R. BIBLIOTECA MEDICA ROMA
MISCELL.
B 50
11

REGIA ACCADEMIA MEDICA
BIBLIOTECA

Mis. B.50.11

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA TOSSICITÀ

DELLO

SPIRILLO COLERIGENO

(MASSAUA-GHINDA)

DEI DOTTORI

F. INGHILLERI e F. ROLANDO

Assistenti ai Laboratori scientifici della Direzione di Sanità

R.a BIBLIOTECA MEDICA ROMA

ROMA
TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE
1893

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA TOSSICITÀ

DELLO

SPIRILLO COLERIGENO

(MASSAUA-GHINDA)

DEI DOTTORI

F. INGHILLERI e F. ROLANDO

Assistenti ai Laboratori scientifici della Direzione di Sanità

ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1893

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ
(MINISTERO DELL'INTERNO).

Contributo allo studio della tossicità dello spirillo Colerigeno (Massaua-Ghinda), dei dottori F. INGHILLERI e F. ROLANDO, Assistenti ai Laboratori scientifici della Direzione di Sanità.

Queste ricerche che, per ragioni indipendenti dalla nostra volontà, non abbiamo potuto pubblicare prima d'ora, datano dal settembre 1892.

Nello iniziarle, era nostro scopo spiegarci la notevole divergenza di opinioni che i diversi autori hanno sulla attività patogena dello spirillo colerigeno.

Sopratutto aveva richiamato la nostra attenzione uno studio, recentissimo allora, del Prof. L. VINCENZI [1], in cui i risultati delle esperienze istituite sulle cavie e sui piccioni con il Vibrione colerigeno (Massaua-Ghinda) contraddicevano completamente a quelli ottenuti da PFEIFFER [2] e ad alcune osservazioni già fatte nel laboratorio batteriologico che noi frequentiamo.

Intanto, il ritardo nella pubblicazione di queste nostre ricerche ci ha data la opportunità di leggere e, in parte, di controllare gli ultimi lavori su questo argomento. Il VINCENZI, nel lavoro ci-

[1] L. VINCENZI: « Ricerche sperimentali sul colera » (*Archivio per le scienze mediche, di Biizzozero*, V. 17 1892 n. 3).

[2] PFEIFFER: « Untersuchungen über das choleragift » (*Zeitschrift f. hyg.* B. XI 3).

tato, enumera alcuni caratteri culturali e biologici dello spirillo *Massaua-Ghinda* fermandosi specialmente a quello della *estrema virulenza*, che potrebbe farlo ritenere identico al *V. Metchnikoff*. Ma la diversa produzione di indolo ed acido nitroso (costante per il *V. Metchnikoff*, incostante per quello di *Massua-Ghinda*), è secondo il VINCENZI un carattere sufficiente per fare di questi due germi due specie assolutamente distinte.

Viceversa, non solo egli non tiene lo stesso conto della diversa produzione di indolo ed acido nitroso per distinguere il *Massaua-Ghinda* dallo spirillo di KOCH, ma non discute tutta la serie degli altri caratteri differenziali e fonda la identicità dei due spirilli sul fatto discusso e discutibile dell'essere GAMALEJA [1] riuscito a dare allo spirillo di KOCH una straordinaria virulenza. « Il ne faut pour cela, dice GAMALEJA, que le porter sur un pigeon après un passage par la cobaye » dopo di che il germe compare nel sangue dei piccioni ed acquista tale virulenza che una o due gocce di sangue sono sufficienti ad uccidere qualunque piccione.

Ciò, pertanto, costituirebbe un buon argomento se tale osservazione non avesse (come oggi ha) una importanza puramente storica. I risultati di GAMALEJA non furono confermati, e VINCENZI [2] stesso invano cercò di confermarli. E siccome PFEIFFER e NOCHT [3] dimostrarono lo scarso potere patogeno, per i piccioni, dello spirillo colerigeno Koch, che mai non rinvennero nè nel sangue nè negli organi, così tutto varia se invece di affidarci ai risultati di GAMALEJA, ci si affida a quelli di PFEIFFER e NOCHT.

Il VINCENZI, pertanto, non accetta l'ipotesi sostenuta specialmente da DOUGLAS - CUNNINGHAM, [4] e ultimamente da SCLAVO [5], che si possano ammettere più specie di germi colerigeni: secondo VINCENZI lo spirillo *Massaua-Ghinda* deve considerarsi come lo spirillo di KOCH virulentissimo e non come una varietà distinta, opinione che non si può così recisamente sostenere se si tien conto

---

[1] GAMALEJA: « Communication faite a l'Académie des sciences par M. Pasteur dans la séance du 20 août 1888 ». V. anche: *La Semaine Médicale*, pag 334.

[2] Loco citato.

[3] PFEIFFER e NOCHT. « Ueber Verhalten der Choleravibrionen in Taubenkörper ». (*Zeischrift für Hyg.*, Bd. XI).

[4] DOUGLAS et CUNNINGHAM: «Uber einige Arten in Calcutta vorkommen der Cholerakommabacillen » (*Archiv. für Hyg.*, Bd XIV, pag. 45).

[5] A. SCLAVO: « Di alcune differenze esistenti fra gli spirilli del colera isolati nelle diverse epidemie » (*Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*. 1892, pag. 545).

di tutti i caratteri morfologici e biochimici dello spirillo *Massaua-Ghinda*, il quale presenta, in confronto dello spirillo Koch, delle differenze ben più notevoli che non quella diversa produzione di indolo ed acido nitroso, sufficiente a farlo distinguere dal V. Metchnikoff.

