte che è spesso alcalinizzato, non fermenta glucosio, levulosio, maltosio, galattosio, saccarosio, lattosio, mannitolo, glicerina, inulina, dulcitolo, ramnosio, inositolo, adonitolo, arabinosio, amigdalina, salicina, sorbitolo, raffinosio, destrina, eritritolo e xilosio, e di solito non produce acidità in presenza di questi zuccheri.

Il carattere in comune a tutti i ceppi studiati è la mancanza di dinamismo biochimico per quello che si riferisce ai saggi effettuati: tutti sono inattivi verso gli zuccheri e non modificati dalla loro presenza, tutti preferiscono sostanze azotate organiche complesse e mancano di ogni altra attività biochimica, ad eccezione della fluidificazione della gelatina e della produzione di indolo.

CARATTERI MICROMORFOLOGICI IN CULTURA, NEI TESSUTI ANIMALI E FENOMENI DI SESSUALITÀ.

In cultura su ordinari mezzi di laboratorio contenenti una sostanza organica azotata complessa e contenenti o non un carboidrato, alla temperatura ottima di sviluppo, la morfologia del fungo è molto uniforme avendosi soltanto delle ife micelliche abbondantemente e regolarmente ramificate, e qualche rara clamidospora, di solito intercalare. In cultura in goccia pendente si ha all'incirca la stessa morfologia. In cultura in condizioni di semianaerobiosi (cioè in un sottile strato di terreno nutritivo compresso fra un copri – ed un portaoggetto lutati) il numero delle clamidospore aumenta notevolmente, e la loro morfologia si arricchisce di forme nuove che vanno dalla sferica a quella irregolarmente

allungata. Le clamidospore, in questo caso, possono essere tanto intercalari che apicali, isolate o seriate in brevissime catenelle di due tre elementi. Questa morfologia è uguale tanto nei ceppi normali che in quelli

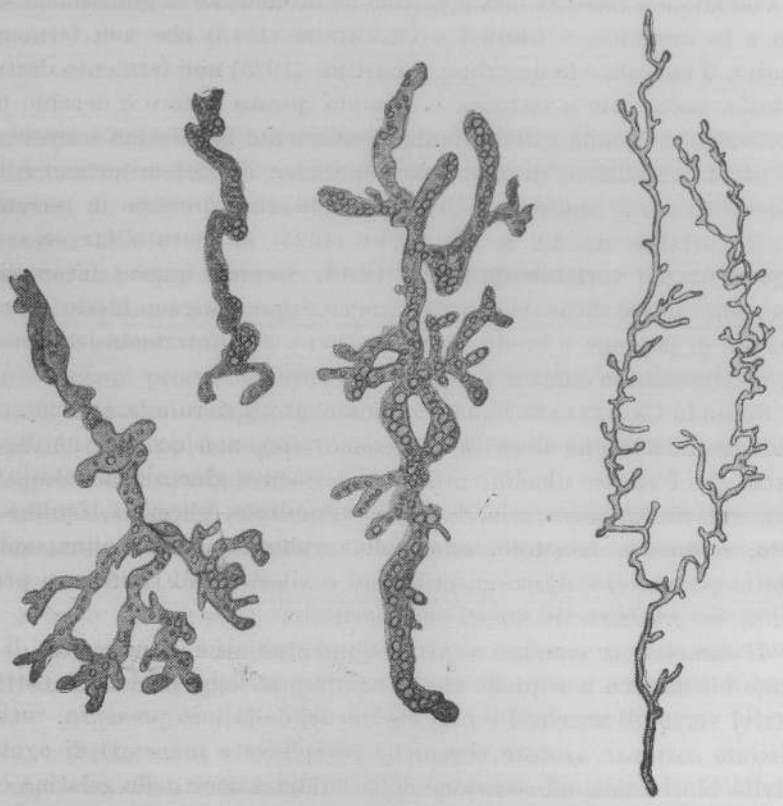


Fig. 1. – Forme involutive ad arbuscoli del *C. immitis Pipkini* in terreno LOECKE leggermente agarizzato, ricordanti analoghi aspetti di Dermatofiti.

degradati, vale a dire nei ceppi che, in base alle prove biologiche, manifestano una minore efficienza parassitaria e patogena.

Il solo « ceppo WEIDMAN » N. 2322 manifesta una morfologia apparentemente assai più complessa in quanto le clamidospore sono abbondantissime, spesso lungamente seriate e di forme e misure molto varie. È questo il ceppo che è stato da OTA e KAWATSURE (1933) definito come una specie del genere *Scopulariopsis*.

Specialmente sotto condizioni di semianaerobiosi si osserva la formazione di altre tallospore, oltre alle clamidospore, e più particolarmente di vere artrospore, la cui presenza ha indotto la AGOSTINI (1932) a classificare *Coccidioides immitis* come una specie del genere *Geotrichum*. Mentre per una discussione su questa questione rimandiamo alle notizie

contenute nella parte che si riferisce a *Geotrichum*, notiamo che tali artrospore sono poco abbondanti e formate solo sotto condizioni di vita in sofferenza, artificialmente provocate. Fondamentalmente si tratta di frammenti cuboidei di micelio che si liberano per una parziale disarticolazione apicale delle ife. D'altronde AGOSTINI, più che delle vere artrospore in terreni normali di cultura e sotto condizioni ordinarie, ha osservato dei fenomeni di pseudoartrosporulazione (vacuolazione a segmento di porzioni delle ife miceliche) di cui si parla anche a proposito di *Geotrichum*.

Inoculando delle culture su terreni ordinari a degli animali recettivi si ha un quadro del tutto tipico: le ife vengono lisizzate in un tempo vario, generalmente nel giro di poche ore, mentre le clamidospore, che funzionano come delle ipnospore, evolvono ulteriormente passando a zoosporangi. Nei ceppi tipici gli zoosporangi raggiungono un diametro variante da 20 a 70 μ la capsula è spinescente, in tutto o in parte, o liscia. Quando gli zoosporangi hanno raggiunto la loro maturità si ha una moltiplicazione del nucleo cui segue il clivaggio, in seno al citoplasma materno, di un numero variabile di endospore (zoospore aflagellate ed immobili) di forma sferica o sferoidea, a parete liscia, di dimensioni varie, che vengono eiettate dallo zoosporangio per rottura di esso o per la sua lisi parziale.

I ceppi degradati manifestano un potere patogenico più attenuato e la malattia sperimentale indotta, anche tenendo presente le possibili variazioni della recettività individuale degli animali, si manifesta come una forma morbosa relativamente circoscritta, ad andamento lento e talvolta con facile tendenza alla risoluzione spontanea. Concomitantemente nei tessuti di questi animali si hanno relativamente pochi zoosporangi, i quali maturano più difficilmente, ed allorchè portano a maturità le zoospore, esse sono in media più piccole e, per ogni zoosporangio, in numero minore che non nei ceppi tipici.

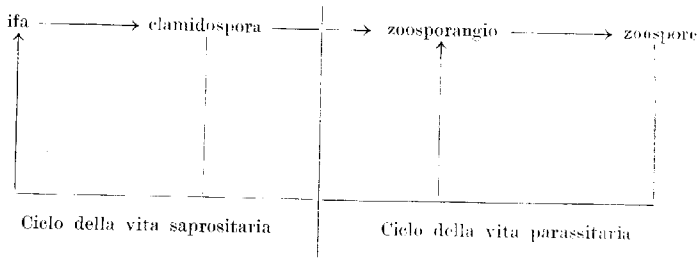
Fig. 2. – Guttulatura nelle ife del *C. immitis Pipkini* per lunghe seriazioni di gocciole di natura lipidica, in vecchie culture in semianaerobiosi.

Un tipico ceppo degradato è quello isolato dal CASTELLANI e descritto come *Glenospora meteuropea*. Di questa specie esistono due ceppi, uno dei quali

è stato isolato a Napoli dalla regione glutea di una paziente in cui si era sviluppato un granuloma; l'altro ceppo fu isolato dal CASTELLANI stesso da un caso di granuloma cutaneo in un paziente di Londra che aveva però contratto la malattia nei Balcani. Il primo ceppo (ceppo italiano) risultò essere effettivamente un ceppo degradato di *C. immitis*, e per esso in due pubblicazioni precedenti (1934 *a*, 1934 *b*) abbiamo creato la varietà *metacuropacus* del *C. immitis*. Il ceppo dei Balcani non è un *C. immitis*.

Il ciclo vitale in *Coccidioides* è stato messo in chiaro, anche se non completamente, sin dal 1905, epoca in cui l'OPHÜLS pubblicava le sue osservazioni su *Coccidioides immitis* in comparazione con quelle sul *Blastomyces dermatitidis*. Il carattere che egli mise in rilievo è che i *Coccidioides*, nei tessuti animali viventi, producono, per clivaggio del protoplasma, delle endospore e mai forme gemmanti, mentre in cultura i corpi sferici germinano producendo un micelio settato, senza endosporulare. Queste osservazioni sono state confermate varie volte; tra i numerosi investigatori che hanno più a fondo indagato la morfologia del fungo si deve citare nel 1904 il WOLBACH, nel 1913 MAC NEAL e TAYLOR, e quindi noi stessi.

Uno di noi ha riassunto il doppio ciclo di *Coccidioides* con il seguente schema:



in cui le clamidospore sono considerate come spore quiescenti o ipnospore. Gli stessi reperti sono stati riconfermati molto recentemente anche da altri investigatori tra cui citeremo DA FONSECA (1928), ALMEIDA (1933), ecc.

Ma vi sono anche molti altri autori che hanno negato una endosporulazione del fungo, benchè di tutti questi forse nessuno ha eseguito uno studio così completo come la maggior parte degli autori precedentemente citati. Senza perderci in un lungo elenco di affermazioni contraddittorie, vale la pena di esaminare brevemente quali possono essere state le ragioni per cui l'endosporulazione è stata negata:

1° il fungo è stato studiato soltanto in cultura; poichè in cultura e in condizioni ordinarie di aerobiosi non si producono endospore gli

studiosi che hanno lavorato sotto queste condizioni le hanno negate. Citeremo tra questi CASTELLANI (1928–33), AGOSTINI (1932), ecc. i quali pare non abbiano mai effettuato delle inoculazioni negli animali;

2° il fungo è stato studiato anche o solamente nei tessuti dell'uomo o degli animali inoculati con le culture; poichè in certi casi, per speciali condizioni intrinseche dell'ospite o dell'agente, possono aversi solo rarissimi zoosporangi, è probabile che per ciò sia stata negata dai ricercatori l'attività endosporulante nei tessuti animali viventi;

3° il concetto generale che la quasi totalità dei funghi parassiti dei tessuti animali viventi si presenti, nella vita parassitaria, in forme

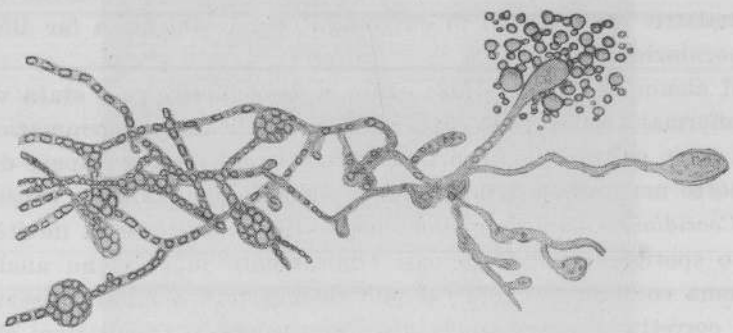


Fig. 3. – Metamorfosi lipidica del contenuto cellulare di ife miceliche del *C. immitis Pipkini* in vecchie culture in semianaerobiosi e fuoriuscita delle gocciole lipidiche dalle estremità ingrossate delle ife, simulanti fuoriuscita di spore.

assolutamente degradate rispetto alla cultura e quindi meno che mai in forme evolutive superiori a quelle offerte dalle ordinarie culture, lasciava incerti e restii molti ricercatori ad ammettere che proprio nei tessuti animali viventi queste specie potessero presentare uno stadio del ciclo vitale rappresentato da endosporulazione. Così, per esempio, l'osservazione che forme parassitarie sofferenti od in via di distruzione presentavano e presentano, per molte specie fungine, un contenuto di gocciole oleose dovute probabilmente ad una metamorfosi lipidica del protoplasma, può aver indotto un osservatore superficiale e che non avesse curato una fissazione ed una colorazione differenziale adeguata, ad identificare le vere endospore con queste formazioni regressive (figg. 2 e 3);

4° la confusione, spesso verificatasi da parte di osservatori medici, tra casi di vero granuloma da *Coccidioides immitis* e granulomi anatomo-clinicamente simili, ma sostenuti da specie mai endosporulanti (granuloma paracoccidioide, dermatiti verrucose micosiche in senso lato con localizzazioni viscerali, micosi europee del tipo BUSSE–BUSCHKE, ecc.). Probabilmente pure la confusione sui singoli ceppi isolati, la cui morfologia

saprositaria non aveva caratteri definitivamente differenziali, può aver portato a negare la formazione di endospore.

Che vi sia endosporulazione nei tessuti, dopo tutta la serie di osservazioni effettuate dai vari sperimentatori e da noi stessi, è un fatto innegabile. Dobbiamo rilevare che, dal momento che per un periodo più o meno lungo di vita saprositaria artificiale, ceppi di *Coccidioides immitis*, influenzati anche da varie condizioni ambientali non bene precisate, possono degradarsi fino a mostrarsi biologicamente e morfologicamente variati nei riguardi delle formazioni endogene nei tessuti animali, non potrebbe essere improbabile (sebbene per ora non vi sieno reperti sperimentali assoluti in questo senso) che gli stessi ceppi possono indurre delle malattie sperimentali in cui venga completamente a far difetto la endosporulazione.

Ad alcune di queste stesse cause si deve inoltre se è stata volta a volta affermata o negata la capacità di moltiplicarsi per gemmazione nei tessuti od in cultura: il tipico *Coccidioides immitis* non è capace di gemmare sotto nessuna condizione, ma è possibile che sia stato considerato come *Coccidioides immitis* qualche ceppo di *Gilchristia* o di lieviti asporigeni o sporigeni isolati da casi clinicamente più o meno analoghi al granuloma coccidioide. Forse si può riconnettere a queste osservazioni la non corretta interpretazione delle verrucosità o spinulazioni che talvolta sono presenti nelle cellule madri endosporulanti.

La presenza delle echinulazioni e delle spinulazioni dello sporangio non è un fatto assolutamente costante ed è certamente in dipendenza di tanti e vari fattori, sopratutto ambientali, come recettività e reattività del tessuto parassitato, che fanno sì che le spinulazioni possono essere ora rare, piuttosto grosse, evidenti, distanziate, ora sottilissime, numerose, disposte a raggiera stipatissima, ed ora fare difetto. Nessuno degli elementi morfologici in cultura presenta mai una spinulazione.

Altre configurazioni morfologiche che possono apparire in cultura sono le artrospore e le pseudoartrospore: a questo proposito vi sono state parecchie affermazioni contradditorie tendenti a negare o ad ammettere la presenza di alcune di queste forme ed anche una loro maggiore o minore dominanza riguardo alle clamidospore. Come risulta bene dalle nostre osservazioni, vi è tutta una serie di transizioni che vanno da ceppi che producono solo delle tipiche clamidospore in cultura a quelli che producono delle artrospore con numerosissimi stati di passaggio tra le une e le altre forme di tallospore e con casi in cui l'ascrivere questi elementi all'uno od all'altro tipo morfologico diventa una questione di interpretazione soggettiva. Inoltre per uno stesso ceppo si possono avere delle tallospore dell'uno o dell'altro tipo a secondo dei terreni di cultura e delle condizioni sotto cui furono coltivati; variano quindi in relazione anche i rapporti di frequenza delle varie forme. Così, per esempio, nei

ceppi normali di *Coccidioides*, in condizioni ordinarie di vita aerobia, si ha una maggiore o minore quantità di clamidospore ben tipiche, ed in vecchie culture o in ceppi meno tipici, delle forme che abbiamo chiamato

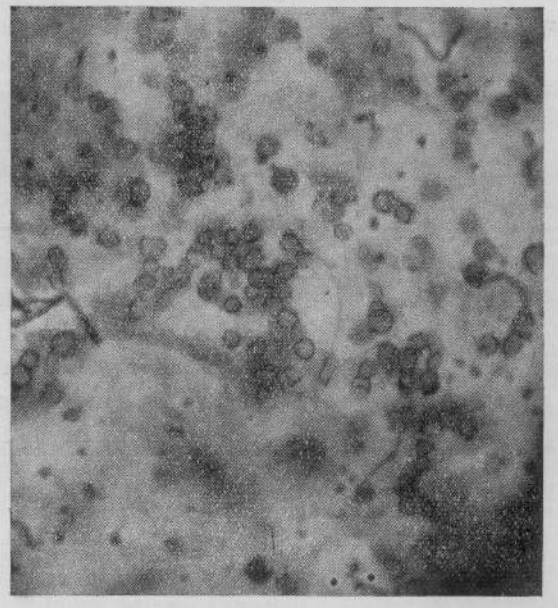


Fig. 4. – Artrospore di forma poliedrica od irregolare, formatesi nelle ife di *C. immitis* «ceppo AGOSTINI» in vecchie culture in semianaerobiosi.

pseudoartrospore e che sono di solito costituite da catenelle di elementi grossolanamente di forma quadrangolare, di solito interrotte da segmenti miceliali e che raramente o mai si isolano alla maniera di vere artrospore. In ceppi ancora più atipici, e specialmente se sotto condizioni particolari di vita (ed a questo proposito si è rilevato un metodo eccellente quello della cultura in condizioni di vita semianaerobiotica dell'età di tre o quattro mesi), come pure spesso in culture in goccia pendente, si formano delle vere artrospore in catene brevi ma continue (cioè senza alternanze con segmenti di micelio) capaci di isolarsi, che se non sono le più tipiche espressioni delle artrospore quali si vedono nei veri *Geotrichum*, sono, ciononostante, ben distinte dalle clamidospore ordinarie. Accanto a queste vi sono, in minori o maggiori quantità, delle pseudoartrospore e delle clamidospore apicali od intercalari (figg. 4, 5 e 6).

È ben difficile interpretare correttamente il significato di queste forme di tallospore, come in generale il finalismo e le cause determinanti di ognuna delle forme di moltiplicazione vegetativa dei funghi. Dall'insieme dei fatti osservati, si dovrebbe trarre la deduzione che esse rappresentano

espressioni di stati di sofferenza del fungo rispetto alle condizioni di normale cultura.

Altri aspetti della morfologia di *Coccidioides immitis* in cultura è la formazione di clave o racchette lungo il decorso delle ife, e che non rappresentano degli aspetti di moltiplicazione ma degli organi a funzione ignota, forse riserva di materiali nutritizi.

Il micelio, che di solito è ialino, settato, più o meno intensamente ramificato, può essere di calibro molto sottile (ed è questo l'aspetto normale delle culture giovani sugli ordinari substrati di cultura in condizioni aerobiche), ma può anche essere più o meno notevolmente ingrossato con l'alternanza di segmenti di micelio normali e di micelio anomalo. Sotto condizioni di cultura particolarmente sfavorevoli, come nelle colonie di fondo in mezzi liquidi contenuti in tubi di saggio, non si forma altro che un finissimo micelio scarsamente ramoso (fig. 1).

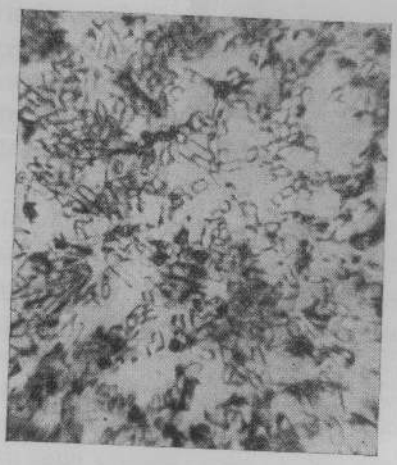


Fig. 5. – Formazione di false e vere artrospore in vecchie culture in goccia pendente di acqua peptoglucosata da parte del *C. immitis* «ceppo WEIDMAN» N. 1136.

Un maggior complesso morfologico si è avuto nel «ceppo WEIDMAN» N. 2322 che sotto certe condizioni di cultura, ha mostrato un ricco e svariato complesso morfologico di clamidospore apicali ed intercalari, il che ha fatto sì che altri ceppi di *Coccidioides immitis*, diversi da questo, ma presentanti lo stesso quadro complessivo, sieno stati da OTA definiti come specie del genere *Scopulariopsis*. Secondo la nostra opinione, se è vero che l'aspetto generale del fungo sotto queste condizioni si allontana abbastanza da quello dei tipici ceppi di *Coccidioides immitis* (tanto che in base anche ad una serie di variazioni correlate nei caratteri culturali, biochimici, e biologici lo abbiamo distinto come varietà o sottospecie di *Coccidioides immitis*) è pur vero che non rappresenta altro se non un caso estremo di complessità morfologiche, per forma e disposizione delle clamidospore intercalari ed apicali. Che si tratti di un complesso morfologico acquisito in condizioni di cultura od in ambiente a noi ignote è mostrato dal fatto che mentre in mano di OTA (1918) e di OTA e KAWATSURE (1933) due dei ceppi del dott. WEIDMAN da noi pure studiati (N. 1136 e N. 1234) hanno dato il complesso morfologico che gli autori giapponesi assimilano a *Scopulariopsis*, in mano nostra esso è mancato completamente, mentre l'origine dei ceppi è stata la stessa e mentre un eguale complesso è stato da noi rilevato per il

« ceppo WEIDMAN » N. 2322. È un vero peccato che OTA e KAWATSURE non abbiano studiato questo ultimo ceppo poichè sarebbe stato interessante notare le eventuali divergenze colle nostre osservazioni. Dei rapporti tra il genere *Scopulariopsis* ed il genere *Coccidioides* e delle deduzioni relative alla classificazione di questi funghi si è già parlato.

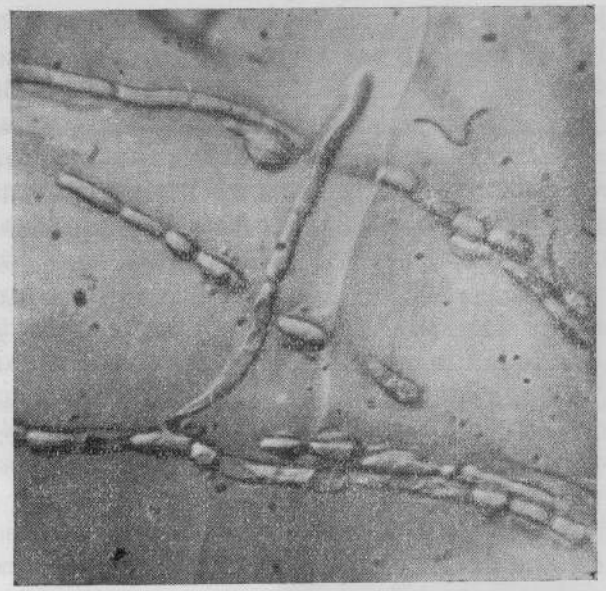


Fig. 6. – Pseudoartrosporulazioni del *C. immitis* « ceppo AGOSTINI », per segmentazione del contenuto cellulare delle ife, visibili in vecchie culture su normale terreno di laboratorio.

Abbiamo detto che è stato quasi universalmente ritenuto che le endospore si formino solamente nella compagine dei tessuti animali viventi; l'OPHÜLS che nella sua nota preliminare pubblicata nel 1900 insieme a MOFFIT asseriva aver visto dei « corpi protozoiformi » del tipo di quelli dei tessuti, anche in goccia pendente, li negò nell'ulteriore studio del 1905.

