



MINISTERO DELL'INTERNO

Laboratori della Direzione di Sanità (Sezione batteriologica)

SULL'AZIONE

CHE IL

SIERO DI SANGUE DI ALCUNI ANIMALI

SPIEGA CONTRO LA PROPRIETÀ SPORIFICATRICE

DEL BACILLO DEL CARBONCHIO

RICERCHE

DEL

Dott. A. BORMANS

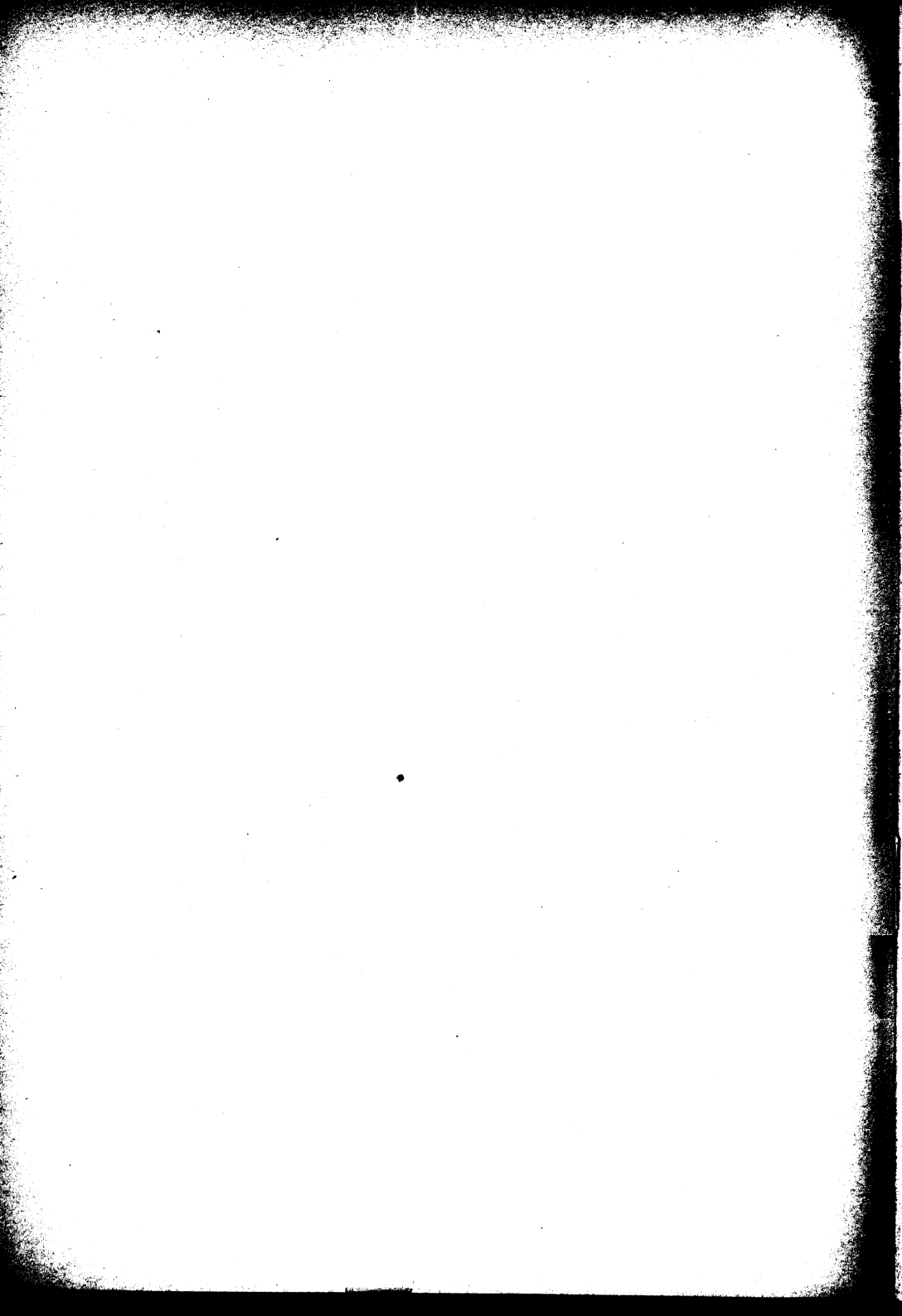
PERITO MEDICO IGIENISTA



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1895



MINISTERO DELL'INTERNO

Laboratorii della Direzione di Sanità (Sezione batteriologica)