« *I due spirilli di provenienza africana, dice* Sclavo [1], *sopratutto si distaccano dallo spirillo di* Koch *per la forma, per lo sviluppo nel brodo e su patate, per l'incostanza nel dar luogo alla reazione di* Bujwid *nei brodi* Löffler, *per un minore potere acidificante in presenza dell'alimento idrocarbonato, per la proprietà di formare pellicola costantemente sui brodi con saccarosio e bene spesso su quelli contenenti glucosio, per la facoltà di coagulare il latte semplice e quello contenente saccarosio, per il minore potere inversivo, e, finalmente, per la spiccata virulenza verso le cavie e verso i piccioni.*

Ma noi lasciamo impregiudicata questa questione della identicità, su cui non vogliamo dilungarci, altra essendo la nostra mèta.

Tenuto conto di quanto ci insegna la letteratura dello *spirillo colerigeno*, il nodo della questione consisteva per noi nello spiegarci se lo spirillo colerigeno *Massaua-Ghinda*, varietà o no della specie studiata da Koch, agisse come un microrganismo infettante o come uno puramente attossicante, e se, in questo caso, l'intossicazione dipendesse dagli elementi preformati che si inoculano, o da elementi di nuova produzione dovuti all'attività del germe nell'organismo.

Cantani [2] nel 1886, dimostrò, pel primo, il potere tossico della cultura di colera. Dalle sue esperienze egli argui l'esistenza di un veleno colerico, *connesso con il bacillo colerigeno stesso*, che si riscontra anche nelle culture morte.

Tizzoni e Cattani [3] poterono dimostrare batteriologicamente la presenza dello spirillo colerigeno nel sangue degli animali inoculati.

Questi medesimi Autori riscontrarono pure lo spirillo nel sangue e persino nel liquido subaracnoideo di ammalati e di morti di colera, ma non riuscirono a coltivarlo.

[1] Sclavo: loco cit.
[2] Cantani: *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1886, N. 45.
[3] Tizzoni e Cattani: *Centralb. f. d. med. Wissen.* 1886.

CUNNINGHAM [1] provocò la morte delle cavie con forti dosi di cultura di spirillo colerigeno (Calcutta) ma non lo rinvenne mai nel sangue o negli organi. Neppure a LUSTIG [2] capitò mai di rinvenire lo spirillo nel sangue o negli organi dei colerosi nei varî periodi della malattia.

GIBIER e VAN ERMENGEM [3] non rinvennero il kommabacillo nè nel sangue, nè nel contenuto duodenale di animali morti in seguito a inoculazione sottocutanea.

PFEIFFER [4] desume dalle sue esperienze che lo spirillo colerigeno inoculato nel peritoneo comunemente muore in breve tempo, per cui la morte non si deve ad una infezione ma ad una intossicazione determinata, secondo lui, dalle proteine dello spirillo stesso, vive o morte.

VINCENZI [5], nel suo lavoro, dice: che con una minima quantità di cultura di colera o cresciuta in brodo od in agar, si provocava nelle cavie per inoculazione sottocutanea un edema acuto, notevolissimo, poi i fenomeni caratteristici della intossicazione colerica e la morte in meno di 24 ore. Alla inoculazione di poche gocce di cultura, sia nel cavo addominale, sia nel cavo pleurico, susseguiva, senza fallo, la morte in breve tempo. Un'ansa di cultura cresciuta in agar era sufficiente ad uccidere un piccione in meno di 20 ore, quando la si introduceva entro i muscoli pettorali.

Su un coniglio che ricevette nell'addome due cmc. di una cultura in agar sciolta in brodo (l'A. non dice in quanto brodo fu sciolta la cultura), si ebbe la morte nello stesso giorno (quante ore?).

Più oltre soggiunge (pag. 332):

« Introducendo una minima quantità di cultura di colera (Massaua) sotto cute alle cavie . . . . la morte avviene sempre entro le 24 ore.

« Le culture fatte coll'edema e col sangue sono riuscite in ogni caso positive. Scarse colonie si ebbero dal contenuto del tenue, ma non mancarono mai.

---

[1] CUNNINGHAM: *On the effectes iniection of coleric kommabacilli in the subcutaneous tissues*, Calcutta 1886.

[2] LUSTIG: *Zeit. f. Hyg.*, III, 1887.

[3] GIBIER e VAN ERMENGEM: *C. R Ac.* T. CL. pag. 470.

[4] PFEIFFER: « Untersuchungen über das Cholera gift ». (Zeitschrift Hyg. Bd. XI.)

[5] VINCENZI: loc. cit.

« La inoculazione nell'addome di poche gocce di coltura in brodo o di una minima quantità di cultura sospesa in brodo è susseguita dopo 3-4 ore da una dolorabilità eccessiva di tutto il ventre. . . . La morte si verifica dopo 8-12 ore. Dall'essudato peritoneale si ottennero sempre culture abbondantissime di bacillo virgola, nè mai riuscirono sterili quelle del sangue. Dal contenuto del tenue solo in due casi riuscii ad ottenere un discreto numero di colonie. Con l'inoculazione nel cavo pleurico . . . . . la morte avviene in 8-10 ore. Anche in questi casi il sangue dà costantemente culture di bacilli virgola ».

Questi fatti « *estrema virulenza* » di « *quantità microscopiche* » di spirillo Massaua e la sua presenza nel sangue, non si erano ben constatati durante le esperienze del prof. SCLAVO sulle differenze tra gli spirilli colerigeni delle diverse epidemie.

Pertanto noi allargammo tali esperienze studiando:

1° La virulenza dello spirillo *Massaua-Ghinda* nelle cavie e nei piccioni;

2° La distribuzione di esso nell'organismo degli animali in cui viene inoculato;

3° L'azione dei principii attivi di tale spirillo.

Abbiamo fatto sempre uso di animali di media grandezza (cavie di 300-400 gr., piccioni di 200-300 gr.) e di culture recenti in agar (24 ore circa) sospese in acqua sterilizzata onde portare nell'organismo la minore quantità possibile di prodotti del ricambio ed essere così sicuri di avere separata l'azione patogena dei prodotti preformati da quella dovuta alla presenza dello spirillo nell'organismo. (Abbiamo fatto uso dell'acqua sterilizzata - alla cui azione, del resto brevissima, lo spirillo resistette bene - invece del brodo per non portare nell'organismo i costituenti del brodo, sostanze non del tutto indifferenti per gli animali da esperimento).