MACNEAL e TAYLOR, nel 1913, confermano che alcune delle clamidospore assomigliano ai corpi endosporulanti nei tessuti ma non possono essere assimilati con essi; probabilmente a questa stessa confusione si devono riferire le endosporulazioni osservate su substrati all'agar da WOLBACH nel 1904, da AHLPHELDT nel 1929 e che parrebbero essere state osservate anche da MOORE nel 1932. Le prime osservazioni attendibili di produzione di cellule endosporulanti sotto condizione di vita artificiale e fuori dagli organismi animali si debbano al MAC NEAL e TAYLOR, osservazioni che erano restate sino ad oggi non confermate.

Questi due autori coltivano il fungo in liquido ascitico e con siero di cavallo gelatinizzato; nel fondo dei tubi veniva messo un pezzo di tessuto animale sterile, di solito un pezzo di rene di coniglio. Nella serie dei tubi tenuti in aerobiosi si ebbe uno sviluppo normale con formazione di ife e di clamidospore; in quelli tenuti in anaerobiosi mancò completamente il micelio, mentre le ipnospore si accrebbero formando delle endospore: le figure riportate dall'autore sono inequivocabili.

Nel 1930 uno di noi (REDAELLI) pubblicò risultati negativi di esperimenti condotti con la tecnica di MACNEAL e TAYLOR e con il « ceppo CASTELLANI ». Una nuova serie eseguita con il « ceppo MOORE » di *Coccidioides immitis* ci ha permesso invece di riconfermare gli stessi reperti.

Come materiale di semina ci siamo serviti di culture di *C. immitis* « ceppo MOORE » in agar glucosato (Difco) perfettamente sviluppate dopo 15 giorni in stufa a 37° C. Inoltre abbiamo seminato anche del materiale patologico, vale a dire materiale di pus denso, caseoso, di un focolaio granulomatoso sottocutaneo della cavia, dopo 12 giorni dalla inoculazione con lo stesso ceppo.

Come terreni di cultura abbiamo usato:

1° brodo glucosato (Difco) + siero di coniglio normale;
2° brodo glucosato (Difco) + siero - ascite (uomo);
3° liquido di LOECKE + siero di coniglio normale;
4° liquido di LOECKE + siero - ascite;
5° liquido di LOECKE agarizzato al 4 per mille;
6° siero-ascite gelatinizzato al 6 %.

I tubi seminati tanto con il materiale proveniente della cultura, come quelli con il pus del granuloma della cavia, sono stati posti in condizioni di anaerobiosi (realizzata in barattoli con acido pirogallico e potassa caustica al 40 %) e conservati per un mese a temperatura di 30° C.

Esaminati dopo tale periodo i tubi non presentavano modificazioni macroscopiche nel senso che non apparivano vegetazioni fungine nè modificazioni del substrato; solamente i tubi di liquido di LOECKE agarizzato al 4 per mille sembrava presentassero, attorno al materiale fungino seminato, un alone simile a quello determinato da una sottile vegetazione miceliare.

È stato studiato sistematicamente tutto il materiale seminato e che appariva, come quantità e qualità, immodificato al fondo delle provette.

Reperti di un interesse particolare si sono avuti solamente nei tubi di liquido LOECKE + siero di coniglio o siero - ascite seminati con il materiale patologico del focolaio purulento della cavia. Il materiale portato su vetrino e schiacciato sotto uno strato di gelatina fenolizzata con coprioggetti e lutato in modo che si potessero conservare perennemente, ha mostrato i reperti interessanti che sotto riportiamo.

Il materiale degli altri tubi non ha mostrato fatti degni di nota; in genere il pus seminato si è conservato bene in tutti i suoi elementi; gli elementi fungini parassitari non appaiono sostanzialmente modificati.

Nei tubi seminati con materiale culturale, non si è avuto sviluppo alcuno; degli elementi fungini, anzi, presentano segni di degenerazione per la comparsa di numerose goccioline rifrangenti nei segmenti miceliari.

La nostra attenzione pertanto è stata portata solamente sul materiale patologico che, seminato nei tubi con liquido LOECKE + siero di coniglio o liquido ascitico, ha dato i reperti positivi; ma innanzi tutto dobbiamo dire che il pus si è ottimamente conservato in tutti i suoi elementi, almeno per quello che lo lascia supporre il semplice esame a fresco e in gelatina.

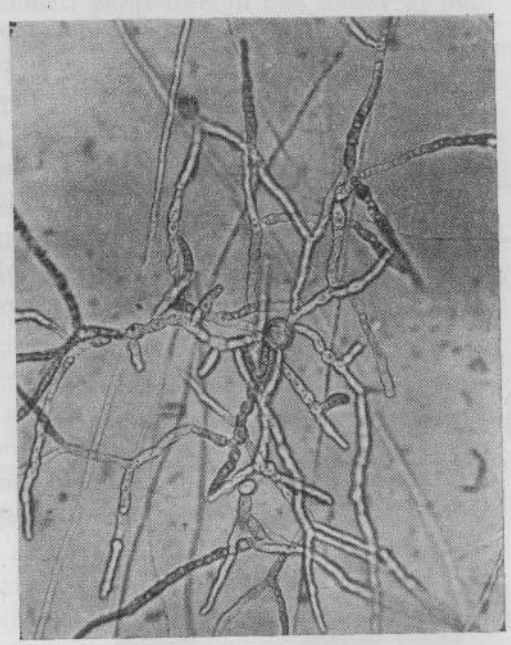


Fig. 7. – Germinazione di una zoospora del *C. immitis* «ceppo WEIDMAN» N. 1136, proveniente da pus di granuloma sperimentale di cavia e trasportata in acqua peptoglucosata.

In questo pus si nota una grande quantità di elementi sferici o sferoidei, più raramente subovoidi, con doppio contorno bene evidente, raramente meno evidente, a contenuto protoplasmatico uniformemente distribuito e chiaro sino a parzialmente plasmolizzato o guttulato. La retrazione del protoplasma è di solito solo parziale, anzi più spesso limitata solamente ad una porzione della periferia, quasi che le cellule fossero immerse in un liquido ipertonico.

In tal caso si forma un anello parzialmente vuoto tra la superficie interna dell'endosporio ed il limite periferico del protoplasma; ma talvolta può essere che la retrazione sia maggiore, ed in questo caso si hanno dei vuoti a forma semilunare, od anche la separazione netta della cellula in due emisferi, uno con protoplasma concentrato ed uno vuoto; le misure di questi elementi oscillano tra i 20 ed i 35 μ, più spesso dai 20 ai 30; in qualche raro caso la retrazione è così forte che interessa non solamente una gran parte del protoplasma, ma interessa anche l'episporio riducendosi in tal modo la spora ad un involucro vuoto deformato, come fosse una palla di gomma elastica perforata (fig. 8).

Elementi gemmanti mancano assolutamente. Qualche clamidospora riesce ad emettere un breve tubulo germinativo, lungo dieci volte il suo diametro o meno, che si ramifica precocemente ma scarsamente; queste germinazioni in ife miceliche non sono molto rare, ma sembrano grossolanamente differenziate. Il protoplasma d'esse è frequentemente guttulato o inegualmente distribuito.

Oltre a ciò sono presenti, ma molto più rare e quasi eccezionali, delle vere cellule endosporulanti: esse non si differenziano da quelle dei ceppi meno virulenti e più atipici di *Coccidioides immitis* nei tessuti degli animali inoculati, come, per esempio, il ceppo *Blastomycoides meteuropeus* Castellani, per quello che si riferisce, non al numero ed alla forma delle endospore, nè alle caratteristiche del sacco materno (che di solito è finemente ma densamente spinulato), ma per le dimensioni di questi elementi. Il numero delle endospore è assai variabile ma pare piuttosto basso. Le cellule endosporulanti hanno un diametro variabile da 27 a 31 μ; le endo-

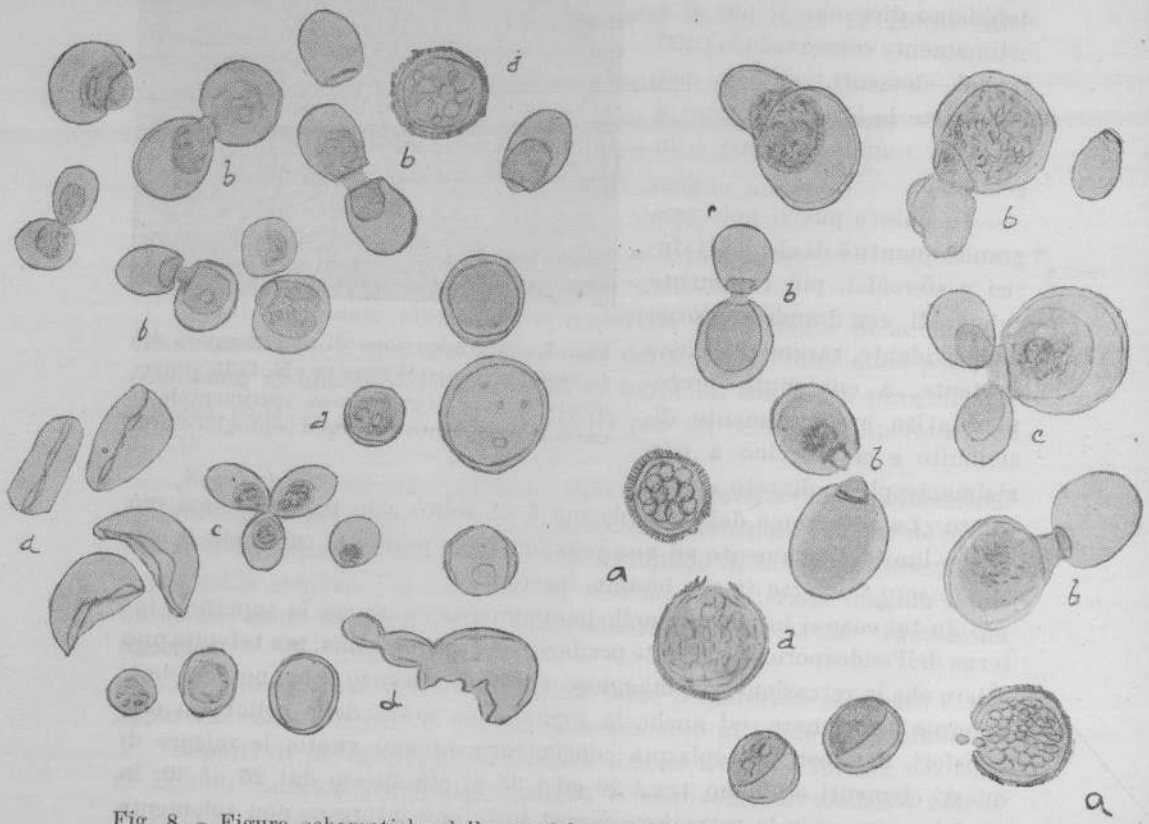


Fig. 8. – Figure schematiche della morfologia degli elementi fungini in cultura in liquido di LOECKE modificato, in anaerobiosi, a temperatura ambiente: *a*) zoosporangi contenenti zoospore; *b*) coniugazione normale di due zoospore; *c*) tentativi di coniugazione tripla; *d*) forme involutive. *Coccidioides immitis* «ceppo MOORE».

spore hanno dimensioni assai variabili a secondo del loro stadio di sviluppo; a maturità raggiungono i 7–9 μ di diametro.

Che sotto queste condizioni di cultura vi sia un aumento numerico di tutti gli elementi del fungo (cellule semplici e cellule endosporulanti) è stato accertato sulla base di una comparazione eseguita con lo studio numerico approssimativo degli elementi parassitari in una massa di pus coltivato nelle condizioni suddette ed una massa analoga dello stesso granuloma, ma non seminato. Si può affermare che il numero degli elementi fungini della cultura eccede di quasi il decuplo il numero degli elementi osservati nel pus fresco.

Abbiamo anche una maniera indiretta di accertare che gli sporangi osservati in cultura sotto le condizioni specificate in precedenza, sono delle neoformazioni e non preesistevano nel pus di semina, in quanto le dimensioni dei sacchi sporiferi sono molto differenti: mentre quelli del pus fresco e delle sezioni del granuloma misurano di solito da 60 a 70 μ di diametro ed anche più, gli sporangi maturi nelle culture anaerobiotiche non eccedono i 30 μ circa. Degli sporangi maturi così piccoli non sono mai stati osservati per nessuno dei ceppi da noi studiati.

Come rappresentanti delle forme di cellule endosporifere preesistenti alla cultura in anaerobiosi e formatesi del pus della lesione, si osservano le numerose capsule vuote, grandi e piccole, spesso con superficie esterna spinulosa e frequentemente anche zigrinate o raggrinzite che mostrano le dimensioni degli sporangi formati in vivo. Le cellule che mostrano il tubulo germinativo sono quelle più piccole (6–8 μ di diametro) ed è possibile che esse sieno le endospore liberatesi dai sacchi materni.

Questi reperti positivi di endosporulazione *in vitro* non possono essere in nessun modo confusi con le pseudoendosporulazioni che abbiamo osservato in altri ceppi ed assai manifestamente nel « ceppo WEIDMAN » N. 2322, coltivato in terreno LOECKE agarizzato al 4 per mille, con siero di cavallo ed in goccia pendente, per tre mesi. In questo caso può formarsi una serie di goccioline di solito dissimili come dimensioni, ma perfettamente sferiche e del tutto rifrangenti, che formano una catena discontinua, ma per piccoli intervalli anche continua nelle ife e si agglomerano nelle clamidospore intercalari od apicali assumendo degli aspetti che possono trarre in inganno l'osservatore non addestrato. Specialmente nel caso delle clamidospore apicali ed intercalari l'aspetto di esse ricorda molto suggestivamente le endosporulazioni osservate *in vitro* e col metodo MACNEAL e TAYLOR. Inoltre alla periferia delle clamidospore apicali e tutto intorno ad esse vi possono essere degli aggregati di gocciole sferiche che simulano una fuoriuscita di endospore dal sacco materno. Il reperto non può essere dubbio: si tratta di gocciole di natura lipidica che si differenziano facilmente dalle vere endospore sia con l'aiuto di colorazione (diventano rosse col Sudan III), che di reattivi (si sciolgono nei solventi

dei grassi e specialmente in cloroformio), che per il fatto che le gocciole posseggono una rifrangenza molto maggiore che le endospore, ed il loro stato fisico-chimico è distinto dallo stato solido dalle endospore anche solo per l'osservazione ripetuta fuocheggiando.

Nelle culture in terreno LOECKE semisolido in tubi di saggio le gocciole lipidiche sono assai più scarse che in goccia pendente e mostrano bene come la guttulosità si debba ad una regressione del contenuto protoplasmatico per senescenza o per cause ambientali sfavorevoli. Infatti le guttule sono localizzate per lo più nella porzione più vecchia delle ife e nelle più vecchie clamidospore; le porzioni apicali, cioè quelle più giovani ed in crescenza, hanno il protoplasma che apparisce quasi normale, e tra i due vi sono delle zone di transizione a contenuto plasmatico offuscato senza essere chiaramente guttulato.

Fig. 9. – Coniugazione di due zoospore in liquido LOECKE modificato ed in anaerobiosi (in basso); zoospora quiesciente sotto le stesse condizioni (in alto). *Coccidioides immitis* « ceppo MOORE ».

Abbiamo voluto insistere su questa possibilità di errore poichè essa può spiegare i reperti di endosporulazione su agar precedentemente citati.

***

Di gran lunga più interessante di tutti i fenomeni sin qui esposti, è un altro, che non ci risulta sia stato mai osservato da nessuno dei molti autori che si sono occupati di *Coccidioides*: il fatto che le cellule del fungo coltivate sotto condizioni di anaerobiosi con la tecnica di MACNEAL e TAYLOR e provenienti da materiale patologico della cavia inoculata (*Coc-*

cidioides immitis « ceppo MOORE »), hanno presentato dei fenomeni di coniugazione. Su materiale coltivato sotto le stesse condizioni ma provenienti da culture in agar glucosato, non si sono ottenuti nè sporangi nè coniugazioni, anzi non si è avuto alcun sviluppo del fungo seminato.

Le cellule che si coniugano (gameti) non sono dissimili, apparentemente, dalle cellule che più comunemente si trovano in cultura sotto le dette condizioni; sono elementi di forma sferoidale od ovoidale sino a subellissoidea. Esse sono di solito un poco più piccole degli sporangi ottenuti sotto le stesse condizioni, ma possono raggiungere anche le dimensioni di essi (da 20 a 25, raramente sino a 30–35 μ di diametro). Apparentemente non vi è nessuna modificazione morfologica nelle cellule che funzioneranno da gameti, ma esse sono leggermente modificate quando si trovano accoppiate a due a due: in questo caso esse appaiono leggermente depresse ed impicciolite nella zona di coniugazione, mentre il polo opposto è rotondeggiante e normale. Non siamo riusciti a sorprendere chiaramente gli stadi preliminari dell'accoppiamento, ma da alcune osservazioni isolate esso sembra avvenire con la seguente modalità: due cellule ravvicinate estrudono, ad uno dei poli, il loro endosporio che forma un piccolo rigonfiamento emergente dall'esosporio, a forma di gemmula. A questo stadio preliminare deve seguire la fusione dei due gameti per la saldatura delle gemmule; i gameti restano così riuniti per un breve ponte che di solito è nettamente differenziato dalla massa dei due gameti stessi per essere un breve e stretto istmo provvisto di una sottilissima membrana, mai duplice, che contrasta con la duplice, spessa membrana delle cellule in coniugazione, mentre è ben visibile a causa del protoplasma piuttosto denso, spesso finemente granuloso, abbastanza omogeneo, che riunisce le due masse protoplasmatiche principali restanti nel corpo dei due gameti affrontati. Non siamo stati capaci di

Fig. 10. – Due zoospore in coniugazione: *Coccidioides immitis*, « ceppo MOORE » in cultura anaerobiotica in liquido di LOECKE modificato.

seguire il processo sino al termine: per ciò che ci è dato di osservare il contenuto protoplasmatico di uno dei gameti passa completamente nell'altro. Ciò è dimostrato dal fatto che alcune delle cellule in coniugazione apparivano del tutto vuote mentre l'altra era repleta di materiale plasmatico. Lo zigote in tale maniera formatosi non si differenzia apparentemente da uno dei gameti prima della coniugazione (figg. 8–10 e tav. VII).

Disgraziatamente non ci è dato conoscere l'ulteriore evoluzione dello zigote ed in particolare se esso si trasforma in sporangio quiescente e quindi in sporangio attivo producente endospore. Questa ipotesi parrebbe essere la più probabile, ma manchiamo di una conferma da diretta osservazione, difficile in quanto, come si è detto, manca ogni differenziazione morfologica tra i gameti prima della copulazione e lo zigote.

Un fenomeno interessante è quello della coniugazione tripla, molto più raro del precedente, ma in qualche caso almeno apparentemente indubbio: invece che per due cellule, la copula avviene per tre cellule di cui di solito una più grossa e del tutto repleta del plasma e le altre due più piccole, semivuote o vuote. Che in qualche caso il fenomeno della coniugazione multipla sia soltanto apparente è fuori dubbio: esso si deve alla casuale sovrapposizione di una cellula non in coniugazione a due elementi in copula. Ma questo fatto può essere messo in chiaro osservando, a fuochi di profondità differente, i contorni delle singole cellule e la continuità del ponte di copulazione soltanto per due di esse. In qualche caso i ponti di copulazione sono distinti sia in quanto non convergono nello stesso punto, sia in quanto si trovano a livelli differenti e quindi sono individuabili singolarmente. Questa forma di coniugazione multipla offre naturalmente un maggior campo a possibilità di piccole modificazioni nella modalità con cui l'atto si effettua, ma fondamentalmente esso non differisce da quello della coniugazione a due gameti (fig. 8).

Disgraziatamente l'esiguità del materiale e il reperto ottenuto solamente in due dei tubi di saggio seminati, non ha permesso il fissaggio e le colorazioni elettive per lo studio dei fenomeni cariologici che solo avrebbero permesso una esatta interpretazione del fenomeno osservato, onde è che abbiamo espresso sino ad ora il fenomeno in termini cariologici pur senza avere altro che la presunzione che i nuclei prendano parte al processo di coniugazione. Non è d'altra parte escluso che si possa trattare di un semplice fenomeno di plasmogamia senza cariogamia, possibile residuo di una sessualità completa della quale il fenomeno osservato non sarebbe che una ultima traccia.

Esempi di questo genere non mancano per diversi gruppi di funghi tra cui per Ficomiceti e per Saccaromiceti (in senso lato).

Qualora lo studio potrà ripetersi in condizioni di ottenere una molto maggior copia di materiale che permetta i necessari studi citologici, il fenomeno potrà essere completamente chiarito. Volendo riassumerlo

in termini che implicano una vera funzione sessuale possiamo dire che: due gameti non motili (aplanetici), non differenziati in nessun modo tra di loro, ma qualche volta di dimensioni leggermente differenti, si coniugano per copulazione aplanogamica ed isogama od eterogama. Lo zigote è aplanetico (aplanozigote) e resta allo stato di spora quiescente, probabilmente di sporangio quiescente.

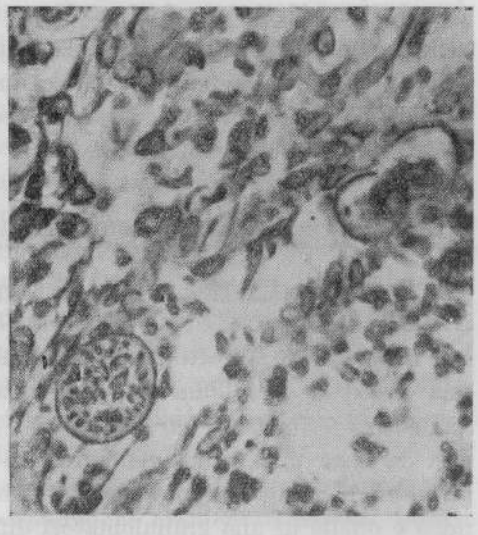


Fig. 11. – Zoosporangi in tessuto granulomatoso della malattia sperimentale della cavia. In basso a sinistra: fase pienamente cenocitica con differenziazione completa dei nuclei avanti la formazione delle zoospore. In alto a destra: ravvicinamento di due zoospore mononucleate con spostamento del nucleo e del citoplasma perinucleare simile ad una coniugazione.

Nei tessuti patologici degli animali inoculati (pus della parte centrale del granuloma, zona periferica, produttiva, iperplastica dei granulomi stessi) non abbiamo mai osservato dei fatti morfologici che ci abbiano obbligati ad ammettere senza possibilità di dubbio una coniugazione di gameti; però abbiamo talvolta osservato delle figure che ci hanno lasciato delle incertezze circa la natura del fenomeno. Così per il « ceppo WEIDMAN » N. 1136, nella porzione produttiva di un nodo granulomatoso dell'omento della cavia inoculata, si è osservata una figurazione molto suggestiva di due dameti in coniugazione: il ponte di copulazione non è ben distinto, ma la colorazione (ematossilina–eosina) mette in rilievo il plasma addensato verso il ponte di copulazione, meglio colorabile alla periferia che nella parte centrale, e due formazioni vescicolari con granulazioni ematossilinofile che potrebbero intepretarsi per nuclei ravvicinati. Di queste ne sono state osservate varie volte, il che fa pensare che anche nei tessuti animali viventi ove, si noti bene, le condizioni d'ambiente non sono molto differenti da quelle realizzate con il metodo MACNEAL e TAYLOR, possono avvenire delle coniugazioni.