SULL'AZIONE

CHE IL

SIERO DI SANGUE DI ALCUNI ANIMALI

SPIEGA CONTRO LA PROPRIETÀ SPORIFICATRICE

DEL BACILLO DEL CARBONCHIO

RICERCHE

DEL

Dott. A. BORMANS

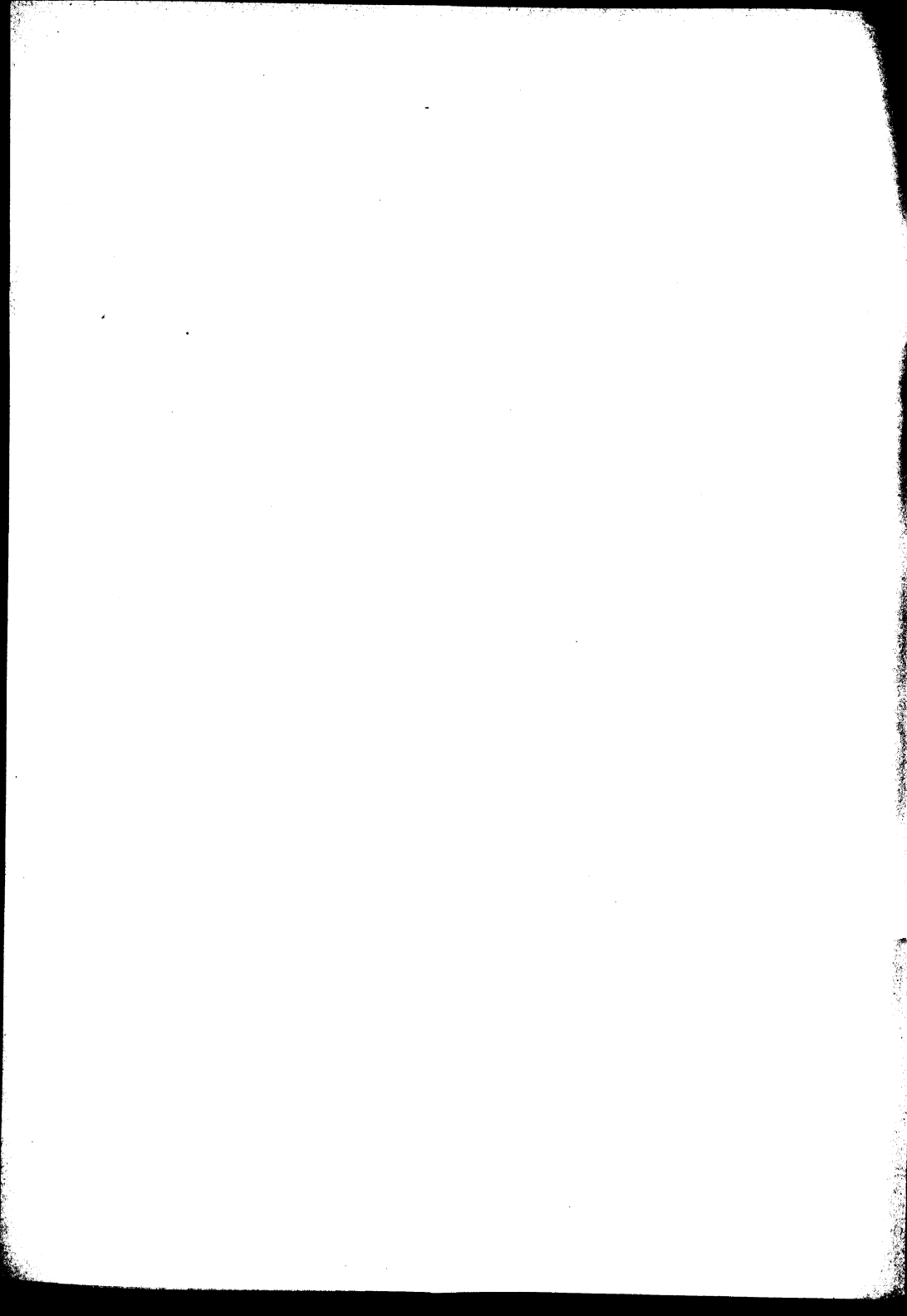
PERITO MEDICO IGIENISTA



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1895



SULL'AZIONE CHE IL SIERO DI SANGUE DI ALCUNI ANIMALI
spiega contro la proprietà sporificatrice del bacillo del carbonchio

Ricerche del dott. A. BORMANS

Perito medico igienista

La possibilità di rendere il bacillo del carbonchio incapace per sempre di produrre forme sporali fu dimostrata da Chamberland e da Roux (1), coltivando questo germe nel brodo addizionato di $\frac{1}{2000}$ di bicromato di potassio.