E perchè non si faccia a noi la obbiezione che VINCENZI [1] fa a PFEIFFER per spiegare la diversità dei risultati ottenuti, dichiariamo che fu nostra cura speciale assicurarci un materiale attivissimo mediante 10-12 passaggi consecutivi da cavia a cavia.

Con tutto ciò i nostri risultati sono ben diversi da quelli di VINCENZI.

Secondo questo Autore con lo spirillo di *Massaua-Ghinda* si ottiene sempre la morte degli animali (cavie o piccioni) con *quantità*

microscopiche di culture in brodo od in agar; si avrebbe cioè a fare con un microrganismo il quale spiega proprietà infettanti altrettanto spiccate quanto il bacillo del carbonchio, del colera dei polli ecc. ecc.

Invece – come appare dalle seguenti tabelle – la dose da noi constatata mortale varia da $^1/_4$ a 1 una cultura in agar [1] a seconda della specie dell'animale e nel punto di inoculazione.

Così nelle inoculazioni sottocutanee ed intramuscolari la dose varia da $^1/_2$ (cavia) ad una cultura circa (piccione), mentre nel peritoneo varia da $^1/_4$ (cavia) a $^1/_2$ (piccione).

Con quantità inferiori non abbiamo osservati che fenomeni più o meno gravi di avvelenamento: diminuzione della temperatura, leggero grado di paresi, specialmente del treno posteriore, ma l'animale si riaveva più o meno prontamente.

TABELLA I.

Cavie inoculate nel tessuto sottocutaneo con culture – su agar – di 24 ore.

N.°	Peso	Quantità inoculata (in parti di cultura)	ESITO
1	345	$^1/_4$	viva
2	322	$^1/_4$	»
3	359	$^1/_4$	»
4	276	$^1/_4$	»
5	320	$^1/_3$	† dopo 8 ore
6	396	$^1/_3$	viva
7	367	$^1/_2$	† dopo 6 $^1/_2$ ore
8	295	$^1/_2$	† » 5 $^1/_2$ »
9	370	1	† » 6 »
10	317	1	† » 4 »

TABELLA II.

Piccioni inoculati nelle masse muscolari del petto con culture – su agar – di 24 ore.

N.°	Peso	Quantità inoculata (in parti di cultura)	ESITO
1	239	$^1/_3$	vivo
2	262	$^1/_3$	»
3	248	$^1/_4$	»
4	270	$^1/_4$	»
5	287	$^1/_3$	»
6	275	$^1/_3$	»
7	252	$^1/_2$	»
8	227	$^1/_2$	† dopo 11 ore
9	295	$^2/_3$	vivo
10	247	$^2/_3$	† dopo 10 ore
11	262	1	† » 7 »
12	283	1	† » 7 »

[1] Culture nelle solite provette contenenti 10 cmc. di agar disteso a becco di clarino.

TABELLA **III.**

Cavie inoculate nella cavità peritoneale con culture - su agar - di 24 ore.

N.°	Peso	Quantità inoculata (in parti di cultura)	ESITO
1	407	1/5	viva
2	340	1/5	»
3	300	1/5	trovata morta il giorno appresso
4	308	1/4	† dopo 12 ore
5	377	1/4	† » 8 »
6	299	1/4	† » 10 1/2 »
7	327	1/3	† » 9 »
8	349	1/3	† » 7 »
9	415	1/2	† » 7 1/2 »
10	397	1/2	† » 7 »
11	342	1	† » 4 »
12	372	2	† » 2 1/4 »

TABELLA **IV.**

Piccioni inoculati nella cavità peritoneale con culture - su agar - di 24 ore.

N.°	Peso	Quantità inoculata (in parti di cultura)	ESITO
1	249	1/5	vivo
2	266	1/5	»
3	257	1/4	»
4	220	1/3	† dopo 11 ore
5	280	1/3	vivo
6	258	1/3	»
7	254	1/2	† dopo 10 ore
8	273	1/2	† » 8 »
9	290	1	† » 9 1/2 »

Con le quantità citate da VINCENZI si ebbe costantemente nessuna o pochissima reazione.

Abbiamo anche cercato di aumentare la ricettività dei nostri animali diminuendo loro i poteri di resistenza col digiuno (2-3 giorni) e col cloralio idrato (10-20 cgr.) o con l'uno e l'altro insieme. I risultati variarono di poco: lo stato di debolezza organica in cui mettevamo gli animali, se favoriva lo sviluppo della sindrome fenomenica aggravando ed abbreviandone il decorso - tanto da avere la morte in 4-5 ore anzi che in 7-10 - non aumentava di molto la ricettività. Di fatto, la quantità mortale era ben di poco inferiore a quella sperimentata prima, e - ad ogni modo - di gran lunga superiore a quella impiegata da VINCENZI.

Circa la forma morbosa provocata dalle inoculazioni dello spirillo *Massaua-Ghindi*, le nostre osservazioni collimano, a un dipresso, con quelle di VINCENZI in ciò che riguarda i fenomeni esterni - che sono gli stessi riscontrati da ogni osservasore - ed il reperto anatomo-patologico: essudato (non costante però) tenue, di colore gialliccio, contenente batteri - *non molto numerosi* - se

si trattava di inoculazioni intraperitoneali, leggero edema sieroso-sanguigno se si trattava di inoculazioni sottocutanee ed intramuscolari.

In complesso se questi fenomeni sono gli stessi che descrive il VINCENZI non ne presentano però l'imponenza, che, del resto, *in genere*, è più una funzione dell'attenuazione di un germe che non della estrema sua virulenza.