Si potrebbe obbiettare che questo fenomeno non rappresenti una coniugazione ma una gemmazione. Non si nega che in certi casi estremi il fenomeno è mal definibile nei riguardi della assimilazione dell'una o dell'altra delle due modalità riproduttive, ma di solito la differenziazione è facile ed evidente, anche considerando non gli stadi preliminari del feno-

meno ma l'aspetto delle due cellule in copula. I due gameti sono infatti riuniti da un ponte che è molto più stretto del diametro delle cellule in copulazione; inoltre manca la differenziazione della membrana duplice ed evidentissima nei corpi dei gameti e che è semplice e sottilissima nel punto di coniugazione. Inoltre l'aspetto non ricorda in nessun modo le gemmazioni anche atipiche dei blastosporei, come non ricorda neppure le scissioni degli schizosporei; ha invece una grandissima ed immediatamente percettibile analogia con i fenomeni copulativi delle cellule dei Saccaromiceti capaci di questo fenomeno.

Caratteri parassitologici e patogenetici sperimentali.

Il « ceppo Castellani », il « ceppo Moore », i « ceppi Weidman » N. 1136, 1091, 1676, ed il *Geotrichum louisianoideum* Castellani, inoculati nella cavia, sia sotto cute come endoperitonealmente, hanno indotto una malattia granulomatosa che inizia circoscritta e tende progressivamente a diffondersi, per contiguità e per continuità, per la via linfatica, così da dare una forma generalizzata grave, che può portare a morte gli animali in un tempo variabile da uno a due mesi. Il quadro anatomico è quello di una granulomatosi diffusa, a focolai isolati o confluenti, che raggiungono il volume di un pisello o di una nocciola, con una parte centrale fluidificata, contenente generalmente un pus denso di aspetto quasi caseoso, giallastro, ed una porzione periferica reattiva, più o meno spessa ed evidente.

Al quindicesimo giorno circa, l'esame istologico di questi granulomi presenta il quadro tipico di un tessuto granulomatoso iperplastico, frequentissimamente (anzi quasi sempre) con reazione gigantocellulare e formazioni isolate o confluenti di tubercoli e di microascessi. In genere prevale la parte produttiva, però si possono avere anche delle grosse cavità ascessuali. Si trovano i caratteristici parassiti liberi o fagocitati da elementi istiocitari e da cellule giganti; si trovano i tipici zoosporangi, mentre mancano gli elementi miceliali (a meno che non ve ne sieno dei residuali dal materiale di inoculazione).

In genere la retrocultura del materiale patologico è positiva in ogni stadio della malattia, ed appare facile ad ottenersi.

Il ratto inoculato con le stesse modalità si presenta in genere più recettivo della cavia, se lo dobbiamo giudicare dalla entità della malattia sperimentale e dalla forma dell'infiammazione, nella quale prevalgono i fenomeni regressivi, degenerativi e necrotici su quelli produttivi.

I suddetti ceppi sono quindi bene infestanti e bene virulenti e li consideriamo *tipici* sotto questo punto di vista.

Il « ceppo Ciferri », il *Geotrichum immite* Agostini (derivato dal « ceppo Castellani ») il *Blastomycoides dermatitidis* Castellani e la *Gle-*

nospora meteuropea Castellani, trattati nella stessa maniera hanno dimostrato una minore virulenza e quindi una minore patogenicità: la malattia indotta, se nelle linee generali sintomatologiche ed istologiche non ha evidenti caratteri differenziali, si è però mantenuta circoscritta, limitata, senza grande tendenza a generalizzarsi ed anzi con una tendenza ad esaurirsi spontaneamente: il quadro istopatologico mostra una prevalenza dei fatti produttivi su quelli essudativi e regressivi, con una minore quantità di elementi fungini parassitari, mentre è scarsa la maturazione di zoosporangi (per quanto sempre presenti). Sopratutto le localizzazioni omentali tendono alla regressione spontanea, mentre le localizzazioni sottocutanee sembrano essere sempre le più attive.

Questi ceppi appaiono quindi lievemente degradati nelle loro attività biologiche rispetto ai ceppi tipici; tale fatto però non può assolutamente avere valore ai fini di una differenziazione specifica ed anche subspecifica, in quanto i detti ceppi, per i loro caratteri culturali, morfologici e biochimici, in nulla differiscono dai ceppi tipici. La minore attività di fronte agli animali da esperimento, più che per modificazioni e condizioni speciali della recettività di questi (i diversi esperimenti condotti con diversi animali ce lo attestano), crediamo possano essere in rapporto con un più o meno lungo periodo di variate condizioni ambientali di vita, legate forse, più che ad altro, ai substrati culturali nutritivi (il « ceppo CIFERRI » fu coltivato per lungo tempo ai tropici su terreni naturali, il « ceppo AGOSTINI » fu coltivato per lungo tempo in terreno POLLACCI molto ricco di carboidrati).

Il « ceppo WEIDMAN » N. 2322 ha avuto un comportamento biologico che, sotto certi punti di vista, merita di essere segnalato a parte; inoculato negli animali da esperimento nelle stesse condizioni degli altri ceppi, ha indotto una malattia grave (nella cavia) con tendenza alla generalizzazione e mortale per l'animale; in questo e dal punto di vista dell'aspetto macroscopico della lesione il ceppo non si comporta differentemente dai tipici *Coccidioides*; però il quadro istopatologico ha caratteristiche peculiari che non si possono solamente mettere in rapporto con la recettività di singoli animali; si ha un granuloma costituito da un conglomerato di microascessi nei quali la parte produttiva periferica è scarsissima e ridotta a poche barriere di elementi istiogeni; relativamente scarse sono le cellule giganti, mentre i parassiti, numerosi, si trovano nel centro dei microascessi ed hanno, anche per gli zoosporangi delle peculiarità che sono già state segnalate nella descrizione micromorfologica.

Questo comportamento se preso a sè non può avere elementi intrinseci sufficienti per indurci a tener distinto il ceppo dagli altri; unito ai rilievi culturali, morfologici e biologici che sono apparsi diversi, servirà per una individualizzazione del ceppo stesso almeno come varietà.

A conclusione dei rilievi per le attività biologiche dei ceppi di *Coccidioides* da noi effettuati, dobbiamo dire che essi sono, in linea generale, altamente patogeni per gli animali da laboratorio con la induzione di una granulomatosi che tende alla generalizzazione nell'organismo e nella quale si riscontrano i parassiti non diversamente che nelle lesioni umane spontanee; particolarmente interessante, ai fini diagnostici, è il fatto che vi sono reperibili gli zoosporangi.

A queste conclusioni generali, nei riguardi di un indirizzo essenzialmente diagnostico, erano giunte anche le osservazioni degli autori che ci hanno preceduto: la prova biologica a scopo diagnostico generico ed a scopo dello studio della malattia sperimentale, è stata eseguita fin dai primi studiosi della malattia dell'uomo, e si può dire che tutti coloro che da forme umane isolarono il parassita, lo provarono anche negli animali sempre con risultati positivi per i punti che noi abbiamo rilevato. Sembra che recettivi al *Coccidioides immitis*, oltre la cavia, il ratto, il topolino, siano anche il coniglio, il cane, la scimmia, ecc. Non è improbabile che lo siano anche tutti gli animali (gatto, vitello, ecc.) nei quali la forma morbosa è stata riscontrata come malattia spontanea.

In ultima analisi dobbiamo convenire che la prova biologica ha grande valore per la diagnostica generica del *Coccidioides immitis*, in quanto per la sua costanza di reperti, sopratutto per ciò che si riferisce alla sporogonia endogena, non altrimenti dimostrabile, fornisce il dato essenziale, indispensabile per la definizione sistematica del ceppo. Tutti i ceppi da noi studiati, alcuni conosciuti sotto nomi diversi, non mai identificati come *Coccidioides immitis*, si sono riconosciuti tali appunto in base alla prova biologica fondata sul caposaldo per il quale queste specie fungine solo in condizioni parassitarie animali formano costantemente il ciclo completo della loro maturazione sessuale fino al fenomeno della sporogonia endogena. È probabile che si possa giungere un giorno a trovare una formula culturale in vitro che realizzi facilmente le stesse fenomenologie: la via tracciata da MacNeal e Taylor e da noi riesperimentata con successo, sembra essere la via buona.

La stessa prova biologica, poi, ha anche valore per la diagnostica della forma morbosa umana; infatti la riproduzione della malattia sperimentale con materiale patologico o con le colture, può facilitare ed orientare direttamente il parassitologo verso la diagnosi di natura specifica.

La prova biologica infine, può con i suoi particolari anatomici e istopatologici, integrare tutti gli altri dati culturali e biochimici nella differenziazione di varietà, razze, ecc.

I FATTI CITOLOGICI E MORFOLOGICI AI FINI DELLA POSIZIONE SISTEMATICA DI COCCIDIOIDES.

Per la soluzione del problema della posizione sistematica del genere *Coccidioides* e delle sue affinità, è necessario anzitutto cercare di risolvere il problema se il sacco endosporulante deve essere intepretato come uno sporangio o come un'asco. Questo problema verrà trattato sotto un duplice punto di vista, morfologico (morfogenico) e citologico, tenendo in conto anche i fatti di sessualità che sono stati da noi messi in luce. Risolto questo primo punto, si passerà ad esaminare le diverse opinioni degli autori che in questo studio ci hanno preceduti, esaminandole criticamente alla luce dei fatti accertati e in accordo alle nostre conoscenze di micologia sistematica generale, traendone le necessarie conclusioni circa la posizione sistematica e le affinità.

La questione è stata dibattuta da vari autori, ma nessuno sino ad oggi ha cercato di sviscerare il problema anche dal punto di vista micologico, essendosi di solito contentati di emettere ipotesi, o vaghi accenni generali. L'esame critico si effettuerà sulla base delle idee già pubblicate da uno di noi (CIFERRI 1932), sviluppate ulteriormente in base alle nuove e più complete acquisizioni.

Sin da quando il fondamentale studio di WOLBACH (1904) mise esattamente in luce il ciclo del microorganismo, e quindi la sua natura fungina, si è tradizionalmente ritenuto la cisti sporogena essere un asco; ma, come mostra il frequente cambio di genere che esso ha dovuto soffrire, e la quasi generale orientazione verso *Oidium* e *Mycoderma* (vale a dire verso la classificazione in base alle forme *regredite* offerte in condizioni di vita saprositaria, cioè in cultura), si è preferito più spesso passare sotto silenzio od emettere delle vaghe ipotesi sulla natura del sacco sporifero e delle endospore.

Ciò anche, naturalmente, in vista delle ancora molto incomplete conoscenze intorno alla morfologia ed alla morfogenia del fungo. Non sfuggiva neppure, come è facile immaginare, la poca somiglianza tra i classici aschi ottospori degli Ascomiceti, e la multisporità dei presunti aschi di *Coccidioides*. Ma ci si contentava di richiamare e citare una vaga rassomiglianza con gli Endomycetales in genere, e più particolarmente colle Dipodascaceae e colle Endomycetaceae.

Non è forse estranea a questa difficoltà d'interpretazione delle endospore formate *in vivo* il tentativo di ignorarle, e quindi basare la posizione sistematica del fungo solo sulla morfologia schematica e rudimentale offerta nelle culture in terreni artificiali, tanto più che si poteva concepire male il comportamento anomalo tra tutti gli altri miceti patogeni per

l'uomo e gli animali (salvo *Rhinosporidium*, *Paracoccidioides* e forse qualche Saccaromicete) di *Coccidioides*, che sporificava nei tessuti ed aveva una morfologia rudimentale in cultura, contrariamente alla quasi totalità degli altri funghi interessanti la micologia umana. Da questo la definizione di *Coccidioides* come *Oidium*, *Mycoderma*, *Geotrichum*, ecc.

A quanto pare il primo che abbia affacciato l'idea che il sacco sporifero poteva essere uno sporangio è stato LANGERON (1922), ma come pura ipotesi non appoggiata da alcuna prova, ravvicinando il fungo ai Ficomiceti–Chytridiales. Ma a quello che ci consta, gli autori che successivamente si sono occupati di questo argomento, hanno preferito ravvicinare il fungo ai Protomycetales, un gruppo che, in sè, è abbastanza ben definito e delimitato, ma che, malgrado parecchi studi, ha una posizione sistematica che è quasi tanto incerta quanto quella di *Coccidioides*.

Di questa questione uno di noi (CIFERRI, 1932) si è già occupato in precedenza, e sarà inutile ritornarvi sopra. Di questa opinione sono stati DA FONSECA e DE AREA LEÃO (1927–1928), DA FONSECA (1928), BRUMPT (1927), REDAELLI (1930), TIMPANO (1930), BASGAL (1931), ALMEIDA (1931, 1933), ecc.

CASTELLANI, in un primo tempo (1926, 1928, 1930) e VUILLEMIN (1931) assunsero un'attitudine del tutto particolare con l'inclusione di *Coccidioides* (e vari altri generi che con questo non hanno nulla che vedere) in generi o in gruppi « medici » vale a dire destituiti di ogni fondamento micologico, e dei quali si discuterà più oltre.

Quasi contemporaneamente ma isolatamente, MOORE (1931) e uno di noi (CIFERRI 1932) credettero opportuno non includere il genere *Coccidioides* in nessuna delle famiglie preesistenti, ma di creare una nuova famiglia da entrambi chiamata Coccidioidaceae.

Ma l'interpretazione della portata, del significato e della posizione sistematica della nuova famiglia fu totalmente differente. Per MOORE (1931) le affinità di *Coccidioides* sono pure verso gli Hemiascomycetes, e tra queste colle Endomycetaceae, le cui due serie sviluppate in *Eremascus* e *Endomyces* (in parte) possono passare da un evidente ma differente atto sessuale allo sviluppo partenogamico. Il MOORE conclude che il genere in questione deve essere posto negli Endomycetales ma che « avendo una relazione con gli Zygomycetes, da una parte, e una rassomiglianza ai Taphrinales e con i Protomycetaceae, dall'altra, *Coccidioides* costituisce una divisione comprendente le affinità di entrambi ». E prosegue: « Avendo parecchie delle sue caratteristiche delle Endomycetaceae ed altre delle Saccaromycetaceae Protomycetaceae, è necessario, in vista di questi fatti stabilire, una nuova famiglia, Coccidioidaceae, con *Coccidioides* come genere principale, e porre la famiglia in una posizione che segua le Endomycetaceae e preceda le Saccaromycetaceae ».

1. – *Prove sistematiche.*

Queste affermazioni meritano un esame un poco approfondito. L'idea fondamentale del MOORE è sempre quella di DA FONSECA e collaboratori, di REDAELLI, di ALMEIDA, ecc., e cioè delle affinità con le Protomycetaceae. Soltanto che, mentre questi ed altri autori si accontentano di solito di riavvicinare il genere *Coccidioides* alle Protomycetaceae (salvo ALMEIDA, 1931) facendone notare le differenze, che pur sono molte e bene evidenti, il MOORE, appunto in vista di queste, istituisce una nuova famiglia, che precedenti autori non avevano creato in vista delle altre dubbie affinità. Non discutiamo affatto qui il ravvicinamento alle Promycetaceae, di cui si è già parlato altrove da noi stessi; diremo invece due parole sulle affinità con gli Zygomicetes e coi Taphrinales, cui il MOORE accenna solo di sfuggita senza darne prova alcuna, come pure nell'affermazione delle analogie con la famiglia Saccharomycetaceae, e dell'ultima affermazione che la famiglia della Coccidioidaceae dovrà precedere le Saccharomycetaceae e seguire le Endomycetaceae.

Il gruppo degli Hemiascales (Hemiasci o Hemiascomiceti), nel senso di SCHRÖTER, comprendeva un raggruppamento molto eterogeneo che è stato largamente smembrato, ed i cui singoli componenti sono stati gradualmente sistemati negli ordini e nelle famiglie più differenti. Esso comprendeva originalmente, le famiglie Ascoideaceae, Monascaceae e Protomycetaceae, cui LINDAU aveva aggiunta pure una quarta famiglia (Thelebolaceae) poco avanti fondata da BREFELD.

La famiglia delle Thelebolaceae è monotipica, e il genere *Theleobolus* (*Thelebolus* o *Telebolus*), che oggi si situa vicino alle Ascobolaceae (Discomycetes) è nettamente distinto da *Coccidioides*: l'asco è sì multinucleato e polisporo, ma è un vero asco, originandosi da una cellula binucleata di un archicarpo spiralato, ed ha un vero corpo fruttifero, monoasco o pluriasco, come negli autentici Ascobolacei.

Della famiglia Monascaceae non vi è oggi più traccia; *Monascus*, in cui gli aschi sono solo apparentemente multispori (in quanto le pareti degli aschi cadono in deliquescenza, sicchè il corpo fruttifero pare contenere un unico asco polisporo), è affine alle Aspergillaceae (Eurotieae). Gli altri due generi compresi da SCHRÖTER, nella stessa famiglia Monascaceae (*Helicosporangium* e *Papulaspora*) hanno in comune solo gli organi vegetativi che HOBSON chiama « bulbilli », e che sono degli sclerozi prosenchimatici o plectenchimatici, e debbono riferirsi ai Mycelia sterilia (Agonomiceti).

Le Ascoideaceae, nella trattazione dello SCHRÖTER, includevano i generi *Dipodascus* Lagerheim e *Ascoidea* Brefeld, cui si aggiunsero poi

Oscarbrefeldia Holtermann e *Conidiascus* Holtermann, e, secondo FITZPATRICK (1930), *Pericystis* Betts. *Dipodascus*, un genere monotipico, è dei quattro il meglio studiato, per quanto non sia ancora del tutto conosciuto nella sua evoluzione cariologica, e che è stato lungamente discusso in base all'ipotesi di ATKINSON (1915) che questo genere rappresenti la forma più primitiva degli Ascomiceti, più ancora che le affini, ma già più evolute, forme fungine ascritte a *Eremascus* ed *Endomyces*. La sua maniera di riproduzione è complessa e strana; da una stessa ifa micelica si differenziano due rametti corti ed uncinati, e se ne isolano gli estremi, che morfologicamente sono identici, ed ugualmente multinucleati. Una delle due cellule funziona da ascogonio ed emette un filamento, mentre quella che funziona da anteridio non si modifica, ed avviene la copulazione. Segue una multipla scissione nucleare, e mentre i nuclei figli restano verso il centro della cellula, quelli soprannumerari tendono a portarsi verso l'estremo libero. Si delimitano allora le spore che fuoriescono in massa attraverso un poro dell'ascogonio allungato che funziona da asco. Per quanto questa maniera di riproduzione paia distinguersi da quella degli Ascomiceti più evoluti, vi sono delle caratteristiche in comune, a cominciare dallo stadio di dicarion e dalle analogie coll'asco plurinucleato di *Eremascus* ed *Endomyces*. Gli altri generi sono molto meno noti, e non ci interessa discuterne, anche perchè citologicamente molto meno studiati, o non noti affatto. Da tutto ciò, in ogni modo, appare ben chiaro che non si può parlare di rapporti o di similitudine con *Coccidioides*, la cui evoluzione morfologica è enormemente più semplice.

Della quarta famiglia, quella delle Protomycetaceae, si è già discusso in uno studio precedente, e non torna conto ripetersi; basterà qui notare solamente che uno dei fatti più salienti è la gemmazione per estrusione di un endosporio che forma il sacco in cui si versa il contenuto plastico della clamidospora multinucleata, sotto forma di spore uninucleate che possono copulare abbinate e formare o micelio o, per involuzione nutritizia delle forme gemmanti: le modalità variano poi a seconda che si esaminano i singoli generi *Protomyces*, *Protomycopsis* e *Taphridium*.

In tal modo ci pare dimostrato che, se si può parlare di affinità, in senso generico, con questi gruppi, tali affinità appaiono molto meno chiare, se non del tutto dubbie, appena si scenda ad un esame più approfondito della questione.

Un altro genere che si cita qualche volta come affine è *Coccidioides*, o quanto meno avente con lui dei rapporti, è il genere *Endogone* Link. Esso è così mal noto che non è ancora possibile fissargli una posizione sistematica, neppure in riferimento ai gruppi superiori alle classi. I rapporti con le Dipodascaceae in generale, e in particolare con *Dipodascus*, paiono indubbi; ciò nonostante, in questi ultimi anni, essi sono passati in seconda linea di fronte alle affinità con i Zygomiceti dell'ordine Muco-

rales; e più particolarmente con la famiglia delle Mortierellaceae, in seguito agli studi di THAXTER (1922), di WALKER (1923) ed altri, considerando il corpo fruttifero come una massa di zigospore, differenziata in maniera distinta dalle altre Mucoraceae, ma richiamante la fruttificazione zigosporica di *Mortierella*, da un lato, non meno che quella di un'Ascomicete, e dall'altro riattacandosi alle Piptocephalaceae. ATKINSON (1915) ha assunto una posizione intermedia considerando le Endogoneae come intermediarie tra i Protoasci (Protoascomycetes) e gli Zygomycetes, essendo quindi da considerarsi come uno dei punti di diramazione dei Ficomiceti verso gli Ascomiceti. Anche FITZPATRICK (1930) pare essere di questa opinione.

Le altre affinità citate da MOORE, a parte quelle degli Zygomycetes, e che dovrebbero essere quelle con le Endomycetaceae e quelle con le Saccharomycetaceae, non sono meglio specificate. Di queste non ci pare il caso di occuparci; avendo dovuto escludere le affinità con le forme meno evolute e più primitive, come le Dipodascaceae, da cui quelle sarebbero derivate, e con cui avrebbe dovuto il genere *Coccidioides* presentare maggiori affinità, è ovvio che esse debbono essere minori nei gruppi suddetti, assai più evoluti e meglio definiti; d'altra parte essi sono tanto ben noti, anche ai cultori di micologia medica, che siamo dispensati dal discorrerne. Ed è quindi gratuita l'affermazione che le Coccidioidaceae dovrebbero situarsi tra gli Endomycetacei e i Saccharomycetacei (e non si comprende neppure come potrebbero, formando esse una linea evolutiva ben delineata).

Da ciò si deduce che la creazione, da parte del MOORE, della famiglia Coccidioidaceae, pur essendo giustificatissima in sé, risponde più a dei criteri negativi che positivi, vale a dire alla necessità di sistemare *Coccidioides* in un gruppo a parte, non potendo essere inquadrato in nessuno degli altri conosciuti.

La questione della posizione sistematica di *Coccidioides* resta dunque sempre aperta, e bisogna ritornare alla domanda iniziale: il sacco madre in cui si generano le endospore è un'asco od uno sporangio ?

2. – *Prove morfologiche e morfogeniche.*

Per rispondere a questa domanda, è necessario esaminare anzitutto quali sono le differenze che intercorrono tra asco e sporangio, sulla scorta degli autori che si sono occupati di questo argomento, e principalmente di HARPER (1899), di SWINGLE (1903) e di FITZPATRICK (1930). Esse possono essere riassunte nella tabellina che segue, in cui sono state ordinate comparativamente e ampliate opportunamente:

Asco.	Sporangio.
1. Contiene (salvo pochissime eccezioni) un piccolo e definito numero di spore, di solito otto o una minore cifra multiplo di due.	1. Contiene un grande e indefinito numero di spore (rarissimamente uno o due sino ad otto).
2. Essenzialmente di origine sessuale, maturante per copulazioni di due nuclei, per cui per tre mitosi successive si formano otto nuclei.	2. Essenzialmente di origine agamica, da giovane mononucleato, per mitosi successive continue contenente molti nuclei.
3. Presenza di epiplasma nelle ascospore o di plasma cementante (citoplasma intersporale).	3. Assenza di epiplasma, malgrado la possibile presenza di mucosità dovuta ad una trasformazione non completamente riassorbita di protoplasma intersporale.
4. Spore differenziate tutte contemporaneamente.	4. Progressivo clivaggio del citoplasma per la differenziazione delle spore.
5. Deiscenza (salvo rarissime eccezioni) per disintegrazione del sacco materno, mai per un poro o tubo di uscita.	5. Deiscenza per disintegrazione del sacco materno o per un poro o due di uscita.