Essi videro che in tali condizioni il bacillo finiva per perdere la proprietà di far spore, anche quando fosse fatto passare attraverso al corpo degli animali recettivi.

Nel 1887 Lehmann (2) trovò casualmente che una vecchia cultura di carbonchio in gelatina aveva perduta la proprietà di sporificare e pubblicò il caso, non avendo però conoscenza della precedente pubblicazione di Roux e di Chamberland.

Nel 1889 Behring (3) cercò di rendere asporogeno il bacillo del carbonchio, coltivandolo in mezzi addizionati di un qualche anti-settico e venne alla conclusione che la metà od i due terzi della

(1) *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1893, pag. 1090.

(2) *Münchener medizinische Wochenschrift*, Giugno 1887.

(3) Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes. — *Zeitschrift für Hygiene*, vol. VII, 1889.

quantità di antisettico, necessaria ad impedire lo sviluppo del germe, ne ostacola la sporificazione. Egli aggiunse alla gelatina l'1% di HCl oppure tanto acido rosolico da aver una forte colorazione rosea.

Però non ebbe risultati costanti e spesso riuscì solo ad avere mancanza di spore nel primo passaggio su agar, e non nei successivi.

Seguendo lo stesso concetto, il Roux nel 1890 (1) al brodo di vitello aggiunse acido fenico.

Invece di ricorrere agli antisettici si tentò l'azione del calore, ben sapendosi già dai lavori di Koch che il bacillo del carbonchio non sporifica alla temperatura di $+42^{\circ},5$.

Il Phisalix (2) nel 1893 tenne delle culture a $+42^{\circ}$ facendo da esse trasporti ogni 5 giorni. In capo ad un mese ebbe un bacillo asporogeno. Numerosi quindi sono i metodi proposti per rendere asporogeno il bacillo del carbonchio, ma tutti diedero risultati poco costanti.

Nel dicembre dello scorso anno Surmont e Arnould (3) pubblicarono una serie di ricerche, in cui misero a nuova prova tutti i metodi proposti con un bacillo proveniente dal laboratorio Pasteur, con un bacillo attenuato e con un terzo bacillo.

Aggiunsero alle culture acido fenico, secondo il metodo Roux, ma solo eccezionalmente ebbero germi senza spore (3 su 38 tubi). Modificarono perciò questo metodo, tenendo delle culture in brodo semplice a $+42^{\circ}$ per 40 giorni, passandole poscia in brodo addizionato di acido fenico: solo il terzo bacillo resistette, gli altri divennero asporogeni.

Nelle culture con bicromato di potassio si rese asporogeno il solo bacillo attenuato, gli altri sporificarono in seno stesso del brodo al bicromato.

Col metodo di Physalix ottennero asporogeni dopo 25 giorni il carbonchio Pasteur, dopo 30 il bacillo attenuato, resistette invece il terzo bacillo.

(1) Bactériologie Charbonneuse asporogène par E. Roux — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, vol. IV.

(2) Influence de la chaleur sur la propriété sporogène du bacille anthracis, abolition persistante de cette fonction par hérédité des caractères acquis. — *Archives de physiologie*, 1893, pag. 217.

(3) Recherches sur la production du bacille du charbon asporogène par MM. SURMONT e ARNOULD. — *Annales de l'Institut Pasteur*, VIII année, n. 12, Décembre 1894.

Passati così in rivista tutti questi lavori fatti sull'argomento possiamo dire che non è ancora stato trovato un metodo sicuro per rendere asporogeni i bacilli del carbonchio di diversa provenienza.