Riguardo al decorso della forma morbosa abbiamo osservato - come già dicemmo - che le quantità adoperate dal VINCENZI non davano al più che un avvelenamento passeggero, che abbiamo potuto aggravare aumentando la quantità del materiale di inoculazione, finchè, raggiunta la dose mortale, i fenomeni tossici insorgevano rapidamente negli animali inoculati, e le cavie ne morivano in 5-8 ore ed i piccioni in 8-12.

In casi eccezionali e con dosi molto forti abbiamo ottenuta la morte delle cavie in 1 $^1/_2$-2 ore.

Ora noi non sapremmo spiegarci come, culture così attive, quali sono quelle adoperate dal VINCENZI, uccidano solamente in capo a 24 ore circa, se non ammettendo che il germe, indipendentemente dalla quantità inoculata, trovi nell'organismo condizioni favorevoli alla sua moltiplicazione in modo da determinare - dopo il lasso di tempo necessario alla moltiplicazione stessa - i fenomeni che producono la morte.

Fin qui, invece, le nostre osservazioni ci fanno ritenere che lo spirillo *Massaua-Ghinda* non trovi nell'organismo delle cavie e dei piccioni un terreno molto adatto all'esplicamento delle sue energie bio-chimiche.

Le ulteriori esperienze che qui riferiamo ci metteranno in grado di meglio chiarire i nostri concetti.

***

Abbiamo già detto che negli animali uccisi dallo spirillo *Massaua-Ghinda* noi abbiamo ritrovato costantemente - quantunque in maggiore o minore quantità - lo spirillo stesso nel punto di inoculazione.

La nostra indagine non si è limitata alla ricerca batteriologica e batterioscopica dei tessuti in cui avevamo praticata l'inoculazione:

noi abbiamo *sempre* eseguito lo stesso esame con il sangue, fegato, milza, midollo delle ossa, e contenuto del tenue. In quattro soli dei numerosi animali inoculati e morti, abbiamo potuto rinvenire lo spirillo nel sangue; e, tuttavia, nemmeno in questi quattro casi ci fu possibile ritrovarlo microscopicamente.

Abbiamo, anche, voluto accertare se deprimendo l'organismo (digiuno, cloralio) si potesse constatare la presenza dello spirillo nel sangue: anche in queste condizioni il reperto fu costantemente negativo.

Dunque, quattro volte soltanto, abbiamo ottenute delle culture di spirillo (Massaua) dal sangue, e questi quattro casi costituiscono per noi una eccezione spiegabilissima, poichè, per cause accidentali, i quattro animali furono sezionati parecchie ore dopo la morte, - uno, anzi, 24 ore dopo -.

Non ci parve inverosimile interpretarlo come un fatto *post-mortem*, il che siamo ora in grado di affermare avendo istituite speciali ricerche per determinare se, e quante ore dopo la morte, lo spirillo *Massaua-Ghinda* possa arrivare nel sangue in virtù dei suoi vivaci movimenti.

Abbiamo inoculate quattro cavie con dosi certamente mortali e ne abbiamo esaminato il sangue - rispettivamente - subito dopo la morte, tre, sei, dieci ore dopo. Questa esperienza fu ripetuta parecchie volte nel corso delle nostre ricerche: solo dopo un *minimum* di circa sei ore si può riscontrare lo spirillo nel sangue, senza potere però constatarlo microscopicamente.

Il reperto negativo dello spirillo *Massaua* nel sangue - durante la vita - è dovuto ad uno speciale potere battericida del sangue stesso?

Per assicurarcene abbiamo, da un lato, portato direttamente lo spirillo a contatto del sangue con iniezioni endovenose, dall'altro abbiamo raccolto del sangue e del siero di cavia e vi abbiamo coltivato lo spirillo.

Vincenzi, il quale pure ha coltivato lo spirillo nel siero di cavie non parla del modo con cui lo ha raccolto.

Noi abbiamo trovato una estrema difficoltà nel raccogliere - dalle cavie e dai piccioni - il sangue al riparo di ogni inquinamento.

Abbiamo tentato invano parecchi modi di estrazione, dalla giugulare, dalla carotide, dal cuore di una cavia appena uccisa. Ap-

poggiandoci al dato anatomico che nei piccioni sono molto sviluppate le arterie vertebrali abbiamo tentato di estrarne il sangue recidendo - sotto una campana - il canale vertebrale, dopo averlo isolato perfettamente da tutto il resto ed averlo lavato con sublimato, alcool ed etere.

Siamo, finalmente, riusciti nell' intento facendo uso di un apparecchio - altrettanto semplice che utile - consigliatoci dal dott. Sclavo. Consiste in una piccola bevuta di Erlenmayer contenente - o pur no - un po' di *jais* (a seconda che si vuole raccogliere il sangue defibrinato o pure il siero di sangue), chiusa da un tappo di gomma a due fori pei quali passano due tubi di vetro. Uno di questi tubi è inferiormente e superiormente poco più lungo del tappo che attraversa ed ha l'ufficio di dar esito all'aria. L'altro tubo penetra nell'Erlenmayer per $^1/_3$ circa diretto obbliquamente in modo che la corrente di liquido che vi passa non cada sul fondo, ma bensì sulla parete dell'Erlenmayer. Fuori della bevuta questo tubo è diretto in basso ed incurvato in modo da formare con l'asse della bevuta un angolo di 45° e termina con un ago cannula che vi è saldato (fig. I.).

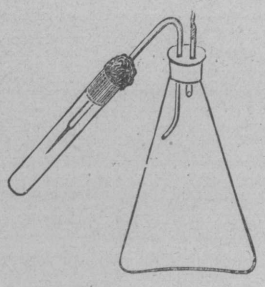

Fig. 1.