Cercando di applicare queste differenze alla risoluzione della questione se il sacco madre dei *Coccidioides* sia un asco o uno sporangio, e tralasciando la questione citologica che verrà trattata in un capitolo a parte, noi vediamo che, per il numero di spore, tenendo in conto la discussione intorno alle famiglie di Ascomiceti plurispori eseguita in precedenza, tale sacco madre è uno sporangio molto più che un asco. Tra le endospore manca un vero plasma interstiziale malgrado che, e specialmente se il sacco non ha spore completamente mature, vi sieno delle tracce di una sostanza mucilaginosa, molto irregolarmente distribuita (talvolta assente), che si colora molto irregolarmente con i colori base delle miscele coloranti comunemente usate nella differenziazione dei preparati istologici. Ma questa sostanza intersporale pare doversi meglio interpretare come del protoplasma residuato dalla lisi delle zoospore o come plasma in via di evoluzione verso le zoospore stesse, che come della vera sostanza interstiziale. Ciò si deduce anche dal fatto che si vedono talvolta delle plagule grandi come una o più spore con granulazioni ematossilinofile che dovrebbero interpretarsi come cromatina derivante da nuclei in lisi. Inoltre la divisione multipla ed irregolare del nucleo precede sempre l'inizio del clivaggio del protoplasma, sì che allo stadio terminale di divisione nucleare

il sacco materno è plurinucleato. La delimitazione delle spore non è poi contemporanea, ma in seno ad uno stesso sporangio avviene successivamente ed irregolarmente, sì che mentre alcune delle spore sono ben definite ed apparentemente complete, altre sono in formazione ed in altri punti il protoplasma è ancora indiviso. Anche per queste caratteristiche la cellula endosporulante partecipa delle caratteristiche dello sporangio e non di quelle dell'asco.

Tralasciamo di parlare dell'origine agamica o sessuata dell'asco o dello sporangio per il fatto che, se generalmente parlando, l'asco è di origine essenzialmente sessuata e lo sporangio è di origine agamica, vi sono molti esempi di produzione partenogamica di spore negli Ascomiceti ed, inversamente, di formazione di zoospore preceduta da fatti sessuali più o meno complicati.

Importante appare essere invece il quarto punto e cioè il fatto che, mentre negli Ascomiceti alla fine della terza ed ultima bipartizione dei nuclei dell'asco le spore si differenziano tutte contemporaneamente (cosicchè esse maturano tutte nello stesso tempo), nello sporangio il clivaggio del protoplasma è progressivo e di solito irregolare. In uno sporangio, specialmente quando esso sia osservato in uno stadio di non completa maturità, si possono riscontrare contemporaneamente delle zoospore mature, delle zoospore in via di maturazione, e delle zoospore in via di differenziazione. Ad uno stadio antecedente si scorgono ancora delle plagule di plasma indiviso.

Naturalmente queste osservazioni hanno un valore generale e non si possono applicare a tutti i casi particolari.

La differenziazione delle endospore nel sacco maturo di *Coccidioides* risponde completamente al tipo di clivaggio dello zoosporangio; anzi, le caratteristiche di questo sono ingigantite per il fatto che, dovendosi compiere tale differenziazione in un mezzo altamente ostile (quale è il tessuto animale vivo, validamente reagente al parassita), le irregolarità della successione spaziale e temporale dalla cariotomia alla plasmotomia sono ancora maggiori che nei funghi studiati in cultura *in vitro* o, comunque, nelle migliori condizioni in riguardo al mezzo ambiente. Tutto ciò riesce bene evidente in sezione di tessuti di cavia inoculata con culture virulente di *Coccidioides immitis*, colorate con ematossilina ferrica; ma la irregolarità del fenomeno plasmotomico in seno al sacco materno è evidente anche in sezioni colorate con ematossilina ed eosina.

Naturalmente è impossibile dare uno schema del fenomeno: tutti i casi sono egualmente possibili, da una cariotomia regolare seguita da un rapido clivaggio del plasma e da normale formazione di zoospore, all'aborto completo di queste ultime, cui di solito corrisponde una più o meno rapida e totale lisi dei nuclei. Di questo parleremo anche nella parte riguardante la cariologia dei *Coccidioides*.

In riguardo al quinto punto, poco vi è da osservare, in quanto, se la regola, negli Ascomiceti, è la deiscenza per disfacimento dell'asco materno, vi sono pure dei casi in cui l'asco è opercolato o presenta un pertugio che permette la salita delle ascospore; così pure gli sporangi, che presentano di solito un foro per la salita delle zoospore, possono però anche mettersi in libertà per lisi del sacco sporangifero. E questo sarebbe appunto il caso di *Coccidioides* in cui questa maniera di deiscenza è giustificata dall'aplanetismo delle zoospore che sono di solito flagellate e motili nei funghi acquatili o semi-idrofitici e quindi possono dirigersi spontaneamente verso i pori di uscita e sciamare all'esterno. Nel caso di *Coccidioides*, che vivono nei tessuti, le endospore non sono motili, dal che l'impossibilità di dirigersi verso il punto di uscita. Per questo il sacco materno si lacera ampiamente e le zoospore si spargono all'interno forse aiutate da una costrizione di esso per opera dei tessuti circostanti e forse anche per l'imbibizione meccanica di acqua dei residui del plasma intersporale.

Probabilmente di secondario valore, rispetto alle precedenti, ma di un qualche interesse è il fatto che lo sporangio maturo nidulante nei tessuti (ed anche gli sporangi che si sono formati in culture in condizioni di anaerobiosi ed in liquido ascitico e siero di sangue) possono spesso presentarsi echinulati, spinulati, od aculeati. Come si è visto questa caratteristica non è assolutamente costante; vi sono infatti degli sporangi del tutto lisci. L'echinulazione o spinulazione degli sporangi non è rara in seno ai Chytridiales ed in varie famiglie di essi; così per citare qualche specie, nella *Sphaerita endogena* Dangeard, parassita di *Euglena*, in *Pleolpidium monoblepharis* (Cornu) Fischer parassita delle ife di *Monoblepharis*, nel *Mycromyces zygogoni* Dangeard, parassita degli *Zygogonium*, nel *Diplocystis intestina* (Schenk) Schröter, parassita di *Chara* e *Nitella*, ecc. Anzi la figura dello Zopf (1884) dello sporangio contenente zoospore allo stato di riposo è molto suggestiva nei riguardi delle affinità dello sporangio di *Coccidioides*. D'altro canto non si hanno esempi assolutamente certi di aschi spinulati negli Ascomiceti.

3. – *Prove citologiche.*

Deve tenersi in conto, avanti tutto, che, come giustamente hanno notato, crediamo per i primi, uno di noi (Redaelli, 1930) e Timpano (1931), avvenendo l'evoluzione dalla spora allo sporangio nei tessuti, la formazione delle zoospore si ha in un mezzo ostile, qual'è il tessuto con le sue reazioni umorali ed organizzate di difesa. Per conseguenza l'evoluzione del fungo non è mai (nè potrebbe essere altrimenti) uniformemente eguale, nè chiara e semplice come potrebbe aversi, per esempio, in un fungo evolventesi in condizioni di vita saprositaria, vale a dire in cultura. Da

quì il fatto che i fenomeni di involuzione o di regressione e fenomeni degenerativi sono normali, e che quindi è necessaria una continua osservazione che permetta sceverare il fenomeno della normale evoluzione da quello aberrante dell'evoluzione in mezzo ostile. Quando a ciò si aggiunga che le colorazioni all'ematossilina non ferrica non sono di solito capaci di mettere in netta evidenza la struttura intima del nucleo, è facile darsi conto del perchè i fatti citologici di questo genere non sono mai stati chiaramente e definitivamente messi in luce.

In riassunto ecco la storia dell'evoluzione citologica di *Coccidioides* quale risulta dalle osservazioni da noi compiute su materiale coltivato in goccia pendente, per la vita saprositica di questo fungo, e in pus nei tessuti di cavia, per la vita parassitica. La tecnica seguita fu la fissazione con sublimato-alcoolico e la colorazione con ematossilina ferrica di HEIDENHEIM.

Il micelio è tipicamente cenocitico; nelle culture vecchie si formano dei setti, quasi esclusivamente all'altezza delle clamidospore, i quali, a secondo della loro frequenza nei singoli tratti del micelio, possono delimitare delle cellule che di solito sono plurinucleate, ma raramente binucleate, mononucleate, ed anche anucleate, fatto questo comune ai Ficomiceti che formano dei setti a delimitazione delle clamidospore intercalari, e non o raramente centrali. Le clamidospore sono invece quasi costantemente mononucleate, per quanto abbiamo potuto osservare, benchè molto raramente si notino anche delle clamidospore binucleate persino nei tessuti. Da questi due nuclei, uno prende parte ai fatti riproduttivi, ed uno funziona come nucleo soprannumerario, degenerando prima in una massa cromatinica irregolarmente colorabile, e quindi in granulazioni ematossilinofile, dopo di che non si osserva più nulla. Una volta, in pus di cavia, abbiamo pure osservato una clamidospora anucleata, di cui presumibilmente non avverrà nei tessuti nessuna ulteriore evoluzione.

Quando il micelio è inoculato nei tessuti viventi, i primi elementi che risentono dell'effetto litico (analogamente a quanto succede per la maggior parte delle Cladochytriaceae, che in condizioni di vita parassitaria hanno il micelio evanescente) sono i nuclei, che degenerano allungandosi e assumendo una forma molto irregolare, e quindi trasformandosi in granulazioni irregolarmente colorabili, per essere in fine, col resto del protoplasma, in preda al disfacimento. Invece il nucleo delle clamidospore che, vinta la resistenza del mezzo, sono capaci di evolvere a zoosporangi, si suddivide per bipartizioni successive, ma irregolari come ritmo e come numero (probabilmente per l'influenza perturbante delle reazioni difensive dell'organismo). Non siamo stati capaci di accertare se la divisione nucleare avviene per mitosi od è amitotica, ma propendiamo per questa ultima ipotesi. Le bipartizioni si susseguono quasi indefinitamente, ma

il numero di spore finalmente formate è molto variabile, e solitamente non identico al numero dei nuclei presenti, probabilmente per la lisi di alcuni di essi. In uno sporangio siamo stati capaci di contare oltre 120 spore, ma di solito il numero varia da una trentina a circa sessanta. In qualche caso esse sono anche meno di 20. Il computo riesce molto difficile per il fatto che non vi è la differenziazione contemporanea di esse, e quindi per il fatto che molte degenerano. Le singole zoospore sono sempre mononucleate, e appena messe in libertà e portate in ambiente saprositario, iniziano subito la moltiplicazione del nucleo all'atto della germinazione. All'emissione del tubulo germinativo segue immediatamente la bipartizione del nucleo primordiale: uno dei nuclei figli rimane nella spora germinante, mentre l'altro nucleo migra nel tubulo germinativo, ove si biparte a sua volta immediatamente, ed uno dei nuclei figli si sposta ascendendo l'ifa micelica in via d'accrescimento; e così via di seguito.

Come si vede dalle figure riportate, l'osservazione di nuclei ben definiti in seno allo sporangio nei tessuti è assai rara; almeno nove volte su dieci i nuclei sono più o meno profondamente disorganizzati, e più spesso solo sono visibili delle granulazioni ematossilinofile di cromatina. Questo significa che almeno nove endospore su dieci degenerano senza essere capaci di giungere a maturità; e che in natura avvenga così, e così pure negli animali inoculati, lo spiega il fatto che, data la rapidità del ciclo di moltiplicazione del fungo nei tessuti, se tutte le zoospore si formassero regolarmente giungendo a maturità, ne deriverebbe che i tessuti, in capo a pochi giorni, sarebbero letteralmente farciti di spore, caso questo che non si verifica, o che si osserva solo in casi eccezionali.

Le spore adulte, ma ancora racchiuse nel sacco materno, mostrano quasi costantemente un sottile strato di plasma periferico che si colora con l'eosina; questo straterello pare invece mancare nelle zoospore immature, in cui la sola cromatina è colorabile con ematossilina.

È facile osservare che dell'effetto delle difese umorali ed istogene dell'organismo ospite, il nucleo viene a risentirne prima del plasma, rigonfiandosi ed apparendo come vescicoloso, nel mentre la tinzione con ematossilina, pur essendo estesa a tutto il nucleo, diviene irregolare. Quasi contemporanea o di poco posteriore a questo fenomeno è la vacuolizzazione del protoplasma, che è già discretamente visibile anche con un colorante di fondo, come l'eosina; nella periferia del protoplasma apparisce una zona ematossilinofila ma assai più irregolare. Anche il protoplasma può tingersi qua e là, ma irregolarmente e senza svelare nessuna struttura interna. Alla vescicolazione del nucleo, e quasi contemporanea a quella del protoplasma, segue la vacuolizzazione del nucleo; questo è notevolmente deformato, e spesso ipertrofico, e si tinge con molta irregolarità, mentre cominciano ad apparire, intorno al nucleo o sparsi nel protoplasma, dei granuli di cromatina più o meno ben differenziati. A

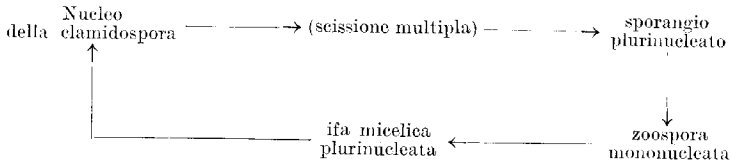
questo stadio il plasma è molto vacuolizzato e irregolarmente tinto. Segue il disfacimento completo del nucleo e la presenza di cromatina per tutto il plasma, che si tinge, per di più, assai irregolarmente, cosicchè diventa assai difficile seguire gli ultimi stadi della lisi del nucleo stesso.

Le colorazioni nucleari (ed a questo proposito è pure utile quella effettuata con la fucsina acida secondo il metodo SEMICHON) permettono di accertare in maniera indubbia che la cariotomia precede immancabilmente la plasmotomia.

I granuli di cromatina perinucleare, nei primissimi stadi dell'involuzione nucleare, sono in numero variabile di solito da uno a quattro; in qualche caso le granulazioni sono piuttosto grosse e ben visibili, ma in numero ridotto, e potrebbero essere confuse con dei nuclei o nucleoli, tanto più che il fenomeno non è mai troppo chiaro.

Come si vede, ridotta alle sue linee fondamentali, l'evoluzione nucleare di *Coccidioides* è semplicissima, e non si differenzia da quella della quasi totalità dei Chytridiales a sessualità ridotta.

Esso può riassumersi nello schema seguente:



4. – *Il fenomeno della coniugazione in Coccidioides in rapporto alla sessualità nei Ficomiceti*

Malgrado la grande varietà dei fatti e delle modalità della riproduzione sessuale, che fanno dei Ficomiceti uno dei gruppi (sotto questo punto di vista) dei più eterogenei, in nessuna delle specie note si ha notizia di una coniugazione di aplanogameti; ciò d'accordo con la premessa che le aplanospore di *Coccidioides* siano gli equivalenti dei planogameti dei Phycomycetes–Chytridiales, premessa che, appoggiata dalle prove morfogeniche, morfologiche e citologiche di cui si è trattato, portò uno di noi (CIFERRI, 1932) alla creazione delle famiglie Coccidioidaceae.

Una discussione approfondita del significato e dell'interpretazione dei fatti sessuali in *Coccidioides* non è possibile, in quanto il fenomeno è ancora troppo poco noto, in questo genere, e dobbiamo contentarci quasi solo della segnalazione. In particolare restano oscuri ancora i seguenti fatti:

1° se la coniugazione è eterogama, o se può essere considerata come isogama;

2° qual'è l'ulteriore destino dello zigoto, e in particolare se, a coronamento della copulazione, esso si trasforma in sporangio, e con quali modalità citologiche;

3° se tutto il plasma di uno dei due gameti prende parte alla coniugazione, o solo in parte, e se vi è differenziazione tra un periplasma e un centroplasma;

4° qualora vi sia il passaggio del contenuto protoplasmatico di uno dei due gameti nell'altro, qual'è la sorte della cellula vuotata del suo contenuto, in rapporto all'esistenza delle «cellule compagne» in alcuni dei più bassi Chytridiales;

5° se e con quali modalità il nucleo prende parte alla coniugazione, e l'evoluzione nucleare in rapporto ai due gameti, e in rapporto allo zigoto, e alla sua eventuale evoluzione.

Limitando la presente discussione ai pochi fatti sinora osservati, e malgrado le piccole ed oscillanti differenze tra le dimensioni dei due gameti, non ci pare sia il caso di considerare la copulazione come eterogamica, tipo di copulazione, d'altronde, piuttosto rara nei Chytridiales meno differenziati. E se i gameti sono indistinguibili tra di loro, da essi è indistinguibile lo zigoto. L'ulteriore sorte di questo elemento è ancora da stabilire; noi non siamo mai riusciti a vedere una sua ulteriore evoluzione a sporangio, e la scarsezza del materiale di coniugazione, ottenuto da due soli tubi di cultura su venti seminati, non ci ha permesso neppure lo studio citologico per l'osservazione dei fatti nucleari. Se, sotto condizioni a noi ignote, lo zigoto si trasforma in sporangio producente delle zoospore aplanetiche, bisognerebbe ammettere che *Coccidioides* fosse capace di un ciclo evolutivo triplo, e cioè:

1° *in vitro*, una moltiplicazione asessuale per micelio e clamidospore, potenzialmente capaci di evolversi ulteriormente in sporangi o di generare ife, a seconda delle condizioni del mezzo ambiente;

2° *in vivo*, una moltiplicazione asessuale per l'evoluzione delle spore quiescenti o clamidospore in sporangio e la produzione partenogenetica di zoospore aflagellate ed immobili, a loro volta passibili di evolversi ulteriormente in sporangi;

3° *in vitro*, sotto condizioni molto particolari e non ben precisate, una coniugazione isogama delle spore quiescenti che dovrebbero avere logicamente un seguito nell'evoluzione dello zigoto in sporangio e la produzione di zoospore.

Ciò premesso, si possono cercare dei rapporti, tra il tipo di sessualità da noi osservata, e quelli noti per i Chytridiales, tipo di sessualità che FITZPATRICK (1930) considera come il più primitivo e che persiste tuttora in qualcuna delle specie meno evolute; tra di esse le meglio conosciute sono l'*Olpidium viciae* ed il *Synchytrium endobioticum*. Per l'*Olpidium viciae*, KUSANO (1912) ha mostrato che le zoospore funzionanti da gameti

si coniugano generando uno zigoto che si sviluppa quale sporangio quiescente, mentre le zoospore che non funzionano da gameti producono uno sporangio a sua volta generante zoospore. Questo ciclo corrisponde bene a quello di *Coccidioides immitis*, salvo la sorte dello zigote, che nell'ultima specie è ignota. Un ciclo analogo pare aversi, secondo NÉMEC (1912) nell'*Olpidium brassicae*. È interessante pure notare, con RAMSBOTTON (1914) come questo ciclo di sessualità si ritrovi non solo nei funghi, ma anche, senza variazioni, nelle Alghe più primitive.

Oltrechè nella famiglia delle Olpidiaceae, atti simili, ma già più complessi, si osservano nei *Synchytrium* della Famiglia Synchytriaceae, ove le spore quiescenti risultano dalla fusione di due isogameti ciliati, ma si complica per la formazione di un prosoro contenente più sporangi nei quali, per divisioni successive, si formano duecento o trecento nuclei e quindi altrettante zoospore; queste possono coniugarsi formando lo zigoto che funzionerà da sporangio, oppure possono senz'altro trasformarsi in prosori, sporangi e zoospore.

Se la regola è che i gameti sieno mobili, nei Chytridiales vi sono delle eccezioni; così per esempio nel *Monochytrium Stevensianum* Griggs e delle specie del genere *Reesia* Fischer, dove però, se non sono flagellati, sono dotati di movimenti ameboidi. Nell'ordine dei Monoblepharidales vi è copulazione eterogamica, ma uno solo dei due gameti è mobile e l'altro aplanetico, e pure affatto immobile è l'oosfera.

Un altro carattere che trova dei rapporti con i Chytridiales piuttosto che con i Saccharomycetales ed Endomycetales si ha per il fatto che le sporangiospore formano in *Coccidioides*, dentro lo sporangio, una membrana cellulosica indipendente. Così per esempio avviene in *Aplanes*, in *Geolegnia*, in *Thraustotheca*, in *Calyptrolegnia*, in *Dictyascus*, in *Brevilegnia*, ecc.

In *Aplanes*, anzi, le zoospore (sporangiospore) germinano anche prima di essersi rese indipendenti dallo sporangio, ed i tubuli germinativi raggiungono il mezzo ambiente perforando le pareti del sacco materno. Un fatto analogo è stato osservato in *Coccidioides*, anzi, CIFERRI (1932) ne ha dato la figura. In *Geolegnia* le sporangiospore hanno, come in *Coccidioides*, uno stato di quiescenza nell'interno del sacco materno, da cui si liberano egualmente per la lisi della tunica dello sporangio, ed allora soltanto emettono un tubulo germinativo, senza mai formare delle vere zoospore flagellate. Negli altri quattro generi, invece, vi è uno stadio intermediario di zoospore biciliate tra l'incistidazione in seno allo sporangio e fuori d'esso. In altri generi tra i citati (*Achlya*, *Isachlya*, *Saprolegnia*, *Leptolegnia*, *Aphanomyces*, ecc.) lo stadio incistidato o stadio di cistospora è raggiunto soltanto fuori dallo sporangio.

Una ultima serie di rapporti è data dal fatto che in certi Chytridiales parassiti di altre piante, il micelio è effimero sotto condizioni di vita

parassitaria, esattamente come avviene in *Coccidioides* in cui l'inoculazione in un animale recettivo di materiale di cultura, porta ad una rapida e completa lisi delle ife micceliche. Il genere meglio noto, sotto questo riguardo, è il genere *Physoderma* WALLROTH (includendo *Urophlyctis* Schroeter): in alcune specie di esso il micelio infettante sparisce rapidamente cosicchè nei tessuti delle piante ospiti restano solo le spore quiescenti libere ed indipendenti tra di loro, per il che la loro origine e la loro natura resterebbe oscura qualora non si conoscesse il ciclo completo del fungo.

5. – *Posizione sistematica ed affinità del genere Coccidioides.*

Questa parte dello studio è stata estesamente svolta in precedenza da uno di noi (CIFERRI, 1932), e per questo ci limiteremo solamente a riassumerla, rimandando per i dettagli del caso al lavoro originale.

Considerando tra i Chytridiales solamente il gruppo di generi provvisti di un relativamente ben sviluppato apparato micelico, cioè il gruppo (famiglia o sottofamiglia) delle Mycochytridiaceae (Mycochytridineae), noi troviamo in esso tre gruppi di rango inferiore, distinti in base agli sviluppi del micelio e di organi differenziati derivanti o connessi con esso.