Facendo delle ricerche sulla biologia del bacillo del tetano, Vaillard et Vincent (1) nel 1891 avevano osservato che « i liquidi organici, quali l'albumine d'uovo, l'umor acqueo, il siero di sangue di bue, di coniglio, di cavia sono poco favorevoli allo sviluppo di questo germe. Trasportandolo dal brodo su questi mezzi, ordinariamente *non sporifica*, presenta invece forme involutive e lo sviluppo è poco abbondante. »

Continuando questi studi il Vaillard (2) seminò spore di tetano in siero di un coniglio fortemente immunizzato contro questa malattia e vide che « la coltura si fa normalmente e dà luogo alla produzione di ammassi che, formano nel liquido una specie di precipitato caseoso. Esaminate queste culture al 15° giorno si trovano *più bacilli filamentosi che bacilli sporificati*, però la medesima cosa si osserva allorchando il virus è coltivato nel siero di animali non immunizzati. »

Nella nota, che trovasi in fine di questo stesso lavoro, il Vaillard parla ancora di culture fatte con bacilli tenuti per 6 o 7 giorni sotto la cute di conigli immunizzati. Egli dice che « l'esame di queste culture non lascia vedere, per così dire, bacilli sporificati, la vegetazione è quasi esclusivamente rappresentata da bacilli filamentosi, privi di spore ed incapaci di produrne nelle culture successive.

Conchiude dicendo che « la maggior parte di questi bacilli pare « abbia perduta la facoltà di sporificare. »

Anche altri liquidi organici, e non il solo siero di sangue, pare siano poco favorevoli alla sporificazione del bacillo del tetano. Brieger, Kitasato e Wasserman (3) trovarono che negli infusi di ghiandola timo questo bacillo si sviluppa senza far spore, però non diventa definitivamente asporogeno, giacchè sporifica trasportandolo in agar con glucosio.

(1) Contribution à l'étude du tétanos, par VAILLARD e VINCENT. — *Annales de l'Institut Pasteur*, Janvier 1891.

(2) De l'action des humeurs d'un animal immunisé contre le tétanos sur le virus de cette maladie. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 678.

(3) Ueber Immunität und Giftfestigung. — *Zeitschrift für Hygiene*, vol. XII, p. 149.

Venendo particolarmente al bacillo del carbonchio, si è costantemente osservato che nei tessuti e nel sangue di un animale morto di questa malattia, e non ancora putrefatto, non si trovano mai forme sporali, ma solo forme vegetative. Il fatto è stato spiegato colla deficienza di ossigeno in queste condizioni (1).

Fuori dell'organismo, nel siero di coniglio fu coltivato questo germe da Behring e Nissen (2). Essi non constatarono quasi mai la formazione di spore. Più raramente ancora videro sporificare il bacillo nel siero di bue, mentre ebbero rigoglioso sviluppo del germe con formazione di tipiche spore coltivandolo nel siero di vitello.

Il Sanarelli (3) facendo studii sul destino delle spore del carbonchio, poste in tubetti di collodion sotto la cute dei conigli in modo che vi si raccolga dello siero, vide che esse germogliano in queste condizioni. Si ha tosto una ricca cultura di bacilli carbonchiosi asporogeni, ed assai virulenti che finiscono poi per morire.

Il Terni infine, al Congresso medico internazionale tenutosi in Roma nel 1894, comunicava alla Sezione d'Igiene d'aver studiato il comportamento del bacillo del carbonchio nel siero di sangue di alcuni animali a sangue freddo. Il bacillo perde in tali condizioni il potere di sporificare, ma lo riacquista passando attraverso il corpo di animali a sangue caldo. Il siero di questi animali a sangue freddo però, riscaldato a $+55^{\circ}$, perderebbe la facoltà di impedire la sporificazione del bacillo del carbonchio.

Visti questi studii sopra l'azione che alcuni liquidi organici spiegano sul fenomeno della sporificazione, dietro consiglio del dottor Sclavo, volli estendere le ricerche e vedere come si comportasse il bacillo del carbonchio, coltivandolo in siero di sangue di varii animali a sangue caldo.

I consigli e l'aiuto dei quali il dott. Sclavo mi fu largo nel corso delle mie esperienze, hanno reso notevolmente più agevole il mio assunto, ed io gliene rendo qui le più vive grazie.

Ho scelto siero di sangue di animali recettivi per il carbonchio cioè di pecora, di vitello, di cavallo. Ebbi anche occasione di avere siero di sangue di cavallo, stato sottoposto per qualche tempo alle

(1) FRANKEL: Grundriss der Bacteriologie.