Si prepara con la solita tecnica e si sterilizza all'autoclave. Al momento di servirsene, la parte sinistra del torace di una cavia viene denudata della cute e dei muscoli finchè si scorga chiaramente la escursione cardiaca. Si penetra allora rapidamente con l'ago cannula nella punta del cuore ed il sangue sgorga ritmicamente nell' Erlenmayer. Da una grossa cavia di 500-600 gr. si ha, così, in pochi secondi 15-20 gr. di sangue. Si lascia in riposo nella ghiacciaia se si vuole raccogliere il siero; si agita prolungatamente coi *jais* se si vuole il sangue defibrinato e si distribuisce in piccole provette.

Stern [1] ha constatato che lo spirillo colerigeno non vive nel sangue *umano* defibrinato.

Vincenzi [2] ha coltivato lo spirillo *Massaua* nel siero di cavia ed ha osservato che « *non solo non vi muore ma si moltiplica* »

---

[1] Stern: *Zeitschr. f. Klin. Medic.* Bd. XVIII.
[2] Vincenzi: loco citato.

Recentissimamente HAMMERL [1] ottenne questo stesso risultato con gli spirilli isolati nelle epidemie coleriche di Finthen, Duisbourg, Parigi. Lo spirillo dell'epidemia colerica di Sanghai, invece non prospera nel sangue.

Il risultato da noi ottenuto è questo: che lo spirillo *Massaua-Ghinda* nel sangue e nel siero di cavia si sviluppa ; dalle nostre esperienze - benchè assolutamente incomplete per la difficoltà di avere materiale a sufficienza - dobbiamo però arguire che si sviluppa attenuandosi notevolmente.

Noi abbiamo tentato di stabilire molto grossolanamente il rapporto che passa tra la quantità di germi di una delle solite culture di 24 ore in agar (10 cmc. circa di agar) e la quantità di una cultura della stessa età in sangue defibrinato (5 cmc. circa).

Abbiamo sospeso il prodotto di una intiera cultura su agar in 10 cm.c. di acqua distillata sterilizzata: abbiamo trasportato 1 cm.c. di questa sospensione in 10 cm.c. di acqua, ed abbiamo allo stesso modo ripetuta l'operazione fino alla 5ª diluizione (1 cm c. = $^1/_{100000}$ della cultura primitiva). Abbiamo seminato in piastre di gelatina $^1/_{10}$ di cm.c. di questa 5ª diluizione ($^1/_{10}$ = $^1/_{1000000}$ della cultura primitiva) ottenendo una media di 752 colonie per ciascun decimo di cm.c. (cioè 752,000,000 di colonie nella cultura primitiva).

L'errore deve certamente essere grossolano, ma siccome lo stesso, identico errore si ha per la determinazione della quantità di colonie nel sangue defibrinato, il rapporto fra questo caso e quello si può ritenere come relativamente approssimativo. Con la stessa tecnica abbiamo avuto per una cultura di sangue defibrinato 85,000,000 di colonie, cioè il rapporto di: 1 cult. su agar = $8.^8/_{10}$ cult. circa nel sangue.

Orbene, inoculando a quattro cavie - nel peritoneo - due culture per ciascuna, di spirillo coltivato nel sangue (quantità corrispondente ad un $^1/_1$ di cultura su agar sufficiente ad uccidere una cavia di media taglia) noi non abbiamo potuto provocarvi che dei fenomeni di intossicazione che dileguarono completamente.

Ad altre due cavie inoculammo - rispettivamente - tre e quattro culture ugualmente senza ammazzarle.

Per mancanza di materiale e per la grave difficoltà di procurarlo

---

[1] HAMMERL: *Hygienische Rundschau*, n. 13, 1893.

non abbiamo constatata la quantità necessaria a produrre la morte dell'animale.

Per quanto imperfette e grossolane queste esperienze ci hanno lasciata la convinzione che una attenuazione dello spirillo deve avverarsi nelle culture in sangue defibrinato.

Per iniezione endovenosa (giugulare nelle cavie, vena dell'ala nei piccioni), quantità uguali od anche maggiori alle minime sufficienti a determinare in cavie dello stesso peso la morte in 5-7 ore, non inducevano che delle forme più o meno gravi di intossicazione.

Abbisognavano delle quantità veramente eccezionali per produrre la morte e sempre in un periodo superiore a 5 ore: I piccioni resistono a quantità straordinarie, ad una intiera cultura, come risulta dalle annesse tabelle.

TABELLA **V.**

Cavie inoculate nella vena giugulare con culture – su agar – di 24 ore.

N.°	Peso	Quantità inoculata (in parti di cultura)	ESITO
1	339	$^1/_5$	viva
2	342	$^1/_5$	»
3	337	$^1/_4$	»
4	286	$^1/_4$	† il giorno appresso
5	310	$^1/_4$	viva
6	285	$^1/_3$	† dopo 7 ore
7	367	$^1/_3$	viva
8	309	$^1/_3$	† dopo 12 ore
9	300	$^1/_2$	† » 6 »
10	320	$^1/_2$	† » 5 $^1/_2$ »
11	372	$^1/_2$	† » 7 $^1/_2$ »
12	404	1	† » 6 »

TABELLA **VI.**

Piccioni inoculati nella vena dell'ala con culture – su agar – di 24 ore.

N.°	Peso	Quantità inoculata (in parti di cultura)	ESITO
1	254	$^1/_5$	vivo
2	277	$^1/_5$	»
3	242	$^1/_4$	»
4	269	$^1/_4$	»
5	292	$^1/_3$	»
6	245	$^1/_2$	»
7	225	$^2/_3$	»
8	230	1	»
9	242	1	† dopo 8 ore
10	237	1	vivo
11	270	1 $^1/_2$	† dopo 9 ore
12	252	1 $^1/_2$	† » 7 »

TIZZONI e CATTANI [1] non riuscivano a produrre la morte degli animali con la inoculazione endovenosa di spirillo colerigino: era

[1] TIZZONI e CATTANI: *Centralblatt f. d. med. Wissensch*, 1887.

necessario, ad ottenere l'effetto, inoculare contemporaneamente dell'oppio nel peritoneo.