Tali gruppi, che alcuni Autori ritengono altrettante famiglie sono: le Rhizidiaceae, funghi olocarpici con processi rizoidi anucleati connessi con lo sporangio, e aventi, a quel che pare, una funzione d'ancoraggio: il micelio è ridotto e di solito limitato ad una o due cellule dell'ospite, gli sporangi, di solito epibiotici, sono isolati, e di solito in diretta connessione con l'ospite. Questa famiglia ch'è una delle più ampie (il FITZPATRICH enumera 22 generi), è anche una delle meno studiate, e certamente racchiude dei funghi molto eterogenei. Un secondo raggruppamento è quello delle Cladochytriaceae, che hanno un micelio meglio sviluppato che le Rhizidiaceae nelle cui ife si sviluppano degli allargamenti (cellule turbinate) terminali od intercalari, capaci di evolvere, in tutto o in parte, in sporangi o in spore quiescenti. In questa famiglia è compreso un numero variabile di generi, a seconda dell'estensione a lei assegnata dai vari trattatisti: di solito 5 o 6. Alcuni Autori separano dalle Cladochytriaceae, il gruppo delle Hyphochytriaceae, funghi eucarpici che avrebbero un micelio differenziato in ife od assi primari ed ife o ramificazioni secondarie. Egualmente oscure sono le interrelazioni non solo tra le varie famiglie, ma anche tra i generi di una stessa famiglia; ma è possibile, almeno per i generi meglio conosciuti, tracciare delle scale di crescente complicazione morfologica, senza che per questo tali scale rappresentino degli alberi o delle catene filogenetiche nel senso usuale della parola. Questo è stato tentato da IVIMEY COOK (1928) per la serie

che da *Harpochytrium*, per *Rhizophidium*, *Entophlyctis*, *Catenaria*, *Cladochytrium*, *Nowakowskiella*, e *Macrochytrium* giunge sino alla Blastocladiaceae, famiglia già assai più evoluta delle precedenti, affine ai Monoblepharidales, da un lato, e forse alle Leptomitaceae (Saprolegniales) dall'altro. Il punto di ramificazione della catena, che volge verso le Hyphochytriaceae (ossia le forme a micelio sviluppato e con ramificazioni distinte delle Cladochytriaceae, ma senza formazione di cellule turbinate) si ha nel genere *Catenaria* Sorokin (1876), includente due specie, di cui una dubbia (*C. pygmaea* Serbinow) ed una ben nota (*C. anguillulae* Sorokin), grazie agli studi di BUTLER e BUCKLEY (1927) e, meglio, del BUTLER (1928), che è parassita di Nematodi e Trematodi, di uova di Rotiferi, cisti di Infusori e di specie del genere *Nitella*. La *Catenaria anguillulae* studiata nelle uova di *Fasciola hepatica*, a differenza delle specie degli altri generi, avrebbe un micelio settato. Da *Catenaria*, per *Hyphochytrium*, si giungerebbe secondo IVIMEY COOK, a *Protomyces*.

Questo permette di superare la prima difficoltà dell'ascrizione di *Coccidioides* ai Chytridiales, e cioè la presenza di un micelio settato.

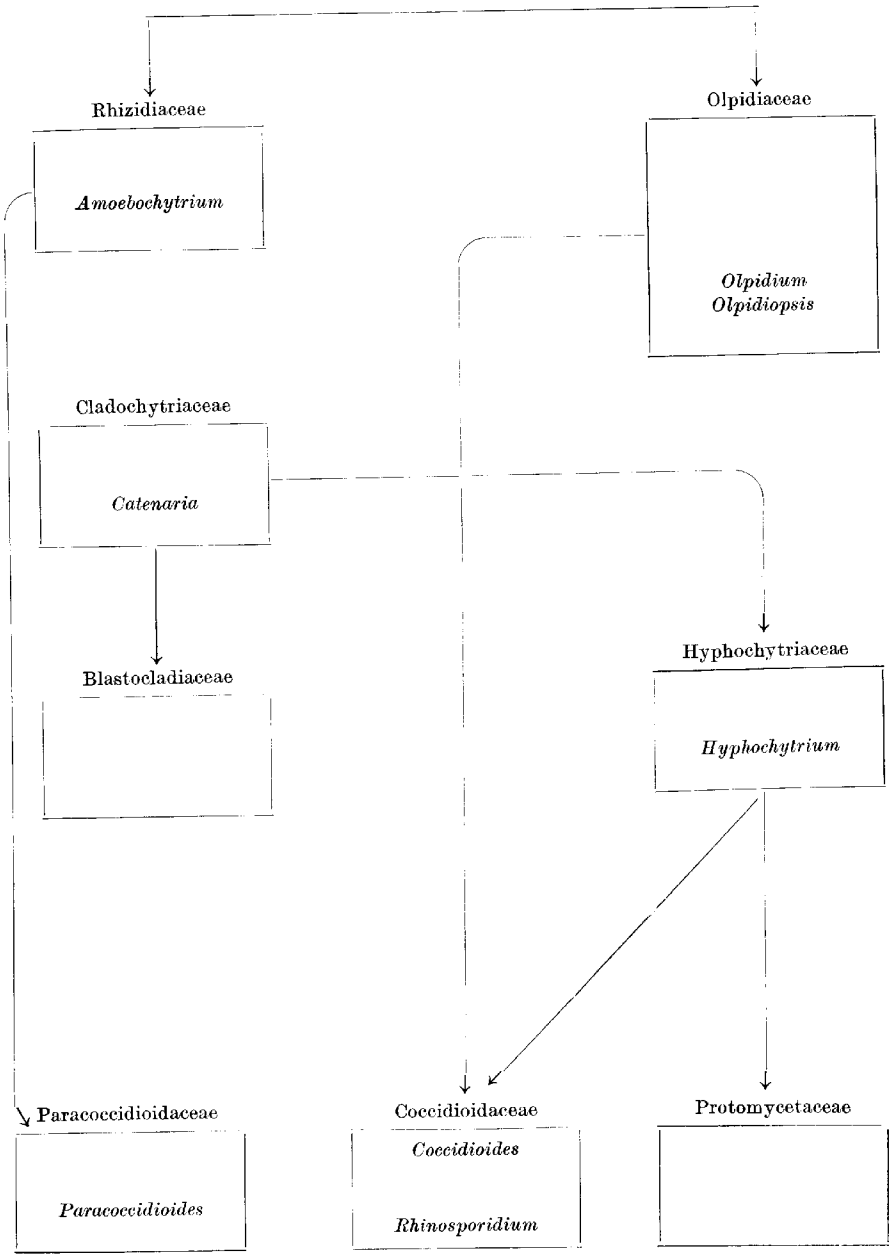
Vi è una seconda difficoltà: ed è che le zoospore (vale a dire le endospore che si formano nei tessuti animali viventi, e sotto eccezionali condizioni, anche *in vitro*) sono aplanetiche, cioè aflagellate e permanentemente immobili. La questione si trasforma subito in quella del valore filogenetico (e quindi sistematico) dei flagelli nelle zoospore di tutti i funghi appartenenti ai Chytridiales. Le opinioni dei vari specialisti sono molto divise: ATKINSON (1915), in base alla considerazione che zoospore biflagellate sono talvolta presenti in zoosporangi di generi a zoospore normalmente monoflagellate, nega una grande importanza a questa caratteristica. GRIGGS (1912) in base ad altre considerazioni, è della stessa opinione. Il punto di vista opposto è invece suffragato da VUILLEMIN (1912), da BUTLER (1928) e da altri.

Qualunque sia l'ipotesi per cui si propenda, il problema, nel nostro caso, si riduce a domandarsi se si può accettare l'ipotesi che le peculiari condizioni di vita dei *Coccidioides* abbiano potuto portare alla scomparsa dei flagelli delle zoospore. Su questo punto non ci pare possa essere dubbio: la presenza delle zoospore flagellate presuppone che, in uno stadio qualunque della loro vita, esse debbano essere atte alla mobilità in un mezzo acquatico, fatto questo che non si avvera mai per *Coccidioides*, a causa dell'acquisito potere patogeno del fungo, e della concomitante facoltà di formare zoosporangi o zoospore soltanto in mezzi solidi, quali sono i tessuti animali viventi, o sotto peculiarissime condizioni provocate artificialmente in laboratorio, e quali, molto presumibilmente non si realizzano mai in natura (culture in condizioni anaerobie in liquidi ascitico, partendo da semine di pus di animali inoculati sperimentalmente) ma che d'altra parte si avvicinano notevolmente alle condizioni di parassi-

tismo degli animali). Ci pare perciò, che, in questo caso almeno, una spiegazione teleologica è perfettamente giustificabile: l'aplanetismo delle zoospore corrisponde all'adattamento ai tessuti animali viventi.

D'altra parte non mancano esempi di una perdita parziale o di una trasformazione dei flagelli in altre specie appartenenti ai Chytridiales: così per esempio in *Hyphochytrium infestans* Zopf [*Hyphophagus infestans* (Zopf) von Minden], una specie parassita degli apoteci di *Helotium* (e per disgrazia ancora mal nota) in cui alcune delle zoospore posseggono un flagello di cui però sono sprovviste all'epoca dell'emergenza di esse dal zoosporangio. Non mancano neppure esempi di specie (e talvolta di generi) in cui le zoospore sono normalmente e per tutta la durata della loro vita, aplanetiche, ma i flagelli sono sostituiti, in rapporto al potere di motilità d'esse, da movimenti amebiformi: così, per esempio, in *Amoebochytrium*, e, tra i Saprolegniales, in *Achlya*, *Plectospora*, *Aphanomyces*, *Thraustotheca*, ecc.

La posizione sistematica di *Coccidioides* ed i rapporti morfologici con le affini famiglie e generi dei Chytridiales si può riassumere in questo specchio, notando ch'esso non rappresenta un albero filogenetico, ma solo un rapporto di analogia dal punto di vista morfologico:


Rhizidiaceae
Amoebochytrium
Olpidiaceae
Olpidium
Olpidiopsis
Cladochytriaceae
Catenaria
Blastocladiaceae
Hyphochytriaceae
Hyphochytrium
Paracoccidioidaceae
Paracoccidioides
Coccidioidaceae
Coccidioides
Rhinosporidium
Protomycetaceae

L'ipotesi di una più stretta analogia, se non di una pertinenza, alla famiglia delle Protomycetaceae (Protomycales) è stata esposta da vari autori, ma senza discutere il fondamento dell'ipotesi stessa. In realtà, la posizione sistematica delle Protomycetaceae coll'esclusione di *Endogone* si riduce al solo genere *Protomyces* e a due generi affini o derivati (*Protomycopsis* e *Taphridium*). Si tratta di una famiglia molto organicamente definita, ma altrettanto incerta per il suo inquadramento generale in seno ai miceti. Il micelio è ialino, ramificato e settato, e porta delle clamidospore intercalari od apicali che, dopo un periodo di riposo, germinano per estrusione dell'endosporio in un sacco in cui si versa il contenuto protoplasmatico della clamidospora. Esso di solito si aggrega alla estremità del sacco, e si suddivide formando un grande numero di piccole spore unicellulari, che fuoriescono per violenta rottura del sacco e possono copularsi due a due. Queste possono poi germinare producendo un tubulo miceliare o, sotto certe condizioni, gemmare alla maniera di lieviti.

I vecchi micologi consideravano i Protomycales come intermediari tra i Chytridiales e gli Ustilaginales. Lo specialista dell'ordine, il VON MINDEN (1915), in un primo tempo considerò che le cellule endosporulanti fossero comparabili agli aschi, e creò per esse il termine « sinasco », ma in un secondo tempo (1922) modificò il suo primo criterio e, d'accordo con JUEL (1921), omologò le clamidospore con le cellule fertili dello stato ascogeno degli Exoascales, per il che GAÜMANN (1926) e GAÜMANN e DODGE (1928) posero le famiglie Exoascaceae e Protomycetaceae nell'ordine Exoascales. FITZPATRICK (1930) non condivide questo punto di vista, e propende piuttosto a credere che i Protomycales rappresentino una linea isolata di sviluppo di qualche primitivo ed ignoto Ficomicete. Ma tutto ciò resterà solo una questione di ipotesi e di opinioni personali, sinchè non si conoscerà bene l'evoluzione citologica di questi funghi.

Attenendoci all'ipotesi più vecchia e più conservativa circa la posizione sistematica e le affinità dei Protomycales, che, allo stato attuale delle nostre conoscenze, pare più giustificabile, una analogia dell'insieme tra *Coccidioides* e *Protomyces* è innegabile, ma *Protomyces* si mostra già notevolmente più evoluto di *Coccidioides*, anche per la modalità di formazione e la produzione stessa del sacco di estrusione (o sinasco). In un certo senso, le due famiglie Protomycetaceae e Coccidioidaceae formerebbero gli estremi di due linee divergenti di sviluppo, forse originate da un ceppo comune a noi ignoto, e probabilmente dalle Hyphochytriaceae.

Inoltre i fatti di sessualità accertati per *Coccidioides*, e che si rapporterebbero a quelli più semplici individuati nelle forme inferiori delle Olpidiaceae (*Olpidium*, *Olpidiopsis*, ecc.), farebbero ammettere anche una relazione tra Olpidiaceae e Coccidioidaceae, relazione che potrebbe essere dello stesso ordine di quella esistente tra Protomycetaceae e Ficomiceti in generale. La copulazione, ormai accertata, tra le spore delle

Protomycetaceae e quella tra le spore delle Coccidioidaceae offre un altro punto a favore delle affinità tra le due famiglie.

Circa l'inclusione del genere *Rhinosporidium* Minchin et Fantham nella famiglia Coccidioidaceae, non abbiamo nulla da aggiungere a quanto è stato detto in precedenza da CIFERRI, REDAELLI e SCATIZZI (1936), rimandando a questo lavoro. Ivi abbiamo confermata l'affinità di *Rhinosporidium* con *Coccidioides*, per il fatto che i *Rhinosporidium* sono assai vicini agli *Olpidium* o agli *Olpidiaster* (*Asterocystis*) e morfologicamente si situerebbero a lato di questi, vale a dire a lato di due generi che presentano pure una notevole affinità con *Coccidioides*, come si è esposto più sopra.

Il ciclo vitale di *Rhinosporidium* presenta, nei tessuti umani viventi e in quelli degli animali, tali affinità che, considerando solamente questo stadio, dovrebbe essere incluso, come genere distinto, nella famiglia Coccidioidaceae. Ma è impossibile pronunziarsi sinchè non si potrà effettuare uno studio completo del parassita anche in cultura, che sola potrà dimostrare se anche il ciclo della vita saprositaria di questo fungo è riferibile a quello di *Coccidioides*. Mancando della conoscenza di uno stadio ifico o miceliare del fungo, bisogna forzatamente ammettere delle affinità con le serie *Olpidium–Olpidiopsis* pur tenendo in conto le affinità con *Coccidioides*. Le differenze tra questo genere e *Rhinosporidium* vertono solo (allo stato attuale delle nostre conoscienze) sulle grandezze e la frequenza degli zoosporangi, il numero delle zoospere, e la forma anatomo–clinica della malattia indotta,

Per la affinità con *Dermocystidium* Perez, un parassita di pesci, ecc., rimandiamo egualmente al lavoro succitato (1936) e ad uno precedente (CIFERRI, 1932), osservando che in questo caso si ha a che fare con un vero e tipico Chytridiales.

Molto recentemente MOORE (1935) ha creduto di identificare il genere *Posadasia* Cantón con il genere *Histoplasma* Darling. Questa opinione, che cozza in pieno contro tutte le ammissioni sino ad oggi effettuate da ogni studioso che si è occupato di questo argomento, non è giustificata nemmeno dal MOORE stesso, il quale parrebbe basarsi su delle vaghe analogie sulle quali si guarda bene di insistere. Egli fonda le sue induzioni sul *Neogeotrichum pulmoneum* Magalhães (1932) un microorganismo che, come risulta chiaramente dalle numerose e belle illustrazioni di questo scienziato brasiliano, non ha assolutamente nulla a che vedere con *Posadasia* o con *Histoplasma*. Altre allusioni sono fatte circa le affinità tra *Posadasia* e *Paracoccidioides brasiliensis* un fungo che anche noi abbiamo studiato a fondo (1935 *b*) e che manca di ogni rapporto con *Coccidioides*, *Posadasia* e con *Histoplasma*. A conferma di tutto questo basta osservare che nè *Neogeotrichum pulmoneum*, nè *Paracoccidioides brasiliensis* producono delle endospore del tipo *Coccidioides*. Inoltre deve aggiungersi

il fatto, trascurato completamente dal MOORE, che *Posadasia* pare essere un nome generico non valido.

Il MOORE pone nella famiglia Coccidioidaceae quattro generi: *Posadasia* (*Histoplasma*); *Coccidioides*; *Paracoccidioides* e *Rhinosporidium*. La questione dell'appartenenza di *Rhinosporidium* alle Coccidioidaceae è già stata da noi discussa in precedenza e la sicura affinità tra quel genere e *Coccidioides* è innegabile. Non possiamo invece ammettere assolutamente un'affinità tra *Histoplasma*, *Paracoccidioides* e *Coccidioides*, tre generi fondamentalmente differenti sotto ogni punto di vista. Riservandoci di discutere in altra sede gli errori di osservazione e di interpretazione che hanno fatto ammettere da parte del MOORE una formazione di aschi in *Histoplasma*, ci limiteremo a dire che la causa fondamentale delle numerose confusioni che il MOORE è venuto effettuando e che minacciano di complicare sempre maggiormente la già complicatissima questione del ciclo vitale e delle affinità di questi generi, risiede nel fatto che il MOORE ha lavorato sempre ed esclusivamente su materiale di cultura, tralasciando

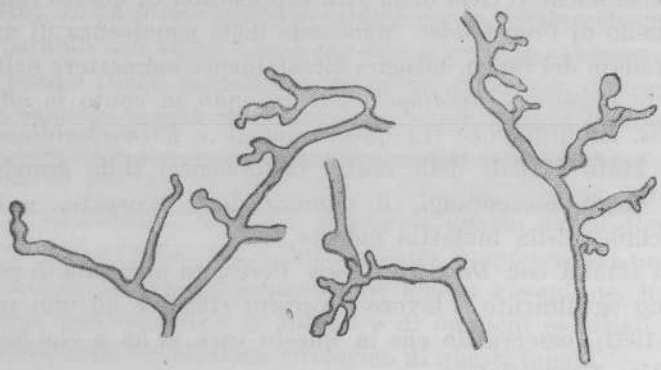


Fig. 12. – Configurazioni degli apici delle ife di *Coccidioides immitis Pipkini*, rassomiglianti alle figure di specie del genere *Scopulariopsis*.

completamente le osservazioni di morfologia, di morfogenesi ed il ciclo vitale dei vari funghi sunnominati nei tessuti animali od umani viventi. Questo equivale a dire che del doppio ciclo di vita che si osserva in questi funghi, egli ne ha esaminato solo uno (il ciclo della vita saprositaria o in cultura) e quello che per questi è di gran lunga il meno importante ed il meno tipico per il loro studio micologico.

CLASSIFICAZIONE E NOMENCLATURA.

I « ceppi CASTELLANI » (*Blastomycoides immitis* o *Geotrichum immitis* Cast.), il « ceppo MOORE »; i « ceppi WEIDMAN », N. 1136, 1091, 1676, ed il *Geotrichum louisianoideum* Castellani, non si differenziano fra di

loro affatto o solo per caratteri incostanti o di così piccola importanza che possono, senza tema di errore, considerarsi compresi nei limiti della oscillazione specifica. Poichè questi ceppi, pur essendo di varia origine, hanno riprodotto la malattia negli animali da esperimento nella maniera più tipica tra tutti i ceppi studiati, e poichè tra i ceppi di *Coccidioides* da noi indagati essi ne rappresentano la maggior parte, li considereremo appartenenti al tipico e vero *Coccidioides immitis* Stiles.

I ceppi *Geotrichum* o *Blastomycoides dermatitidis* Castellani ed i due ceppi « CIFERRI » e « AGOSTINI » sicuramente derivanti dal « ceppo CASTELLANI » di *Coccidioides immitis*, sono da considerarsi come derivazioni dal tipico *Coccidioides immitis*, degradati in riguardo al potere patogenico, minore che negli stipiti tipici, e leggermente variati da quelli per un complesso di caratteristiche culturali, morfologiche, in vita saprositica e parassitica, e forse anche, dentro limiti molto ristretti, biochimiche.

Queste degradazioni, con ogni probabilità indotte da particolari condizioni ambientali negli stipiti conservati in cultura, non possono far sì che i ceppi meritino una posizione sistematica a parte, con rango magari inferiore a quello specifico in seno a *Coccidioides immitis*, per le stesse ragioni per cui i ceppi pleomorfici dei Dermatofiti, i ceppi a mutate facoltà biochimiche dei lieviti sporigeni ed asporigeni e i ceppi avirulentati a causa della loro vita in cultura, non si possono distinguere dagli originali, qualora i rapporti tra essi sieno conosciuti. Per conseguenza situeremo i tre ceppi in questione nel *Coccidioides immitis*.

Il « ceppo WEIDMAN » N. 2322 presenta la concomitante variazione di caratteristiche culturali ed identità di ottimi termici, un quadro morfologico in cultura inconsueto, attività patogenetiche intese come espressioni della reazione animale anche dal punto di vista istopatologico atipiche, ed una morfologia degli elementi parassitari negli animali nettamente differenziabile dal tipico *Coccidioides immitis*. In base a questo complesso di caratteristiche ci è parso possibile poter distinguere il ceppo N. 2322 (che rappresenta anche il primo caso di isolamento del *Coccidioides immitis* nel Texas dove ha indotto, in un soggetto, una forma anatomo-clinica abbastanza peculiare) come varietà e sottospecie del *Coccidioides immitis* col nome di *Coccidioides immitis* var. *Pipkini*.

La *Glenospora meteuropea* Castellani ha presentato culture non differenziabili in mezzi solidi ed in mezzi liquidi da quelle dei tipici *Coccidioides immitis*, nè i caratteri biochimici hanno presentato delle variazioni degne di nota. La micromorfologia del fungo in cultura non ha neppure variato, mentre l'aspetto e le dimensioni degli sporangi e delle zoospore nei tessuti ha dato forme assai più piccole, più scarse ed anomale. La maggior parte degli sporangi non giunge a maturare, in tutto od in parte, le endospore, portando al massimo a maturità poche od una sola spora. Per quanto questi caratteri presi isolatamente non sarebbero sufficienti

a distinguere sistematicamente questo ceppo dal complesso dei ceppi a poteri biologici degradati («ceppo AGOSTINI» e «ceppo CIFERRI», *Blastomycoides dermatitidis* Castellani), lo distinguemmo in una sottospecie o varietà del *Coccidioides immitis* (var. *metaeuropaeus*) tenendo in conto anche l'area di distribuzione geografica di esso. Infatti, secondo CASTELLANI e JACONO (1933), esso sarebbe esclusivamente europeo essendo stato isolato in un soggetto italiano a Napoli. Sarebbe questo il primo caso in cui un fungo appartenente al gruppo dei *Coccidioides immitis* è isolato in Europa ed in soggetto europeo, pare autoctonamente.

Fig. 13. – Morfologia degli apici delle ife di *C. immitis Pipkini* («ceppo WEIDMANN» N. 2322) a configurazione di *Scopulariopsis*, in vecchie culture in goccia pendente (colorazione al bleu di metilene).

Ricordiamo ancora come anche il *Geotrichum louisianoideum* (= *Coccidioides immitis*) oltre che in America (Luisiana) è stato isolato da CASTELLANI e JACONO anche nell'Italia meridionale (forme polmonari), e come sia apparsa in Europa anche una specie di *Coccidioides* definita come *Blastosporidium Schooi* Hartmann e Schoo. Poichè in questi casi la storia dei pazienti è muta nei riguardi di una eventuale permanenza in America di essi, grava sempre il dubbio sulla origine veramente indigena della forma morbosa. Non si dimentichi che nella letteratura esiste l'esempio di casi di granuloma coccidioide extra-americani per contagio di materiale proveniente dalla California (caso di BURGES) mentre casi descritti in Europa si riferiscono a soggetti immigrati dall'America.

Provvisoriamente quindi ed in attesa che altri reperti europei provenienti da soggetti sicuramente mai emigrati nelle Americhe, possano dimostrare l'esistenza ulteriore di casi autoctoni di granuloma coccidioide in Europa, distinguiamo la *Glenospora meteuropea* di CASTELLANI come *Coccidioides immitis* var. *metaeuropeus* (Castellani) Cif. et Red.

I caratteri differenziali osservati tra i differenti gruppi di ceppi in studio possono condensarsi nella seguente chiave analitica:

A) comportamento in cultura e nei tessuti animali, morfologia del

fungo del tutto tipica del *Coccidioides immitis* (*Blastomycoides immitis*, « ceppo CASTELLANI », « ceppo MOORE », « ceppi WEIDMAN » N. 1136, 1091, 1676, *Geotrichum louisianoideum* Castellani) . . . **Coccidioides immitis typicus** Cif. et Red. (inclusi i ceppi degradati per caratteristiche morfologiche e biologiche, « ceppo CIFERRI », *Geotrichum immite* « ceppo AGOSTINI », *Blastomycoides dermatitidis*).