(2) BEHRING UND NISSEN: Ueber bacterien feindliche Eigenschaften verschiedener Blutserumarten. — *Zeitschrift für Hygiene*, vol. VIII, pag. 420.

(3) La destruction du virus charbonneux sous la peau des animaux sensibles. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, vol. VIII, pag. 820.

iniezioni di tossina difterica e che possedeva poco più di 30 U. I. per cmc. Con questo siero anzi incominciai le ricerche mie, che completai poi collo siero di altri animali. Il siero di vitello e di pecora fu ottenuto dal sangue arterioso coll'apparecchio Sclavo (1). Con lo stesso apparecchio non si può però raccogliere il siero di cavallo, perchè il coagulo sanguigno che si ottiene da questo animale è troppo molle nei suoi strati più bassi. Per aver quindi siero di cavallo raccolsi con ogni cautela in un recipiente sterilizzato il getto di sangue che veniva fuori dal tre quarti con cui avevo ferita la giugulare.

Le culture furono fatte in palloncini Pasteur ove di volta in volta si poneva solo quel tanto di siero necessario per ricoprire il fondo. Si avevano così i germi bene esposti all'azione dell'ossigeno atmosferico.

Le condizioni in cui mi misi in tutti gli esperimenti sono assai differenti da quelle del Roux. Questi raccomanda, per avere del carbonchio asporogeno, di tenere il brodo addizionato d'acido fenico in provette e di staccare sempre la pellicola aderente alle pareti, che si forma alla superficie del liquido. In quanto al microrganismo, ebbi cura di scegliere un bacillo che facilmente sporifica, qual'è quello che da anni si conserva nella collezione di questo laboratorio. Su agar obliquo, esso presenta ordinariamente la forma sporale dopo poco più di 24 ore ed in brodo al secondo giorno. Esperimentai pure con due culture, provenienti da Pavia, ottenute l'una da una pustola maligna dell'uomo, l'altra dal sangue di una vaccina morta di carbonchio.

Ripetei ancora le prove con un quarto germe proveniente dal Krål di Praga.

.*.*

Il giorno 23 marzo infettai con una cultura di carbonchio di laboratorio due palloncini Pasteur, contenenti uno strato sottile di siero di sangue del cavallo, sottoposto alle iniezioni di tossina difterica.

Tenni l'uno in stufa, regolata a $-\frac{1}{2}$ 36° e l'altro a $-\frac{1}{2}$ 42°; contemporaneamente feci due trasporti in palloncini di brodo, che misi nelle medesime condizioni, quali culture di confronto.

(1) A. SCLAVO: Di un nuovo apparecchio per la raccolta del siero di sangue. — *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*, 1894, N. 20.

Nel brodo il bacillo si sviluppò rapidamente; nel siero invece al 2° giorno ancora non si notava sviluppo alcuno. Nel quarto giorno incominciò ad avvertirsi una vegetazione manifesta e più nel palloncino tenuto a $+36^{\circ}$, che in quello a $+42^{\circ}$.

Esaminate al microscopio queste culture in siero, si trovarono tanto nell'una che nell'altra delle forme tozze, grosse e delle altre attorcigliate e circonvolute. I bacilli erano per la maggior parte isolati, taluni uniti a due o tre, mai in lunghi filamenti.

Ad un accurato esame, non si rinveniva alcuna forma sporale.

Ripetuti i preparati nei giorni successivi, crebbero sempre più in numero le forme degenerative, non si ebbe mai comparsa di spore.

Mantenendosi il bacillo del carbonchio, coltivato in questo mezzo, asporogeno anche nei successivi trasporti, volli vedere se passando dal siero in agar obbliquo (mezzo assai favorevole alla sporificazione), non presentasse più forme durevoli.

Ho raccolto in questa tavola il risultato delle esperienze fatte alla temperatura di $+42^{\circ}$. Il 23 marzo 1895 si infettò il palloncino contenente un sottile strato di siero di cavallo immunizzato contro la difterite.