Nei casi di morte, noi non abbiamo potuto constatare la presenza dello spirillo nel sangue nè in preparati nè batteriologicamente.

Tizzoni e Cattani [1] constatarono anche il passaggio dello spirillo dalla madre al feto.

A noi accadde spesso, durante queste nostre esperienze, di inoculare delle cavie gravide, *e di sezionarle appena morte*, e, spesso pure, abbiamo rigorosamente esaminato il sangue della madre e quello del feto, nonchè la placenta, l'amnios, ecc. senza però constatare la presenza dello spirillo nel circolo nè materno, nè fetale.

Lo stesso fatto è confermato da Lustig [2] il quale non rinvenne mai lo spirillo colerigeno in feti di madri colerose.

A complemento di quanto abbiamo esposto riferiamo altre esperienze fatte allo scopo di studiare l'andamento della vita dello spirillo *Massaua* nel sangue circolante.

La possibilità della vita dello spirillo nel sangue morto, nel sangue ridotto, - da tessuto composto di elementi dotati di speciali attività bio-chimiche - a semplice terreno nutritivo, non ci dava alcuna luce su questo proposito. A noi interessava osservare la eliminazione del germe e la sua relazione con gli effetti della inoculazione.

Abbiamo praticate in otto cavie, a un di presso del medesimo peso, delle iniezioni endovenose di quantità variabili di spirillo (da $^1/_4$ a $^1/_2$ cultura). A 4 di queste cavie, abbiamo inoltre iniettato sottocute delle quantità variabili di cloralio (da 10 a 20 cgr.) onde mettere lo spirillo in più favorevoli condizioni di vita rispetto al sangue.

Ad intervalli di mezz'ora ne abbiamo - con tutte le precauzioni - esaminato il sangue in goccia pendente, diluita in cloruro sodico 0.75 %, ed in preparati colorati, facendo, inoltre, di ciascun saggio delle semine in brodo

---

[1] Tizzoni e Cattani: *l. c. cit.*
[2] Lustig: *Zeit. f. Hyg.* III, 1887.

Due ore dopo, al più, le semine riuscivano sterili: il reperto microscopico era, già prima, negativo.

La unita tabella rende meglio il complesso dell'esperienza.

TABELLA **VII.**

N.° della cavia	Peso in gr.	Quantità inoculata (in parti di cultura)	Età della cultura	Cloralio in cgr.	I brodi rimasero sterili dopo:	ESITO
1	335	1/4	24 ore	—	1/2 ora	viva
2	352	1/4	»	20	1 »	»
3	358	1/3	»	—	1/2 »	»
4	375	1/3	»	15	2 ore	trovata morta il giorno dopo
5	375	1/2	»	—	2 »	† dopo 6 ore
6	383	1/2	»	—	1 1/2 ora	† » 7 » circa
7	398	1/2	»	10	2 1/2 ore	† » 4 »
8	407	1/2	»	10	2 »	† » 6 »

Da essa si rileverebbe - per quanto queste esperienze siano troppo ristrette - che quanto più presto viene ucciso il germe tanto più tardi avviene - *cæteris paribus* - la morte.

* * *

Il terzo quesito propostoci era di studiare l'azione dei principii attivi dello spirillo *Massaua-Ghinda*: di studiarli per quel tanto che poteva confermare i convincimenti - generati in noi dalle esperienze fatte finora - sulla sede del potere tossico (prodotti del ricambio? protoplasma cellulare dei microrganismi?); dimostrarci fino a che punto nella intossicazione colerica questa fosse dovuta alla inoculazione di elementi preformati o ad elementi di nuova formazione nell'organismo animale. Di qui sarebbe venuta la spiegazione sul modo con cui il germe esplica la sua azione sull'organismo.

Cantani pel primo - come già abbiamo detto - attribuì questa azione ad un veleno intrinseco del batterio, che permane attivo anche dopo la morte del batterio stesso.

TIZZONI e CATTANI [1] e così pure VAN ERMENGEM [2] provocarono la morte negli animali con culture sterilizzate, ma senza separare l'azione dei prodotti del ricambio da quella dei microbi stessi vivi o morti. KOCH [3] e dopo di lui KLEBS [4] affermano che i fenomeni generali e la morte per colera, si debbono all'assorbimento di un principio tossico prodotto dal commabacillo.

VILLIER [5] isolò dagli organi e dal contenuto intestinale dei colerosi una sostanza di reazione alcalina, appartenente secondo lui al tipo chimico *ptomaine*.

Fin qui la massima parte degli autori, - citati e non citati, - i quali parlano di una sostanza tossica, l'hanno ricercata di solito in culture semplicemente sterili, senza scindere l'attività dei prodotti del ricambio da quella che il microrganismo possiede in sè stesso.

DOYEN [6] invece afferma che lo spirillo colerigeno non produce sostanze tossiche. Egli spiega il meccanismo patogeno dello spirillo colerigeno non con l'azione di prodotti tossici, ma con il pervenire del microrganismo nel sangue.

PFEIFFER [6] ha confermato, illustrandola, l'opinione di Cantani, dimostrando rigorosamente che alle proteine è dovuta l'azione specifica del colera.

Egli non riscontrò mai lo spirillo nel contenuto intestinale degli animali inoculati: spesso, sangue e contenuto peritoneale furono riscontrati sterili, e quando nella cavità peritoneale constatò la presenza dello spirillo, questo era in scarso numero. Se dunque lo spirillo subiva nell'organismo una distruzione, risultava evidente trattarsi non di infezione ma bensì di intossicazione. E constatò, precisamente, che la sostanza attossicante è il corpo stesso del batterio. Inoculato morto (colera, cloroformio, tymolo) occorrono di esso quantità superiori, di quando viene inoculato vivo, ma l'effetto e il quadro fenomenologico sono gli stessi.