AA) comportamento in cultura atipico o no; sporangi prevalentemente tipici con rara formazione di zoospore, scarse e incompletamente sviluppate.

B) Cultura rapidissima e facile a 25 e 37° C. su terreni solidi ed abbondantissima su terreni liquidi; formazione di elementi morfologici simili a *Scopulariopsis* in goccia pendente; riproduzione sperimentale di una infiammazione atipica dei tessuti della cavia, atipia anatomo-clinica della forma morbosa umana d'isolamento; caso autoctono del Texas . . . **Coccidioides immitis Pipkini** Cif. et Red. (« ceppo WEIDMAN » N. 2322).

BB) Culture normali in mezzi solidi e liquidi, senza forme simili a *Scopulariopsis*: probabile indigenato europeo del fungo (*Glenospora metaeuropea* Castellani) . . . **Coccidioides immitis metaeuropaeus** (Castellani) Cif. et Red.

Siamo quindi ora in condizioni di poter redarre una diagnosi completa della Famiglia , dei generi, delle specie, delle sottospecie studiate:

Famiglia **COCCIDIOIDACEAE** *Moore* (*1932*) *emend. Ciferri* (*1933*) et *nobis* (1936).

Funghi di facile isolamento culturale; in cultura su mezzi solidi con carboidrati colonie cotonose, bianche, più o meno rasate; senza carboidrati colonie glabre, dure, emergenti; in mezzi liquidi formazione in una colonia profonda e talvolta di una superficiale; in cultura, micelio ialino, sottile o uniforme o irregolarmente ingrossato, scarsamente settato, formante più o meno frequentemente clamidospore apicali od intercalari, isolate o seriate; pseudoartrospore, artrospore e forme simili a quelle di *Scopulariopsis*; clamidospore sferiche, ovoidee, piriculate, ecc., ialine, tipicamente provviste di una spessa e liscia membrana, capaci di germinare in sito o separate dall'ifa materna, che nei tessuti animali evolvono ulteriormente ma senza formare un tubo miceliico; pseudoartrospore formate da segmenti di micelio alternativamente ripieni e vuoti di protoplasma, che non evolvono mai, jaline, di solito a membrana sottile, con forme di transizione verso le clamidospore; artrospore cuboidee o cuboideo-arrotondate, apicali, di solito in brevi serie non facili a scindersi nei singoli elementi; aggregazione di tallospore a morfologia varia e qualche volta complessa, che ricordano superficialmente il quadro morfologico delle specie del genere *Scopulariopsis*, limitamente a qualche

ceppo e sotto speciali condizioni di cultura; nei tessuti degli animali viventi rapida lisi del micelio ed evoluzione ulteriore delle clamidospore che assumono la funzione di sporangi, aumentando di volume e generando delle endospore (zoospore); zoosporangi a membrana spessa con duplice contorno di solito bene evidente, liscia o verrucosa sino a spinulata, grandi o molto grandi; generanti un numero molto variabile di zoospore deiscenti per lacerazione irregolare della membrana involucrale, ialini; zoospore aflagellate ed immobili, di solito numerose o numerosissime, sferiche, sferoidee sino ad ovoidee od ellipsoidee, con parete grossa, liscia ed ialina; sotto particolari condizioni si ha una coniugazione isogamica od eterogamica delle clamidospore che funzionano come gameti, con evoluzione citologica ed ulteriore evoluzione morfologica ignota; negli sporangi formati nei tessuti viventi, moltiplicazione nucleare per ripetuta cariotomia, anteriore alla completa plasmotomia dello zoosporangio; attività biochimiche molto ridotte, senza capacità fermentative, capaci di vivere in assenza di carboidrati a condizione che abbiano a disposizione sostanze organiche a molecola complessa (peptone, albumine) che possono retrogradare sino alla produzione di ammoniaca; sono inattivi sul latte, fluidificano la gelatina, non scindono l'esculina; alcalinizzano frequentemente i substrati di cultura; non si sviluppano sotto condizioni di completa anaerobiosi, salvochè sotto condizioni molto particolari; scarso sviluppo in semianaerobiosi; produzione di pigmento bruno in certi mezzi culturali e sotto certe condizioni; temperatura optima variabile da 10–20° a 37–38° C.; possibilità di sviluppo in ambienti fortemente acidi od alcalini e su mezzi naturali (capelli, piume, unghie, terra, letame, grano, fieno ecc.); patogeni sperimentalmente per molti animali con formazione di granulomi; localizzazione geografica americana (e forse pure ma raramente europea) con predominanza assoluta nella California.

Tipo ed unico genere: *Coccidioides* Stiles.

Genere **Coccidioides** (Stiles) in Rixford et Gilchrist (1896) emend. Ciferri (1933) et nobis (1936).

Syn.: « Megalosporidio » Posadas (? 1892).
« Megalocitosporidio » Wernicke (1892).
Posadasia Cantón (1898).
Blastosporidium Hartmann (1912).
Oidium Auct. p. p.
Mycoderma Auct. p. p.
Zymonema Auct. p. p.
Pseudococcidioides Mazza et Parodi (1927).
Blastomycoides Castellani p. p. (1927).
Geotrichum Auct. p. p.
Scopuloriopsis Ota p. p. (1928).

Caratteri del genere identici a quelli della famiglia (escluse le forme asporigene).

Tipo ed unica specie: *Coccidioides immitis* Stiles in Rixford et Gilchrist (1896).

Specie **Coccidioides immitis** Stiles in Rixford et Gilchrist (1896).

Syn.: *Coccidioides pyogenes* Stiles in Rixford et Gilchrist (1896).
Oidium protozoides Ophüls (1905).
Oidium Coccidioides Ophüls (1905).
Oidium immite Verdun (1907).
Oidium pyogenes Verdun (1907).
Blastosporidium Schooi Hartmann (1912).
Posadasia sphaeriformis (« *esferiformis* ») Cantón (1898).
Zymonema immitis De Mello in De Mello et Fernandes (1918).
Blastomycoides immitis Castellani (1927).
Blastomycoides dermatitidis Castellani (non *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist et Stockes) (1927).
Mycoderma immitis Brumpt (1927).
Pseudococcidioides Mazzai Da Fonseca (1928).
Scopulariopsis americana Ota (1928).
Glenospora sp. Ota (1928).
Geotrichum immite Agostini (1932).
Coccidioides esferiformis Moore (1932).
Geotrichum dermatitidis Castellani in Castellani e Jacono (non *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist et Stockes) (1933).
Geotrichum louisianoideum Castellani in Castellani et Jacono (1933).

Caratteri della specie eguali a quelli della famiglia.

Coccidioides immitis typicus Cif. et Red. (1934).

Caratteri come i precedenti.

Coccidioides immitis Pipkini Cif. et Red. (1934).

Caratteri della famiglia, con cultura estremamente facile e rapida in ogni mezzo nutritivo solido e liquido a qualunque temperatura tra 18° e 37° C.; in goccia pendente formazione di un quadro morfologico complesso con forme simili a quelle di *Scopulariopsis*; quadro istopatologico sperimentale in cavia atipico; forma morbosa d'isolamento atipica. Isolato nel Texas. (Dedicato al dott. PIPKIN che ha isolato il ceppo e studiato il caso).

Coccidioides immitis metaeuropaeus (Castellani) Cif. et Red. (1934).

Syn.: *Glenospora metaeuropea* Castellani in Castellani et Jacono (1933).

Caratteri della famiglia: ceppo degradato rispetto a quelli tipici con morfologia ridotta ed a localizzazione apparentemente autoctona in Europa.

Notizie anatomo-cliniche sul granuloma coccidioide o « Malattia di Posadas-Wernicke ».

La malattia di cui abbiamo studiato l'agente fa parte di quel gruppo di forme morbose che fino ad oggi sono state comprese sotto il nome di « blastomicosi ». Ci sembra superfluo l'insistere ancora qui sulla necessità dello smembramento di questo gruppo e sull'abolizione della parola « blastomicosi », anche perchè noi stessi ce ne siamo occupati recentemente altrove (Redaelli, 1935). Ricorderemo solo che, se tutte le forme morbose suddette potevano essere raggruppate, fino a qualche tempo fa, quando di esse non si conoscevano bene gli agenti etiologici (che si sono dimostrati essere molti e diversi), oggi, dopo lo studio sistematico degli stessi, le singole forme anatomo-cliniche sono bene individualizzate sotto molteplici punti di vista, per cui possono essere nettamente tenute distinte le une dalle altre, con grande vantaggio anche della diagnostica e della terapia e quindi con vantaggio della pratica medica.

Lo smembramento del gruppo delle « blastomicosi » ha portato quindi alla individualizzazione delle seguenti unità: ,

a) il « granuloma rinosporidiosico » o « malattia di Seeber » causato dal *Rhinosporidium Seeberi*.

b) il « granuloma coccidioide » o « malattia di Posadas-Wernicke » causato dal *Coccidioides immitis* e dalle sue varietà;

c) il « granuloma paracoccidioide » o « malattia di Lutz-Splendore-Almeida » causato dal *Paracoccidioides brasiliensis*;

d) la « dermatite verrucosa cromomicosica », indotta dall'*Hormodendron* (*Trichosporium*) *Pedrosoi*;

e) la « sindrome di Gilchrist » o « dermatite verrucosa micosica » indotta da diverse specie fungine; in questa sindrome viene differenziata la vera « malattia di Gilchrist » o « dermatite verrucosa micosica nordamericana » determinata da *Gilchristia dermatitidis*;

f) tutte le più svariate forme morbose indotte da funghi lievitiformi in senso stretto, sieno ascogeni (Saccaromiceti) sieno anascogeni (Torulopsidacee, Histoplasmaceae, e forse da *Geotrichum*). In questo gruppo si illustrano molte forme anatomo-cliniche morfologicamente in apparenza uguali ma riconoscenti una poligenesi microbica, mentre alcune altre si differenziano nettamente come:

1° la « malattia di Darling » o « istoplasmosi umana » indotta dall'*Histoplasma capsulatum*;

2° il « farcino criptococcico dei solipedi » o « malattia di RIVOLTA » indotto dall'*Histoplasma farcinimosum*;

3° la « splenomegalia micosica dei muridi » o « malattia di SANGIORGI–SHORTT » indotta dall'*Histoplasma muris*;

g) quadri anatomo–clinici molto vari, sostenuti da specie fungine parassitarie eccezionali od occasionali, che volta a volta dovranno essere definiti.

Molte delle forme sopraelencate hanno in sè elementi anatomici, clinici e microscopici parassitari tali da permettere, oltrechè una perfetta individualizzazione della malattia, anche una diagnostica rapida con vantaggi innegabili per la prognosi e la terapia. Il granuloma coccidioide può essere considerato come una di queste forme.

Nelle prime parti di questa monografia sono riportate alcune notizie storiche circa la forma morbosa; dopo l'illustrazione dei primi incerti casi, sopratutto gli studi di RIXFORD e GILCHRIST contribuirono alla chiara individualizzazione della malattia. Seguirono le comunicazioni casistiche di moltissimi medici e studiosi, comunicazioni che continuano ancora oggi poichè il granuloma presenta sempre dei lati interessanti e necessitanti ricerche e chiarimenti, sopratutto dal punto di vista terapeutico. Qui ci limiteremo a tracciare molto sinteticamente le notizie epidemiologiche ed il quadro della malattia.

Prendiamo dalle notizie fornite dalla BECK (1931) nel suo rendiconto del 1931, alcuni dati interessanti: fino a quella data sono stati comunicati 286 casi dei quali 254 osservati in California. Pochissimi sono i casi da considerarsi autoctoni al di fuori delle Americhe; possiamo ricordare tra essi i tre casi illustrati da CASTELLANI e JACONO (1933) in Italia.

Sono più facilmente colpiti gli uomini nell'età media e particolarmente i contadini, e coloro che vengono a contatto di animali.

Il granuloma coccidioide è una forma morbosa molto polimorfa ad inizio ed evoluzione estremamente variabile, che tuttavia è sempre di una gravità notevole e quasi costantemente mortale. Essa è indotta da ceppi di *Coccidioides immitis* che hanno le prerogative da noi illustrate dei ceppi tipici e da altri ceppi che invece, sopratutto dopo uno studio biologico, sembrano essere in parte degradati e particolarmente diminuiti nelle loro attività patogenetiche; alcuni casi sono determinati da varietà che tuttavia non inducono forme allontanantesi notevolmente dalla media.

La malattia, nelle sue linee generali, può presentare delle caratteristiche abbastanza costanti che sono state variamente valorizzate dagli studiosi per definire dei tipi di decorso. (OPHÜLS, JACOBSON, NEWTON EVANS e HOWARD BALL). Con questi due ultimi autori si può considerare il granuloma come riportabile a tre tipi principali:

a) un primo tipo è costituito da forme rappresentate da una localizzazione assolutamente circoscritta al polmone; i pazienti muo-

iono prima che si verifichi una disseminazione del processo ad altri organi;

b) un secondo tipo è rappresentato da quei casi nei quali accanto ad una circoscritta e relativamente moderata lesione polmonare, compaiono lesioni cutanee e sottocutanee più o meno gravi con rapide disseminazioni (in questi casi la durata della malattia si aggira sui 10 mesi);

c) nel terzo tipo possono essere considerate quelle forme caratterizzate da modicissime lesioni polmonari e scarse lesioni cutanee per cui i pazienti possono ancora sopravvivere per qualche anno.

Secondo qualche autore è necessario considerare anche casi con lesioni cutanee primitive, seguite da disseminazioni più o meno abbondanti ad organi interni (meningee, ossee, ecc.).

È certo che la localizzazione primaria sembra essere polmonare nella maggior parte dei casi: clinicamente i sintomi polmonari vanno da quelli di una broncopolmonite, di una tubercolosi a tipo essudativo, fino alle varie manifestazioni della tubercolosi subacuta e cronica. È in questi casi che la natura del processo può rimanere occulta per qualche tempo, potendosi la sua sintomalogia confondere con quella di lesioni specifiche tubercolari: è l'esame batterioscopico e biologico dell'espettorato che permette una diagnosi sicura rivelando gli elementi fungini tipici e che permette la riproduzione sperimentale del granuloma.

Sotto questo punto di vista la diagnostica non presenta grandi difficoltà.

Le lesioni cutanee sia primitive che secondarie alla localizzazione polmonare sono varie: secondo JACOBSON si possono distinguere in dermiche, sottodermiche ed a carattere di scrofuloderma. Le prime, che possono comparire in punti svariatissimi del corpo, sopratutto sulle parti scoperte, sono in forma di noduli indolori, duri, di colorito roseo o rosso scuro, che si ulcerano successivamente dando un pus mucoso, denso, nel quale si incontrano le forme parassitarie. Talora le forme ulcerative prendono carattere papillomatoso o fungoso.

Le lesioni sottocutanee hanno il carattere di tumore mollicci, o sono a tipo ascessuale o gommoso. Il tipo scrofulodermico mostra localizzazione preferenziale ai gangli della regione clavicolare, ma compare anche in altre stazioni linfoghiandolari: i linfonodi, dapprima duri, aumentano di volume, si rammolliscono e si ulcerano.

La diagnostica differenziale deve essere discussa con processi di natura tubercolare, sporotricosica, con localizzazioni di natura paracoccidioide, con forme cutanee verrucose di origine fungina, di origine leishmaniosica, ecc. In genere gli elementi che possono permettere una sicura diagnosi differenziale e la precisazione della natura del processo coccidioide sono, da un punto di vista anatomico e clinico, molto pochi: è in ogni

caso l'esame batterioscopico, batteriologico e biologico dei materiali patologici che permette la soluzione del problema diagnostico.

Il decorso della malattia è relativamente rapido; infatti una percentuale molto alta di casi ha esito letale dopo 2–3 mesi; un'altra percentuale press'a poco ugualmente alta evolve in un periodo di 1–2 anni; rari sono i casi che durano più a lungo (da 5 a 9 anni); questi dati sono stati raccolti in uno studio su 182 casi da CUMMINS, SMITH e HALLIDAY. Tra le forme con decorso a caratteri estremi (forma acuta polmonare, forma cronica polmonare–cutanea circoscritta), vi sono dei casi a carattere subacuto intermedio, rappresentati dalla tendenza ad una progressiva estensione del processo con remissioni e ricadute che si svolgono in un periodo da sei mesi ad un anno.

Da un punto di vista anatomo–patologico generale, il quadro delle lesioni è quello di un granuloma che nell'uomo non presenta, microscopicamente, alcuna particolare differenza da quanto noi abbiamo descritto per le lesioni sperimentali: si tratta di focolai granulomatosi diffusi o conglomerati, ora con prevalenze di fatti essudativi, ora con quella di fatti produttivi (sopratutto nelle forme subacute e croniche); la localizzazione del processo può aversi in tutti gli organi: fa eccezione l'apparato gastro–intestinale nel quale tratto sembra infatti non sieno mai state segnalate localizzazioni. Questo fatto ha un certo interesse anche per la diagnostica differenziale con il granuloma paracoccidioide, dove invece le lesioni intestinali sono conosciute e relativamente frequenti.

Nel polmone il quadro anatomo–patologico ricorda quello di lesioni specifiche tubercolari, con ingorgo dei gangli ilari: si distinguono delle lesioni a carattere acuto, disseminato, miliare o submiliare; delle lesioni che ricordano i focolai broncopneumonici, talora con indurimento e retrazioni sclerotiche. Microscopicamente i quadri variano da granulomi a tipo microascessuale fino a forme a focolai con lesioni cavitarie, con sclerosi, ecc. Le pleure partecipano al processo.

Le ossa costituiscono una delle sedi di predilezione per la localizzazione parassitaria. Frequenti appaiono le lesioni renali.

L'apparato linfatico relativamente a quanto si osserva per il granuloma paracoccidioide brasiliano è raramente colpito: ciò che ha anche un certo valore per la diagnostica differenziale. Ricordiamo però che in alcuni casi la sede del processo può apparire primitiva e localizzata solo ai gangli.

La milza, il fegato, il cuore e gli altri organi sono colpiti con minor frequenza.

Il procedimento diagnostico può raggiungere rapidamente il suo fine ultimo se si procede subito all'esame del materiale patologico: questo che è rappresentato da pus, espettorato, frammenti biopsici, ecc., fornisce rapidamente, anche ad un esame a fresco ed in ogni caso ad un esame

batterioscopico con i metodi comuni, gli elementi per precisare, oltre chè la natura fungina della malattia, anche il preciso agente eziologico. È il reperto, che si può ritenere costante, degli sporangi tipici in tutti i materiali patologici che permette di formulare la diagnosi di granuloma da *Coccidioides immitis*: non si conosce infatti, sino ad ora, un altro microorganismo che si presenti nei tessuti sotto la tipica forma dello sporangio maturo (eccezion fatta per il *Rhinosporidium Seeberi* che nelle caratteristiche formazioni polipose del naso e nel granuloma della congiuntiva mostra degli sporangi che in ogni caso sono molto più grandi e molto più ricchi in sporangiospore che non quelli del *Coccidioides immitis*; ma le due forme morbose non si possono confondere poichè le loro caratteristiche cliniche ed anatomiche sono nel contempo molto dissimili).

La prova batterioscopica può essere completata dalle indagini batteriologiche e biologiche: il *Coccidioides immitis* si coltiva facilmente, dai tessuti patologici (più difficile è la coltivazione del *Paracoccidioides brasiliensis*); col fungo si riproduce nella cavia, e con grande facilità, un granuloma nel quale si rinviene costantemente il tipico parassita.

Tali ricerche di laboratorio, con la dimostrazione del ciclo parassitario del fungo, in ogni caso molto facile a reperirsi (anche le ricerche batteriologiche e biologiche possono svolgersi in breve tempo), e permettono senz'altro di differenziare la forma coccidioide dalla analoga paracoccidioide, dalla dermatite verrucosa di GILCHRIST, dalla tubercolosi, da micosi cutanee od interne di varia natura, da lesioni leutiche o leishmaniosiche.

Senza l'aiuto delle prove di laboratorio la diagnostica differenziale può presentare delle notevoli difficoltà e talora riesce impossibile la precisazione della natura del processo.

Il trattamento con numerosi medicamenti (come preparati iodo-iodurati, cristal-violetto, violetto di genziana, tartaro emetico) raggi X, interventi chirurgici, ha dato sempre risultati molto incerti e per lo più insufficienti ad arrestare la malattia. Sembra che si sia ottenuto qualche favorevole risultato con metalli colloidali e con l'uso della *Coccidioidina B.* Al momento attuale non si conosce un procedimento terapeutico veramente efficace.

RIASSUNTO

Lo studio è stato effettuato in base alla completa e personale revisione dei caratteri morfologici, culturale, biochimici e patogenetici di 15 ceppi di *Coccidioides immitis* Stiles. Si è premesso un esame della storia del genere e delle specie, basato sulla revisione di tutta la letteratura, dalle prime osservazioni del CANTÓN e di WERNICKE nel Sudamerica, di RIXFORD, GILCHRIST ed OPHÜLS in Nordamerica, sino alla più recente

letteratura americana sull'argomento. Come conclusione, l'unico genere valido è *Coccidioides*, e contiene una sola specie: *C. immitis*. I caratteri culturali sono molto uniformi in tutti i ceppi (salvo che nel « ceppo WEIDMAN », N. 2322 distinto in base a questi ed altri caratteri in una varietà: var. *Pipkini* nobis); in presenza di carboidrati si hanno colonie bianche, rasate, semplici; in assenza di carboidrati esse sono più o meno granuloso-plicate. Le esperienze di cultura in substrati naturali sterili vegetali od animali (crine, capelli, unghie, piuma, piumino, terra, letame, fieno, ecc.) dimostrano la possibilità di una conservazione del *C. immitis* in natura all'infuori dell'organismo animale. Per la cultura in laboratorio è indispensabile la presenza di una sostanza organica azotata a molecola complessa. I caratteri biochimici sono altrettanto uniformi, salvochè la produzione di pigmento bruno in terreni solidi e liquidi zuccherati che però è un carattere variabile e senza applicazione nella distinzione di specie o varietà. I ceppi non fermentano nessun idrocarbonato e di solito alcalinizzano debolmente e lentamente il substrato; non scindono l'esculina; liquefanno lentamente la gelatina; producono indolo; non hanno azione sul latte. Circa l'azione inibente del violetto di genziana e del trypanrot vi sono delle leggere differenze tra i vari ceppi.

La micromorfologia, su ordinari terreni di cultura in laboratorio, è molto semplice: si hanno delle ife con delle rare clamidospore isolate e di solito intercalari. Si può giungere ad una morfologia più complessa ma essa è data solamente dalle varie aggregazioni delle forme precedenti e dalla produzione di forme involutive, coltivando i ceppi in semianaerobiosi con una tecnica studiata appositamente. Risultati del più alto interesse si ottengono nelle culture in anaerobiosi completa in liquido di LOECKE più siero di sangue o liquido ascite. Con il « ceppo MOORE » si è giunti alla produzione di piccoli sporangi con zoospore *in vitro*. Un fenomeno accertato per la prima volta è quello della presenza di fatti sessuali tra zoospore, le quali si coniugano a due per due (raramente per terne). Questo fatto è stato da noi ampiamente illustrato ancorchè il fenomeno di coniugazione si arresti alla copula e l'ulteriore evoluzione dei gameti ci sia ignoto. Dal punto di vista patogenetico alcuni ceppi mostrano intensi caratteri di aggressività verso animali recettivi nei quali inducono granulomi che conducono a morte gli animali; altri ceppi inducono malattie locali con tendenza alla risoluzione spontanea. In ogni caso la formazione di zoosporangi e di zoospore aflagellate (endospore) evolventisi dalle clamidospore od ipnospore delle culture si ha solo nei tessuti animali viventi (a parte il raro reperto ottenuto in terreni speciali ed in anaerobiosi).