TAVOLA I.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
28-3-95	30-3 — 1-4 +	Trasp. 2) 30-3	1-4 +
5-4-95	7-4 — 19-4 — 30-5 —	Trasp. 2) 8-4	11-4 — 19-4 — 25-4 —
		Trasp. 3) 12-4	15-4 — 17-4 —
10-4-95	12-4 — 18-4 —	Trasp. 2) 13-4	19-4 + 30-4 —
		Trasp. 3) 15-4	20-4 — 30-4 —
		Trasp. 4) 18-4	22-4 — 2-5 —
— Non sporificati + Sporificati			

Da questo specchietto risulta che, già dopo 5 giorni di permanenza nello siero, il bacillo presentava un ritardo nella sporificazione su agar obliquo, però, facendo da questa cultura un trasporto su nuovo agar, questo ritardo non si aveva più.

Aumentando i giorni di permanenza nel siero, aumenta il ritardo nella sporificazione quando si trasporta il germe in agar obliquo, fino a non aversi più la produzione di spore al primo trasporto.

La cultura di bacillo del carbonchio di laboratorio, dopo 20 giorni di cultura in siero di cavallo assoggettato alle iniezioni di tossina difterica, si era resa definitivamente asporogena.

Il trasporto del germe da siero a siero influisce assai nell'accelerare la perdita della proprietà di sporificare. Tanto è vero ciò, che, fatto dopo 6 giorni un trasporto su nuovo siero, questa nuova cultura che chiamerò *B*, non sporificò più, dopo 4 giorni di permanenza nel nuovo siero, cioè dopo 10 dal principio dell'esperienza.

TAVOLA II.

SIERO DI CAVALLO IMMUNIZZATO CONTRO LA DIFTERITE,
INOCULATO DI CARBONCHIO DI LABORATORIO IL 23-3-95, TENUTO A $+4^{\circ}$.
— FATTO NUOVO TRASPORTO IL 23-3-95.

Giorno del 1° trasporto su agar dal 2° trasporto in siero	Data e risultato dell'esame di tale trasporto su agar	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti su agar
2-4-95	5-4 —	Trasp. 2) 8-4	11-4 —
	12-4 —		1-5 —
5-4-95	8-4 — 15-4 — 30-4 —	Trasp. 2) 11-4	19-4 —
			28-4 —
			19-4 —
			26-4 —
		Trasp. 3) 13-4	18-4 —
		Trasp. 4) 16-4	1-5 —
			30-4 —
		Trasp. 5) 24-4	1-5 —
			2-5 —
		Trasp. 6) 30-4	20-5 —

Io non crelo sufficiente il semplice esame microscopico per giudicare se il germe del carbonchio ha sporificato o no, giacchè con tale esame l'osservazione non si può estendere che al un numero relativamente esiguo di batterii, e d'altra parte si trovano talora forme involutive con spazietti chiari, non colorabili con semplici soluzioni acquose dei derivati dell'anilina, tanto che simulano fino ad un certo punto la presenza di spore.

Se il preparato viene sottoposto agli speciali metodi usati per la colorazione delle spore, potrà essere riconosciuta la natura della spora solo quando l'elemento assuma la tinta caratteristica. Nessuno però dei metodi conosciuti vale per colorare in modo sicuro e costante tutte le forme durevoli di un preparato, cosicchè la mancata colorazione d'un elemento non è criterio assoluto per negare che esso sia una spora.

Per giudicare quindi e sempre con sicurezza se una data coltura di bacillo carbonchioso ha sporificato o no, anzichè ricorrere allo esame microscopico ed a speciali metodi di colorazione, è necessario servirsi della prova del calore.

Ma a quale temperatura si può esser certi d'aver ucciso tutte le forme vegetative?

Toussaint riscaldava (1) il sangue carbonchioso preso dall'animale per 10' a $+55^{\circ}$, credendo di distruggere tutti i germi, ma ulteriori studii dimostrano che questa temperatura non è sufficiente.

Roux e Chamberland (2) raccolsero sangue di montone carbonchioso in tubetti affilati alle due estremità. Questi tubetti vennero immersi in un bagno-maria regolato a $+55^{\circ}.5$, e vi furono tenuti per un tempo variabile da 5 a 40'. Mano mano che venivano estratti dal bagno-maria si portavano in stufe a $+30^{\circ}$. Dopo 3 giorni essi seminarono un po' di questo sangue in brodo e in tutti i tubi si svilupparono i bacilli del carbonchio, salvo in quello infettato col sangue carbonchioso tenuto per 40' a bagno-maria. Però, ripetendo la prova, osservarono che se la maggior parte dei bacilli è distrutta dopo 20' a $+55^{\circ}$, alcuni però resistono per più d'un'ora.