---

[1] TIZZONI e CATTANI: lavori citati.

[2] VAN ERMENGEM: *Recherches sur le microbe du choléra asiatique*. 1885.

[3] KOCH: *Berl. Klin. Wochen.* 1885.

[4] KLEBS: *Mittheilungen für Aetiologie der cholera*. 1885.

[5] VILLIER: « Sur la formation de ptomaines dans le choléra » (*Compte Rend. Acad.* T. C. 91).

[6] PFEIFFER: lavoro citato.

Dalle nostre esperienze risulta chiaramente che lo spirillo colerigeno di Massaua è un microrganismo attossicante. L'effetto è stato sempre in ragione diretta della dose: il periodo necessario ad ottenersi l'effetto, in ragione inversa della dose stessa.

Noi abbiamo - per animale di una data taglia - una dose mortale limite, al di sotto della quale non si hanno che fenomeni di avvelenamento: quantità maggiori non fanno che affrettare la morte.

Questa dose limite, varia secondo il punto di inoculazione: è minima se inoculata nella cavità peritoneale, maggiore nel tessuto sottocutaneo o intramuscolare, massima nel sangue. Di più, sottocute e nel peritoneo, noi abbiamo sempre ritrovato lo spirillo vivo nel punto di inoculazione, nè lo abbiamo mai constatato vivo nel sangue, dopo la inoculazione della rispettiva dose limite. Questo tessuto rappresenta dunque un terreno assolutamente sfavorevole alla vita del batterio, il quale vi muore in brevissimo tempo.

L'azione pare dunque dovuta - in tal caso - esclusivamente al batterio morto.

Sottocute e nel peritoneo abbiamo invece una parziale moltiplicazione. Sebbene, come abbiamo detto, lo spirillo non trovi nei tessuti delle cavie e dei piccioni un terreno troppo favorevole alla sua vita - o per l'azione battericida degli umori o fagocitica delle cellule, o per l'una e l'altra insieme - lo si riscontra tuttavia perchè la dose limite è più che sufficiente a vincere i poteri di resistenza che immediatamente vengono opposti, così che una parte dei germi introdotti possono moltiplicarsi ed addizionare la loro azione a quella dei germi periti nella lotta e che sono tuttavia attivi per il loro protoplasma. In altri termini, mentre nel sangue la dose limite è rappresentata da elementi preformati i quali agiscono non per la loro attività (poichè vengono in breve uccisi), ma per la loro presenza, nel sottocutaneo e nel peritoneo, la dose limite - ove dovesse agire per la sola presenza - sarebbe insufficiente a produrre la morte. Pertanto agisce abbattendo - in primo tempo - i poteri dell'organismo, moltiplicandosi poi per raggiungere la dose mortale; tanto è vero che l'effetto si ottiene più rapidamente se si procura artificialmente la diminuzione di resistenza con il cloralio o con il digiuno.

Così noi ci spieghiamo perchè la dose debba variare col luogo di inoculazione.

Per avere la conferma sperimentale di queste nostre vedute, senza addentrarci nello studio di prodotti tanto complessi, noi abbiamo semplicemente separate le proteine dai prodotti del ricambio, sperimentando quelle e queste sugli animali, separatamente ed insieme per ricostituire - presso o poco - ciò che può avvenire nell'organismo. Attraverso un piccolo filtro di porcellana (Kitasato) adattato come appare della fig. 2 (previamente sterilizzato all'autoclave), abbiamo filtrato - a pressione diminuita - 100 cmc. (10 cent.) di cultura di 10 giorni, in brodo semplice, dello spirillo *Massaua-Ghinda*. Per la filtrazione si impiegarono otto ore. Si ottennero 92 cmc. di filtrato limpidissimo ed *assolutamente sterile*. Prelevato il prodotto della filtrazione abbiamo ripetutamente lavate le proteine - attraverso il filtro stesso - con acqua distillata, sterile cloroformizzata. Le abbiamo quindi sospese in acqua sterilizzata cloroformizzata, lavando scrupolosamente le pareti del filtro e del tubo che le conteneva. Si può ritenere che la perdita sia stata presso che inaprezzabile. Il controllo su piastre ci dimostrò che la sospensione era assolutamente sterile.

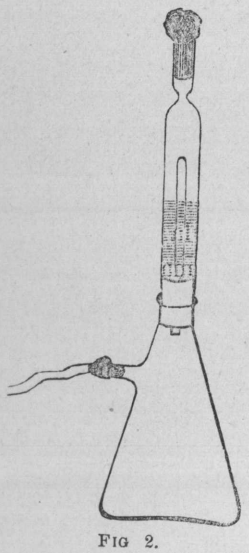

FIG 2.

Abbiamo deposto questo liquido in una capsula di platino contenuta in un pesacapsule (il tutto sterilizzato e pesato dopo parecchie ore di permanenza in un essiccatoio ad acido solforico) e lo abbiamo portato a secchezza nell' essiccatoio a pressione diminuita. La doppia pesata ci ha indicato il peso delle proteine ottenute = gr. 0.048: cioè una media di gr. 0.0048 per una cultura di 10 cm.c.

Le abbiamo diligentemente diluite in 20 cm.c. di acqua sterilizzata (1 cultura = 2 cm.c.) e ne abbiamo inoculate parecchie cavie con dose varia, ed a coppia (una più grande e l'altra più piccola), onde determinare, il più esattamente possibile, il potere venefico per chilogramma di animale.