Tutto questo complesso di prove ci ha permesso di dividere i ceppi studiati in due gruppi: ceppi normali, virulenti, e formanti numerosi e bene sviluppati zoosporangi contenenti molte zoospore nei tessuti; ceppi

degradati a scarsa virulenza, formanti solo rari zoosporangi che non maturano zoospore o solo poche ed a scarsa vitalità. Alcuni di questi ceppi degradati derivano certamente dai ceppi virulenti, per essere stati lungamente coltivati in condizioni sfavorevoli.

Tra questi ultimi ceppi il più interessante è la *Glenospora meteuropea* Castellani ceppo italiano, che costituirebbe il primo ceppo autoctono europeo mantenuto in cultura.

Il *C. immitis* è stato studiato in maniera molto completa anche sotto il punto di vista citologico e si è arrivati ad una sistemazione di esso in seno ai quadri micologici attraverso una accurata revisione delle caratteristiche morfologiche e citologiche, anche per l'accertamento del fatto (fondamentale per questo genere di ricerche) che il sacco sporifero materno appare essere uno sporangio anzichè un asco. Un analogo esame è stato effettuato per il fenomeno della coniugazione in *Coccidioides* in rapporto alla sessualità dei Ficomiceti. Si è in tal modo confermata l'ipotesi da noi precedentemente esposta di una derivazione delle Coccidioidaceae dalle Cladochytriaceae (*Catenaria*) attraverso le Hyphochytriaceae, ed i rapporti tra Coccidioidaceae e Rhinosporidiaceae. Le idee del MOORE circa una identità tra *Posadasia* ed *Histoplasma* ed il *mixtum compositum* creato nella famiglia Coccidioidaceae in base alla sistematica da lui proposta, sono criticate.

Il « ceppo WEIDMAN », N. 2322 che manifesta tutto un complesso di caratteristiche debolmente ma nettamente differenti da quelle degli altri ceppi studiati, è stato distinto come una varietà sotto il nome di *Coccidioides immitis* var. *Pipkini* nobis; altrettanto si è fatto con la *Glenospora meteuropea* Castellani, che è stata definita come *Coccidioides immitis* var. *metaeuropaeus nobis*.

Tra gli altri ceppi studiati si sono riportati al tipo anche il *Blastomycoides dermatitidis* Castellani ed il *Geotrichum louisianoideum* Castellani, nonchè la *Scopulariopsis americana* Ota. Chiudono il lavoro le diagnosi della specie e delle varietà, una completa sinonimia di esse, che, per il solo *Coccidioides immitis* importa diciotto sinonimi, e una sintetica illustrazione anatomo-clinica del granuloma coccidioide.

LETTERATURA CITATA

1. AGOSTINI A. (1932), *Su due ifomiceti isolati da micosi umane: « Blastomycoides immitis » (Rixford e Gilchrist) Castellani e « Blastomycoides tulanensis » Cast.* « Atti Istit. Bot. di Pavia », serie 4ª ,vol. III, pag. 1–8, estr., 3 figure.
2. AHLFELDT F. E. (1929), *Special observations on the morphology of « Coccidioides immitis ».* « Journ. Inf. Dis. », vol. XLIV, pag. 277–281.
3. ALMEIDA F. (DE) (1932 *a*), *Contribuiçâo para o estudo da morphologia do « Coccidioides immitis » nos tecidos parasidos.* « Annaes da Faculdade de Medicina de S. Paulo », vol. VII, parte 1ª, pag. 1–9, 10 figure.
4. — (1932 *b*), *Consideraçoês em torno do « Coccidioides immitis » e do « Pseudococcidioides mazzai ».* « Ann. da Faculdade de Medic. de S. Paulo», vol. VII, parte 2ª, pag. 1–11, 20 figure.
5. — (1933), *As blastomycose no Brasil* « Ann. da Faculd. de Med. de Sâo Paulo », vol. IX, pag. 1–97, 67 figure.
6. ATKINSON C. F. (1915), *Phylogeny and relationship in the Ascomycetes.* « Ann. Missouri Bot. Gart. », vol. II, pag. 315–376.
7. BAINIER D. (1907), *Mycothèque de l'École de Pharmacie,* XII–XVII. « Bull. Soc. Mycol. de France », vol. XXIII, pag. 90–114, con tavole, (pag. 98).
8. BASGAL W. (1931), *Contribuiçâo ao estudo des Blastomycoses pulmonares.* Tesi della Facoltà di Medicina. Rio de Janeiro.
9. BECK D. (1931), *The coccidioidal granulome. Epidemiology.* « Californian Depart. of Public Health. Special Bull. », n. 57.
10. BROWN P. K. e CUMMINS W. T. (1915), *A differential study of coccidioidal granuloma.* « Arch. Int. Med.» vol. XV, pag. 608.
11. BRUMPT E. (1927), *Precis de Parasitologie.* Paris.
12. BÜREN v. G. (1915), *Die Schweizenschen Protomycetaceen mit Besonderer Berücksichttigung ihrer Entwicklungsgeschichte und Biologie.* « Beitr. Kript. Fl. d. Schweiz », vol. V, pag. 1–55, tav. 1–7
13. — (1922), *Weitere Untersuchungen ueber die Entwicklungeschichte und Biologie der Protomycetacee.* « Ibid. », vol. V (3), pag. 1–94.
14. BUMP W. S. (1925), *Observations on growth of « Coccidioides immitis »,* « Journ. Infect. Dis. », vol. XXXVI, pag. 561–565.
15. BUTLER E. J. (1928), *Morphology of the Chytridiaceus Fungus « Catenaria anguillulae » in Liver-Fluke eggs.* « Ann. Bot. », vol. XLII, n. 168, pag. 813–821, fig. 1–18.
16. BUCKLEY J. J. C. (1927), *« Catenaria anguillulae » as a parasite of the ova of « Fasciola hepatica ».* « Sci. Proc. Roy. Dubl. Soc. », vol. XVIII, pag. 457–512, tav. 23–26.
17. CASTELLANI A. (1927–28), *Fungus and Fungous Diseases* (« Ad. Gehrmann Lect. of the University of Illinois, Coll. of Med. », 1926); « Arch. of Derm. and Syph. », pa-

gina 383, 571, e 714, 1927; pag. 61, 194 e 354, 1928, con figure; estratto, pag. 1–203, 1928, Amer. Med. Ass., Chicago.

18. CASTELLANI A. (1928) *a*), *Blastomycosis and some other condition due to yeast-like Fungi (Budding Fungi).* « Amer. Journ. of Trop. Med. », vol. VIII, n. 5, pag. 379–422, 20 fig.

19. — (1928) *b*), *Considerations on the Fungi found in Blastomycosis.* Amer. Medic., N. S., vol. XXIII, n. 5, pag. 289–295, figure.

20. — (1930) *a*), *The Fungi found in North American Blastomycosis; their plurality of Species.* « Brit. Jour. Dermat. and Syphil. », vol. XLII, pag. 365–374, 1 tav., 14 figure.

21. — (1930) *b*), *Champignons observées dans les Blastomycoses americaines. Pluralité des éspèces.* I Congr. Inter. de Microb. Paris., pag. 1–11, estratto, 10 figure.

22. — (1933), *Blastomycosis: a short general account.* « The Med. Press. and Circ. »; maggio 31, pag. 1–16, estratto.

23. CASTELLANI A. e JACONO I. (1933), *Observations on Fungi isolated from Cases of Blastomycosis cutis and Blastomycosis pulmonalis in North America and Europa. Remark on Blastomycetin.* « Journ. Trop. Med. and Hyg. », vol. XXXVI, n. 20, pag. 287–321, 56 figure, 1 tavola.

24. CIFERRI R. (1930), *Les affinités de quatre Protistes symbiotes de l'homme et des animaux.* « Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. », vol. III, fasc. 8, pag. 1–4, estratto.

25. — (1932), *Sulla posizione sistematica del genere « Coccidioides » e di tre generi affini.* « Arch. f. Protistenk. » vol. LXXVIII, fasc. 2, pag. 238–262, 2 fig., 3 tav.

26. — — e REDAELLI P. (1929), *Studies in Torulopsidaceae: A trial general systematic Classification of the Asporigenous Ferments.* « Ann. Mycol. », vol. XXVII, n. 3–4, pag. 243.

27. CIFERRI e REDAELLI (1934) *a*), *« Coccidioides immitis » et « Paracoccidioides brasiliensis » comme producteurs d'ammoniaque au depense des substances organiques azotées.* « Boll. Sez. Ital. della Soc. Intern. di Microbiol. », fasc. 4°, pag. 1–5, estratto, aprile.

28. — — (1934 *b*), *Phénomènes de conjugaison et d'endosporulation « in vitro » du « Coccidioides immitis » Stiles.* « Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. », fasc. 5°, pag. 1–7, estratto, maggio.

29. — — (1934) *c*), *De la position sistematique du « Coccidioides immitis » Stiles.* « Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. », fascicolo 1°, pag. 1–6, estratto, ottobre.

30. — (1934) *d*), *Studi sul « Coccidioides immitis » Stiles. I fenomeni di endosporulazione e di coniugazione « in vitro »*, « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », vol. IX, fasc. 7°, pag. 602–603.

31. — — (1934) *e*), *Studi sul « Coccidioides immitis » Stiles.* III: *La vita saprositica del fungo ed il suo potere ammonizzante.* « Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim. », vol. IX, fasc. 8, pag. 746–748.

32. — — (1934) *f*), *Studi sul « Coccidioides immitis » Stiles.* IV: *Caratteristiche culturali, biochimiche, patogenetiche e micromorfologiche « in vivo » ed « in vitro » dei ceppi tipici.* « Boll. della Soc. Ital. di Biol. Sperim. », vol. IX, fasc. 9, pag. 961–962.

33. — — (1934) *g*), *Studi sul « Coccidioides immitis » Stiles.* V: *Caratteristiche culturali, biochimiche, patogenetiche e micromorfologiche « in vivo » ed « in vitro » dei ceppi degradati.* « Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim. », vol. IX, fasc. 9, pag. 963–964.

34. CIFERRI e REDAELLI (1935) *a*), *Prima contribuzione allo studio delle cosidette Blastomicosi americane. Gli « Endomyces » del gruppo « dermatitidis-capsulatus » agenti della dermatite verrucosa micosica di Gilchrist.* « Atti Istit. Bot. della Università di Pavia », serie 4ª, vol. VI, pag. 55–105, 12 figure.

35. — — (1935) *b*), *Contribuzioni alla sistematica delle Torulopsidaceae XV-XXXIII.* « Arch. f. Mikrobiol. », vol. VI, fasc. 1º, pag. 9–72, con 50 figure.

36. — — (1935) *c*), *Paracoccidioidaceae N. Fam., istituita per l'agente del granuloma paracoccidioide (« Paracoccidioides brasiliensis »).* « Bollettino dell'Istituto Sieroterapico di Milano », vol. XV, fasc. II, pag. 97–102.

36-bis. — — e SCATIZZI I. (1936), *Unità etiologica della malattia di Seeber (granuloma da « Rhinosporidium Seeberi » accertata con lo studio di materiali originari.* « Boll. Soc. Med. Chir. Pavia » vol. XVI, fasc. 5, pag. 1–24, estr., 1 tav.

37. COOK IVIMEY W. R. (1928), *The Interrelationship of the Archimycetes.* « The New Phytol. ». Repr. n. 17, vol. XXVII, n. 4–5, pag. 1–53, 3 tavole, 111 figure.

38. FITZPATRICK H. M. (1930), *The Lower Fungi.* New York.

38-bis. FONSECA DA O. H. (1928), *Ensayo de revisión de las blastomycosis sudamericanas IV Reunión Soc. Patol. Region. Norte.* « Bol. Inst. Clin. Quir. », vol. IV, pag. 469–501, 19 figure; « Prensa Med. Argent. », n. 12, pag. 513–536.

39. GAÜMANN E. (1926), *Vergleichende Morphologie der Pilze* Jena, pag. X 626, 398 figure.

40. — — e DODGE C. W. (1928), *Comparative Morphology of Fungi.* I edizione ingl., pag. XIV–901, New-York.

41. GRIGGS R. F. (1912), *The development and cytology of « Rhodochytrium »*, « Bot. Gaz. » vol. LIII, pagine 127–173, tav. 11–16.

42. GUÉGUEN F. (1899), *Variations morphologiques d'un « Monilia » sous l'influence de la culture.* « Bull. Soc. Mycol. de France », vol. XV, pagine 271–275, 15 figure.

43. HARTMANN M. (1912), *Demonstration eines neuer Menschen pathogenen Protisten.* « Zentrbl. f. Bakter. I Abt. Ref. », vol. LIV; supp. pag. 253-255, 1 figura.

44. — — e SCHOO H. J. M. (1912), *Over Blastosporidiose.* « Nederl. Tijdsch. v. Gemesk. », fasc. 2º.

45. HARPER R. A. (1899), *Cell divisione in sporangia and asci.* « Ann. Botany », vol. XIII pag. 467–525, tav. 24–26.

46. JUEL H. O. (1921), *Cytologische Pilzstudien II. Zur Kenntnis einiger Hemiasceen.* « Nova Acta Reg. Soc. Sci. », Upsal (4ª serie), vol. V, pag. 3–43, tav. 1–2.

47. KAWATSURE S. (1933), *Tierexperimentelle Untersuchungen ueber die Erreger von Sogenannten amerikanischen Blastomykosen: « Scopulariopsis americana », « Aleurisma tulanense » und « Coccidioides immitis ».* « Arch. f. Dermat. u. Syphil. », vol. CLXV, fasc. 2º, pag. 173–190.

48. KUSANO S. (1912), *On the life history and cytology of a new Olpidium with special reference to the copulation of motile isogametes.* « Journ. Coll. Agr. Tokio », vol. IV, pag. 141–199, tav. 15–17.

49. LANGERON M. (1922), *Les Blastomycoses.* « Nouveau Traité de Medicine ». Roger, Vidal, et Teissier. Vol. IV, pag. 510.

50. — — et TALICE R. V. (1932), *Nouvelle methodes d'étude et essai de classification des champignons le-*

vuri formes. « Ann. de Parasitol. Hum. et Comp. », vol. X, fasc. 1°, pag. 1–80, figure.

51. LOUBIÈRE A. (1924), *Recherches sur les Mucedinées caseicoles.* Thèse D. Paris.

52. MAGALHÂES O. (DE) (1932), *A classificação do « Oidium brasiliense » « Neogeotrichum pulmoneum », n. g. (O. Magalhães, 1914) emend. O. Magalhães, 1931.* « Inst. O. Cruz. Mem. », vol. XXVI, pag. 151–168.

53. MASSEE G. E. (1908), *New or critical british Fungi.* « Journ. of Botany », vol. XLVI, pag. 151–155, con tavole.

54. MAZZA S. e PARODI S., (1928), *Una micosis chaqueña de la laringe causada por un nuevo tipo de hongo* « Inst. Clin. Chirurg. Boll. », volume IV, pag. 539–544.

55. MC NEAL W. J. e TAYLOR R. M. (1913), *« Coccidioides immitis » and Coccidioidal granuloma.* « Journ. Med. Res.», vol. XXX, pag. 261-274.

56. MELLO DE F. e FERNANDES G. L. (1918), *Ensayo de Classificaçaô do fungos pertenecentes a classe dos « Blastomyces », etc.* « Arq. Hyg. e Pat. Expt. Esc. Med. Trop. Lisboa », vol. VI, pag. 207 316.

57. MONTGOMERY D. W. (1900), *A disease caused by a fungus; the protozoye dermatitis of Rixford and Gilchrist.* « Brit. Journ. Dermat. », vol. XXI, pag. 343.

58. MOORE M. (1932), *Coccidiodal granuloma. A Classification of the causative agent « Coccidioides immitis ».* « Ann. Missouri Bot. Gard. », vol. XIX, pag. 397–428, tav. 25.

59. — (1935), *A morphological and physiological study of two species of « Posadasia ».* « Ann. Mo. Bot. Gard. », vol. XXII, pag. 335–360, tav. 5.

60. NEMEC B. (1912), *Zur Kenntnis der niederen Pilze.* I. *« Olpidium brassicae » und zwei « Entophlyctis – Arten ».* Bull. Inter. Acad. Sci. Bohème », vol. XVII, pag. 16–24.

61. OPHÜLS W. (1905) *a*), *Coccidiodal granulome.* « Amer. Med. Journ. », vol. XLV, pag. 1291–1296.

62. — — (1905) *b*), *Further observations on a pathogenic mould formerly describes as a Protozoon (« Coccidioides immitis, C. pyogenes »)* « Journ. Exp. Med. », vol. VI, pagine 443–486, tav. 34–38.

63. — — e MOFFIT H. C. (1900), *A new pathogenic Mould.* «Philadelphia Medic. Journ. », vol. V, pag. 1471.

64. OTA M. (1928), *Champignons parasites de l'homme* « Jap. Journ. of Dermat. », vol. XXVIII, n. 4, pag. 1–7 e 1-211 (in giapponese con riassunto francese).

65. — — e KAWATSURE S. (1933). *Zur Aetiologie der echten und falschen Balstomycosen, besonders der Gilchristschen Krankheit.* « Arch. f. Derm. u. Syphyl. », vol. CLIX, fascicolo 2°, pag. 149 174, figure.

66. POSADAS A. (1892), *Un nuevo caso di mycosis fungoides con psorospermia.* « Ann. del Circ. Med. Argent. », vol. XV, pag. 586.

67. — (1900), *Psorospermiose infectante generalisée.* « Rev. d. Chir. », vol. XXI, pag. 276 282.

68. RAMSBOTTOM J. (1914), *Recent published results on the cytology of fungus reproduction.* « Trans. Brit. Myc. Soc. », vol. IV, pag. 249–291.

69. REDAELLI P. (1930), *Notizie sulla biologia del « Coccidioides immitis » e sulla sua posizione sistematica.* « Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim. », vol. V, n. 5, pag. 752.

70. — (1935), *La moderna sistemazione delle cosidette « blastomicosi ».* « Giornale italiano di Dermatologia e Sifilologia », fasc. 2, pag. 1.

71. REDAELLI e CIFERRI R. (1934) *a*), *Studi su « Coccidioides immitis » Stiles II: La presenza del granuloma coccidioide in Europa.* « Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim. », vol. IX, fasc. 9°, pag. 998–1001.

72. — — (1934) *b*), *Etudes sur le « Coccidioides » immitis Stiles II: Présénce du granulome coccidioide en Europe.* « Boll. Sez. Ital. della Soc. Intern. di Microbiol. », fasc. 7–8°, pag. 1–6, estratto, Luglio e Agosto.

73. — — (1934) *c*), *Affinité entre les agents de l'histoplasmose humaine, du farcin equin et d'une mycose spontanée des muridés.* « Boll. della Sez. Italiana della Soc. Intern. di Microb. », fasc. 10°, pag. 1-6, estratto, ottobre.

74. RIXFORD E. (1931), *Early history of Coccidioidal Granuloma in California.* « Calif. Depart. of Public. Health. Spec. Bull. », n. 57.

75. — (1894) *a*), in « Occident. Med. Times », maggio, pag. 326.

76. — (1894) *b*) in « Occident. Med. Times », pag. 703–704.

77. — — e GILCHRIST T. C. (1896), *Two cases of Protozoan (Coccidioidal) infection of the Skin and other organs. I. First case: Protozoan or Coccidioidal pseudo-tubercolosis. II, A second case of protozoan infection.* « Johns Hopkins Hosp. Report », vol. I. pag. 206–268.

78. SARTORY A. (1920), *Les champignons parasites de l'homme et des animaux.* Strassbourg.

79. SOPP. O. (1912), *Monogr. Penicilia.* « Vidernsk. Selsk. I. Mat. Naturw. Kl. », n. 11, pag. 42.

80. SOROKIN N. W. (1876), *Note sur les végétaux parasites des Anguillulae.* « Ann. Sc. Nat. », 6 serie, vol. IV, pag. 72–78, tavole.

81. SWINGLE D. B. (1903), *Formation of spores in the sporangia of « Rhizopus nigricans » and of « Phycomyces nitens ».* « Bur. Plants Industry Bull.», vol. XXXVII, pag. 1–49, 6 tavole.

82. THAXTER (1922), *A Revision of the Endogeneae.* « Proc. Amer. Acad. Arts a. Sc.». vol. LVII, pag. 291-341.

82-bis. THOM C. (1930), *The Penicillia.* London, pag. VII–644, figure.

83. TIMPANO M. (1930), *Osservazioni sul granuloma coccidioide e sul « Coccidioides immitis »*, « Boll. Soc. Med. Chir. di Pavia », vol. XLIV, fasc. 6°, pag. 1–43, estratto, 2 tavole.

84. VUILLEMIN P. (1912) *a*), *Difference fondamentale entre le genre « Monilia » et les genres « Scopulariopsis », « Acremonium » et « Catenularia ».* « Bull. Soc. Myc. de France », vol. XXVII, pag. 137–152, figure.

85. — (1912), *Les Champignon. Essai de Classification. (II. Systèmes Phylogenétiques)*, pag. 444, Paris.

86. — (1931), *Les champignons parasites et les mycoses de l'homme.* « Enc. Mycol. », vol. II, Paris.

87. WALKER L. B. (1923), *Some observations on the development of « Endogone malleola» Hark.* «Mycol.» vol. XV pag. 245–257, tav. 26–27, fig. 1–3.

88. WERNICKE R. (1892), *Ueber einen Protozoenbefund bei Mycosis fungoides?* « Zentrbl. f. Bakter », I Abt., vol. XII, pag. 859–861.

89. WOLBACH S. B. (1904), *The Life-cycle of the organism of Dermatitis coccidioides.* « Journ. Med. Res. », vol. XIII, pag. 53.

90. ZOPF W. (1884), *Zur Kenntnis der Phycomyceten. I. Zur Morphologie und Biologie des Ancylisteen und Chytridiaceen.* « Nov. Act. d. K. Leop-Car. Deutsch. Akad. Naturw.» vol. XLVII, fasc. 4°, pag. 143–236, tav. 12–21.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

TAVOLA I. – *Coccidioides immitis* Stiles, « ceppo CASTELLANI ».

Fig. *a*) Zoospora aplanetica ancora racchiusa nello zoosporangio materno con un nucleo intensamente colorato, ma con plasma in parte vacuolato e lo strato periferico del citoplasma leggermente ematossilinofilo.

» *b*) Come la precedente ma in istato di regressione, a forma irregolare e nucleo ipertrofico, vacuolizzato in parte ed a colorazione irregolare.

» *c*) Zoospora normale.

» *d*) ed *e*) Stadi repressivi del nucleo di zoospore mature, con formazione di nuclei figli incompletamente differenziati ed emissione di cromatina sparsa per il citoplasma.

» *f*) Giovane zoosporangio cenocitico con nuclei abbastanza evidenti nello stadio anteriore al clivaggio del protoplasma.

» *g*) Giovane zoosporangio mostrante granuli di cromatina diffusi e plasma vacuolizzato a tinzione irregolare; a destra sono visibili residui del nucleo originario.

» *h*) Zoosporangio quasi maturo mostrante zoospore in parte differenziate con nuclei normali e nuclei in vari stadi regressivi.
(Colorazione all'ematossilina ferrica).

TAVOLA II. – *Coccidioides immitis* Stiles, « ceppo CASTELLANI ».

Fig. *a*) Colonia gigante in agar glucosato Difco dopo 30 giorni a temperatura ambiente, in grandezza naturale.

» *b*) Zoospore dal pus del granuloma sperimentale della cavia che germinano in acqua peptoglucosata.

» *c*) Zoosporangio maturo in granuloma sperimentale della cavia invaso da polimorfonucleati neutrofili.