TABELLA **VIII.**

Peso in grammi	Quantità inoculata in centim. cubici	Quantità inoculata in grammi	ESITO
309	$^3/_{10}$	0.00072	viva
365	$^3/_{10}$	0.00072	»
327	$^5/_{10}$	0.0012	†
370	$^5/_{10}$	0.0012	viva
325	$^7/_{10}$	0.00168	†
137	$^7/_{10}$	0.00168	viva
332	1	0.0024	†
480	1	0.0024	†

Dalla presente Tabella si ha come quantità necessaria a produrre la morte dell'animale una media di gr. 0.004 per chilogramma di animale.

Con lo stesso metodo e con la stessa tecnica abbiamo determinato il peso delle proteine che noi inoculavamo ai nostri animali (nelle esperienze con le quali abbiamo studiata la virulenza dello spirillo *Massaua-Ghinda* per le cavie e pei piccioni) con le dosi di cultura viva che noi abbiamo riconosciute mortali. Dalla patina di 10 culture in agar, di 24 ore, diligentemente sospesa in acqua sterilizzata cloroformizzata, abbiamo ottenuti gr. 0.0142 di proteine, cioè una media di gr. 0.00142 per ogni cultura.

Dal rapporto che intercede fra l'attività della cultura viva e della cultura morta si vede che la quantità di cultura viva necessaria a produrre la morte per le vie delle vene si avvicina di molto alla quantità di proteine necessaria a produrre lo stesso effetto. E questa differenza si assottiglia anche più se si tien conto che microrganismi vivi rappresentano per l'organismo qualche cosa di più micidiale che non le semplici proteine, in quanto che per la lotta che impegna, l'organismo resta di fronte al veleno dei cadaveri di questi microrganismi in condizioni meno buone di quelle in cui si troverebbe di fronte ad una stessa quantità di cadaveri, ma senza aver sostenuta la lotta per ridurli tali.

Un ultimo punto ci rimane a toccare prima di chiudere questo

nostro *contributo*: l'azione dei prodotti del ricambio dello spirillo *Massaua-Ghinda*.

Riportato a 100 - con acqua distillata sterile - il filtrato ottenuto, ne abbiamo inoculato a cavie della solita taglia 1-2-3-5-10 cm c. pari a $^1/_{10}$-$^2/_{10}$-$^3/_{10}$-$^4/_{10}$-$^5/_{10}$ - 1 delle solite culture senza provocarne la morte. Depressione della vivacità, malessere vivo, movimenti disordinati, convulsivi, ma giammai i fenomeni salienti della intossicazione colerica: nè abbassamento notevole di temperatura, nè paresi ecc.

Dato questo risultato, ci parve utile ripetere le esperienze inoculando alle cavie, assieme a dosi varie di toxine, dosi varie di proteine, onde studiare l'azione simultanea dei due fattori che nell'organismo, quando vi è moltiplicazione del germe, agiscono di conserva.

Riferiamo, nella seguente tabella i risultati ottenuti.

TABELLA **IX.**

Peso in gr.	Quantità di proteine necessaria ad uccidere l'animale (gr. 0.004 per Kg.)	QUANTITÀ INOCULATA di Proteine in gr.	Proteine in cmc.	Toxine in cmc.	ESITO
315	gr. 0.00126	0.00006	$^4/_{10}$	5	†
313	» 0.00137	0.00006	$^4/_{10}$	nulla	viva
320	» 0.00128	0.00072	$^3/_{10}$	8	†
302	» 0.00120	0.00072	$^3/_{10}$	nulla	viva
297	» 0.00118	0.00048	$^2/_{10}$	10	†
314	» 0.00125	0.00048	$^2/_{10}$	nulla	viva
376	» 0.0015	0.00048	$^2/_{10}$	15	»
360	» 0.00144	0.00048	$^2/_{10}$	nulla	»

Dalla premessa tabella risulta che i prodotti del ricambio, poco attivi di per sè, rappresentano una condizione favorevolissima al germe colerigeno vivo od alle proteine, da un lato riducendo i mezzi di difesa dell'organismo, dall'altro neutralizzando, forse, qualche speciale sostanza antitossica esistente nell'organismo, cosi che dosi insufficienti di veleno possono diventare mortali.

Molto ancora avremmo a dire, ma lo serbiamo per un prossimo studio in cui estenderemo queste nostre ricerche agli spirilli cole-

rigeni isolati nelle epidemie del 1892 e nelle attuali, i quali presentano delle proprietà interessantissime come dimostra un nuovo e recente lavoro del prof. L. VINCENZI [1], nel quale appare sempre più affermato il concetto già sostenuto, che il colera – specialmente quello di Vienna ottobre 1892 (Weichselbaum) – determina nell'organismo una vera e propria setticemia. Riserbiamo a più tardi una larga discussione sull'argomento: per ora le nostre esperienze affermano sopratutto questo; che – lo spirillo colerigeno – per lo meno quello di *Massaua-Ghinda* – è un *microrganismo attossicante, il cui veleno è rappresentato dal protoplasma del microrganismo stesso.*

Questo spirillo vivo esplica la sua azione nell'organismo in due modi:

1° *L'organismo può trionfare di esso; ma se lo spirillo è in sufficiente quantità, può a sua volta uccidere l'organismo con la sua presenza e dopo averlo esaurito con la lotta (inoculazioni endovenose).*

In tal caso non lo si ritrova all'esame microscopico e batteriologico.

2° *L'organismo ne può distruggere una porzione, la quale può agire per la propria presenza, mentre l'altra svolge la sua attività bio-chimica favorendo per di più l'azione del veleno con i prodotti del ricambio (inoculazioni sottocutanee, intramuscolari, intraperitoneali).*

In tal caso lo si ritrova microscopicamente e batteriologicamente nel punto di inoculazione.

Questo veleno è molto attivo per le cavie ($^1/_4$ di cultura nel peritoneo = gr. 0.00035 è dose mortale per animali di media taglia), discretamente attivo per i piccioni.

---

[1] L. VINCENZI: « Nuove ricerche sperimentali sul colera ». *Archivio per le scienze mediche di Bizzozero*, fasc. 2. 1893.