» *d*) Zoosporangio in granuloma sperimentale della cavia, allo stadio di differenziazione delle masse nucleari e quindi delle zoospore.

TAVOLA III. – Colonie giganti di vari ceppi di *C. immitis* Stiles, in agar glucosato Difco, dopo 30 giorni a temperatura ambiente ed in grandezza naturale.

Fig. *a*) *Blastomycoides louisianoideum* Castellani.

» *b*) « Ceppo *Weidman* », N. 1091.

» *c*) « Ceppo *Weidman* », N. 1136.

» *d*) *Blastomycoides dermatitidis* Castellani.

TAVOLA IV. – *Coccidioides immitis* Stiles, « ceppo WEIDMAN » N. 1676.

Fig. *a*) Zoospore in via di maturazione nei tessuti granulomatosi della malattia sperimentale della cavia.

» *b*) Zoosporangio maturo nel centro di un microascesso del granuloma sperimentale della cavia, con invasione secondaria di polimorfonucleati neutrofili.

» *c*) Artrospore di forma irregolare, formatesi in culture semianaerobiotiche a temperatura ambiente dopo oltre tre mesi.

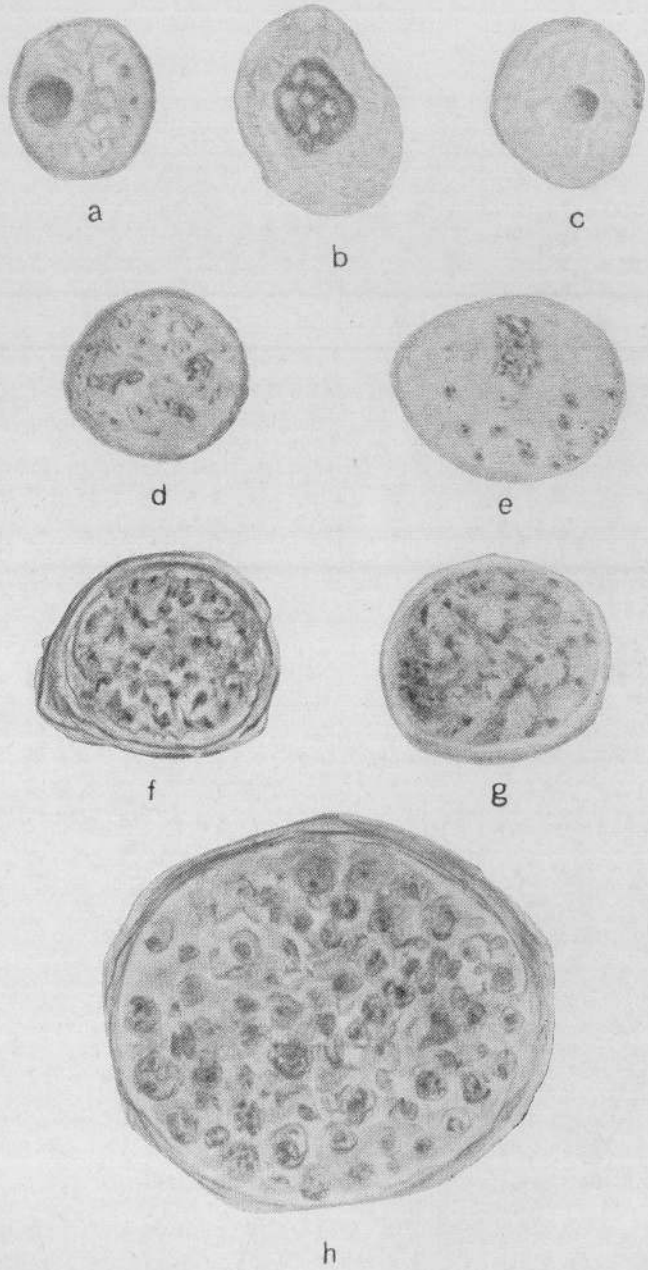
Fig. *d*) Zoosporangio con differenziazione non completa di zoospore nei tessuti granulomatosi della malattia sperimentale della cavia.
» *e*) Colonia gigante in agar glucosato Difco, dopo 30 giorni, a temperatura ambiente; grandezza naturale.

TAVOLA V. – *Coccidioides immitis* Stiles var. *Pipkini* («Ceppo WEIDMAN» N. 2322).
Fig. *a*) Zoosporangio maturo ampiamente invaso di polimorfo – nucleati neutrofili nel granuloma sperimentale della cavia.
» *b*) Zoosporangio che, contenuto nel pus di focolai ascessuali del granuloma della cavia, presenta germinazione di spore ancora contenute nel sacco materno.
» *c*) ed *e*) Zoosporangio maturo nel tessuto granulomatoso della malattia sperimentale della cavia.
» *d*) Colonia gigante in agar glucosato Difco dopo 20 giorni a temperatura ambiente; grandezza naturale.
» *f*) Vacuolazioni e formazioni di numerose gocciole lipidiche seriate negli elementi micelíali del fungo in culture semianaerobiotiche a temperatura ambiente di oltre 120 giorni di età.

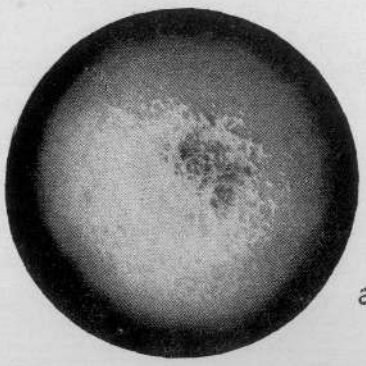
TAVOLA VI. – *Coccidioides immitis* Stiles «ceppo WEIDMAN» N. 1136 (fig. *a*) *b*) *e*)); e *Glenospora meteuropea* Castellani (fig. *c*) *d*)).
Fig. *a*) Colonia gigante in agar glucosato Difco, dopo 30 giorni a temperatura ambiente; grandezza naturale.
» *b*) Sporangio maturo nel pus del granuloma sperimentale della cavia.
» *c*) Colonia gigante in agar glucosato Difco, dopo 30 giorni a temperatura ambiente, grandezza naturale.
» *d*) Zoosporangio atipico per sofferenza, nel granuloma sperimentale della cavia.
» *e*) Zoospore del pus del granuloma sperimentale della cavia germinanti nell'acqua peptoglucosata.

TAVOLA VII. – *Coccidioides immitis* Stiles, «ceppo MOORE»: morfologia di zoospore e zoosporangi in cultura anaerobiotica secondo il metodo MAC NEAL e TAYLOR, in liquido LOECKE modificato, dopo 30 giorni a temperatura ambiente.
Fig. *a*) Forme involutive di zoospore mostranti una retrazione del protoplasma a forma di mezzaluna.
» *b*) e *c*) Coniugazione apparentemente triple di zoospore.
» *d*) e *h*) Coniugazione normali di zoospore.
» *e*) e *g*) Zoosporangi lisci ed echinulati a morfologia ridotta formatisi al di fuori dell'ambiente animale.
» *f*) Zoospore in coniugazione e zoospore in varie forme involutive.

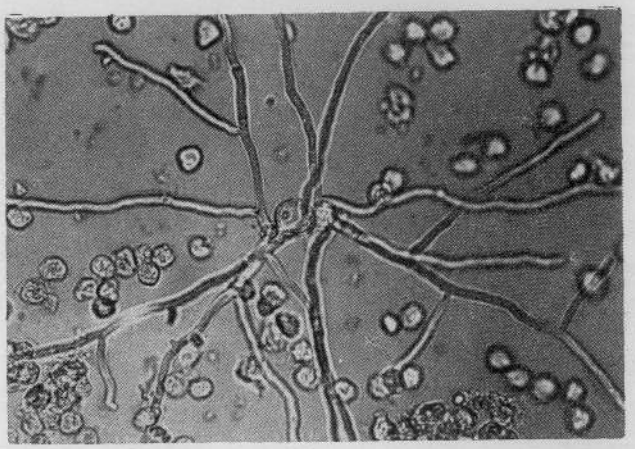
TAVOLA VIII. – *Coccidioides immitis* Stiles, «ceppo WEIDMAN» N. 1091 (fig. *a*, *c*), «ceppo CIFERRI» (fig. *b*).
Fig. *a*) Culture a temperatura ambiente, di oltre 100 giorni di età, su substrati naturali: su crine di cavallo (1), su capelli umani (2) e su piumino d'oca (3).
» *b*) Come la precedente; su unghia fresca di cavallo (1) su crine di cavallo (2) e su piumino d'oca (3).
» *c*) Come la precedente; su fieno secco (1), su letame fermentato (2) e su piume di gallinacei (3).



R. CIFERRI e P. REDAELLI.

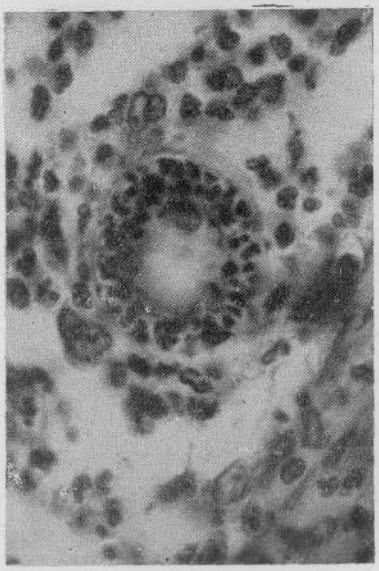


a



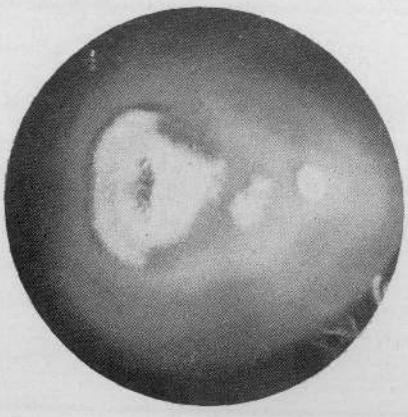
b

c

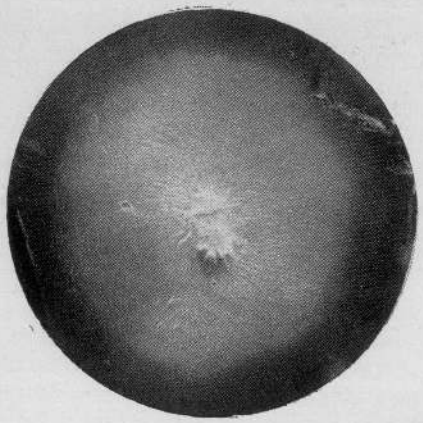


d

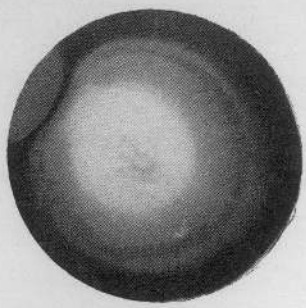
R. Ciferri e P. Redaelli.



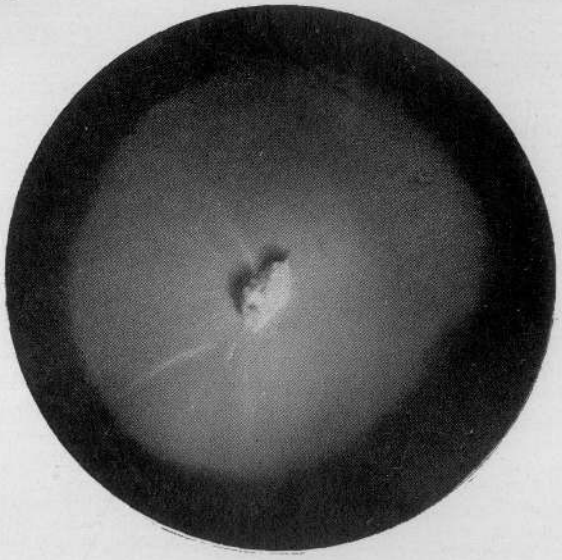
a



b

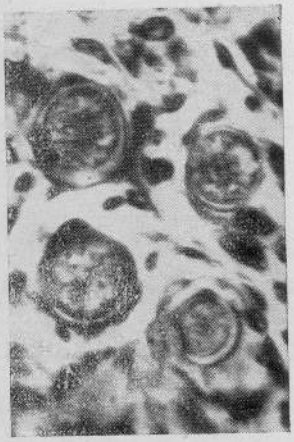


c

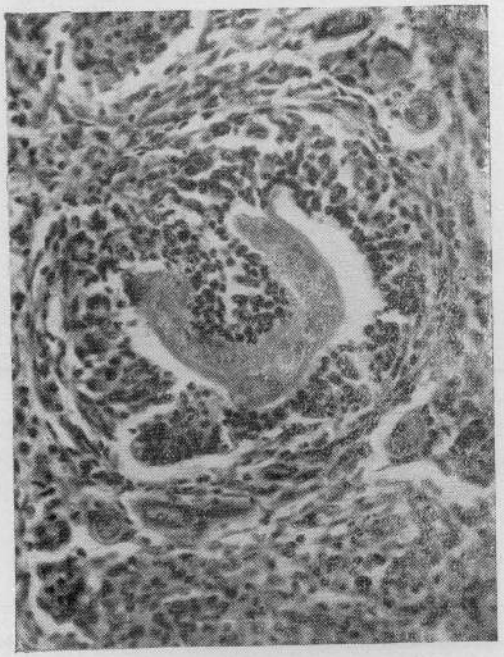


d

R. Ciferri e P. Redaelli

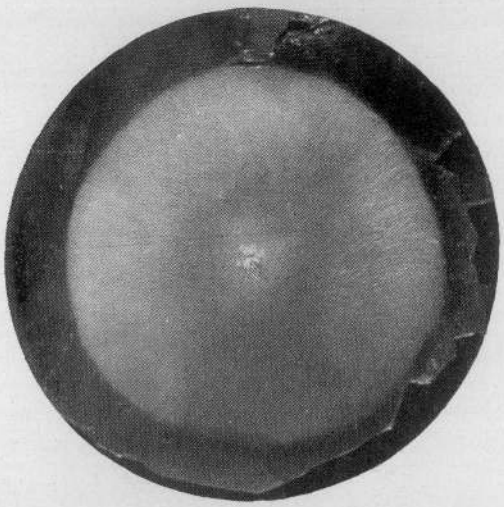


a



b

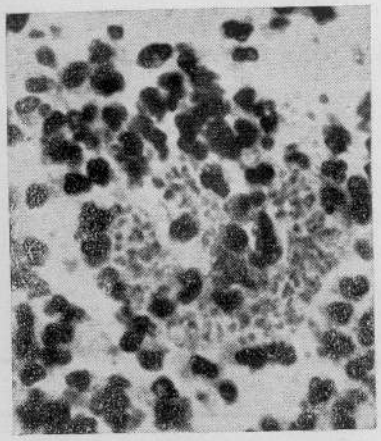
c



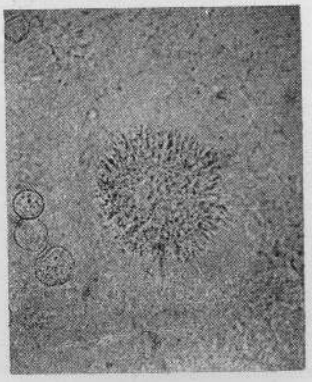
e

d

R. Ciferri e P. Redaelli

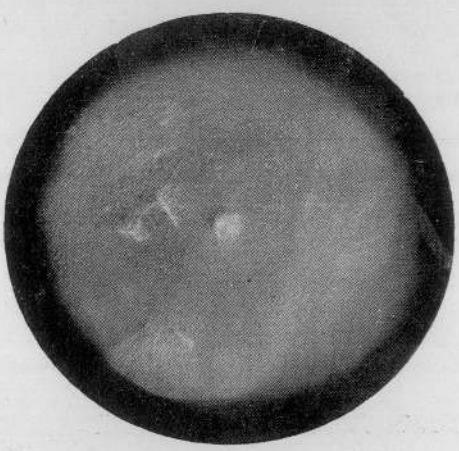


a



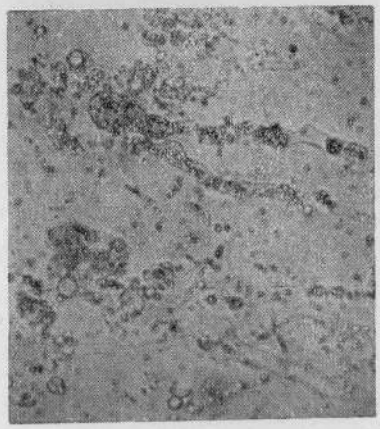
b

c



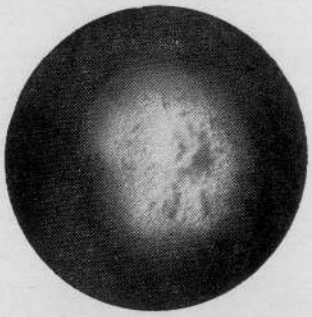
d

e

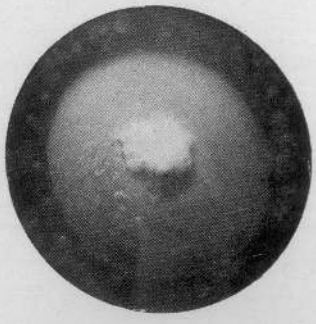


f

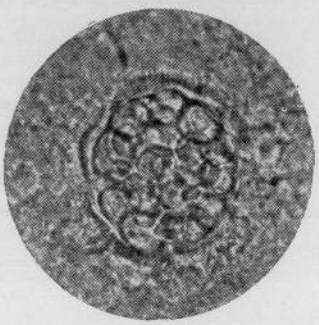
R. Ciferri e P. Redaelli.



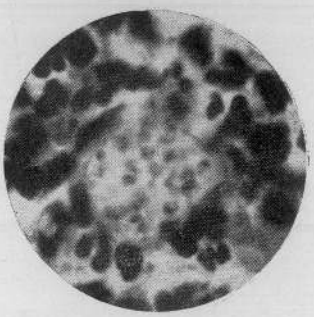
a



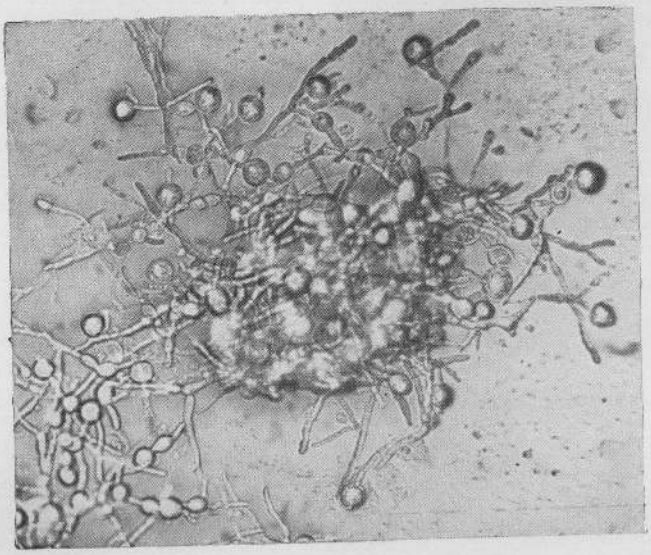
c



b



d

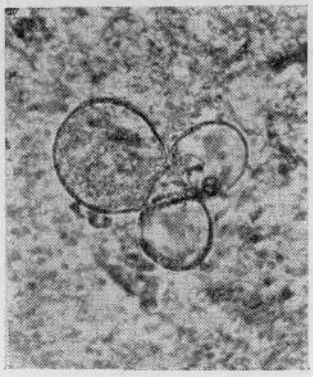


e

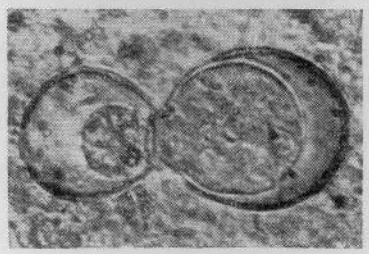
R. Ciferri e P. Redaelli.

a

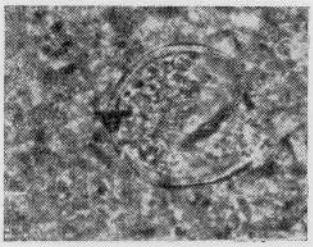
b



c

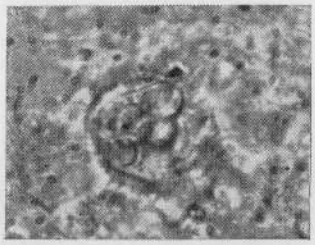


d



e

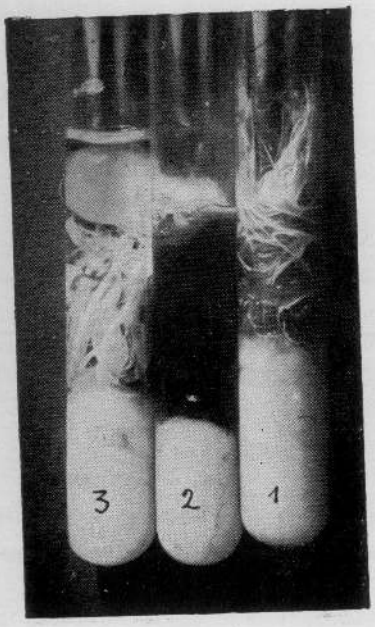
f



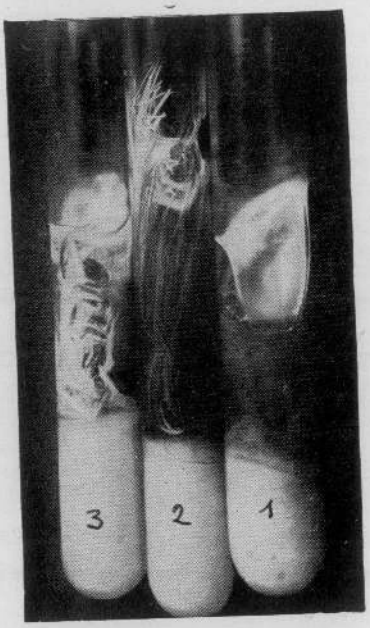
g

h

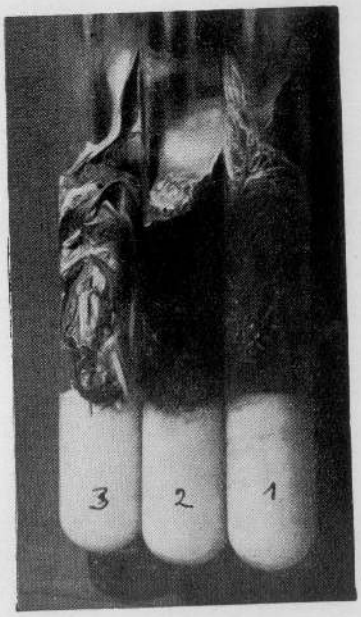
R. Ciferri e P. Redaelli.



a



b



c

R. Ciferri e P. Redaelli.

INDICE

Pag. 399
1. Introduzione e scopo del lavoro 400
2. Cenni storici su *Coccidioides immitis* e sul granuloma coccidioide . 409
3. Origine dei ceppi studiati 410
4. Caratteri culturali 412
5. Caratteri biochimici 415
6. Caratteri micromorfologici in cultura e nei tessuti animali e fenomeni di sessualità 432
7. Caratteri parassitologici e patogenetici sperimentali 435
8. I fatti citologici e morfologici ai fini della posizione sistematica di *Coccidioides* 454
9. Classificazione e nomenclatura 460
10. Notizie anatomo-cliniche sul granuloma coccidioide o «malattia di Posadas-Wernicke» 464
11. Riassunto 467
12. Letteratura citata 473
13. Spiegazione delle tavole . . . . . .

Prezzo: L. 18.