Volendo essi sterilizzare in modo sicuro il sangue carbonchioso,

(1) *Bulletin de l'Académie de médecine*, Août 1880.

(2) ROUX e CHAMBERLAND: Sur l'immunité contre le charbon conféré par des substances chimiques. — *Annales de l'Institut Pasteur*, Août 1888, pag. 405.

lo riscaldano per 5 giorni consecutivi, un ora al giorno, a bagno-maria a $+58^{\circ}$.

Per uccidere tutte le forme sviluppatesi nel siero, volendo attermi alla temperatura di 58° , avrei dovuto dunque impiegare circa 5 ore per ogni prova, tempo troppo lungo, che non avevo a mia disposizione, date le numerosissime esperienze che dovevo fare. Non potevo d'altra parte innalzare di molto la temperatura perchè allora il siero si sarebbe coagulato e nella pipetta avrei avuto una massa dura, densa che difficilmente si sarebbe prestata poi per gli innesti in tubi di brodo. Feci delle prove esponendo per un'ora a $+65^{\circ}$ provette di culture in siero che erano state tenuta in termostato a $+35^{\circ}$ e a $+42^{\circ} 5$; ma i risultati che ebbi furono contraddittorii, perchè alcuni tubi di trasporto diedero sviluppo, altri rimasero completamente sterili.

Volli fare una prova di confronto coltivando nel siero un bacillo sicuramente asporogeno, proveniente dal laboratorio del professor Roux; ma anche questa volta i risultati furono contraddittorii.

Lo sviluppo dei bacilli nei tubi di trasporto in brodo, dopo il trattamento della cultura anche a $+65^{\circ}$ per un'ora non deve quindi ascriversi solamente alla presenza di spore, ma anche a quelle di sole forme vegetative.

Volendo provare la resistenza delle forme vegetative a più alta temperatura, trasportai un po' di cultura, ottenuta in siero, in tubi di brodo che riscaldai poi a bagno-maria per un'ora. Si formavano così dei fini grumi di siero coagulato, nella massa del brodo.

Esperimentando in questo modo, solo innalzando la temperatura a 85° si è sicuri d'uccidere tutte le forme vegetative in capo ad un'ora. Ho ripetuto questa prova trasportando in tubi di brodo un po' di cultura su agar di un bacillo certamente asporogeno e di un bacillo ben sporificato. Tenni per un'ora tali trasporti a bagno maria regolati a $+70^{\circ}$, $+75^{\circ}$, $+80^{\circ}$, $+85^{\circ}$.

Solo con la temperatura di $+85^{\circ}$ ottenni costantemente la morte del germe asporogeno, mentre sopravvissero sempre le forme sporificate.

.*.*

Il mantenere la cultura a $+36^{\circ}$ oppure a $+42^{\circ}$ influisce sul tempo necessario per rendere definitivamente asporogeno il bacillo

del carbonchio, come lo dimostra la seguente tavola messa a confronto colla tavola n. 1.

TAVOLA III.

SIERO DI CAVALLO IMMUNIZZATO CONTRO LA DIFTERITE.
INOCULATO IL 23-3-95 DI CARBONCHIO DI LABORATORIO E TENUTO A $+36^{\circ}$.

Data del 1° passaggio su agar dai passaggi in siero				Data e risultato dell'esame di tali passaggi su agar	Data dei successivi passaggi su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti su agar
Primo Fatto il 23-3	Secondo Fatto il 29-3	Terzo Fatto il 5-4	Quarto Fatto il 15-4			
28-3-95				30-3 +	Trasp. 2) 30-3	1-4 +
5-4-95				7-4 — 8-4 +	Trasp. 2) 7-4	11-4 +
10-4-95				12-4 — 11-4 +		
22-4-95				24-4 +		
	2-4-95			5-4 +		
	5-4-95			7-4 — 9-4 +	Trasp. 2) 7-4	11-4 +
		10-4-95		12-4 +		
		16-4-95		18-4 +		
		20-4-95		22-4 +		
			20-4-95	22-4 — 30-4 +		
			30-4-95	2-5 — 8-5 — 15-5 +		
			20-5-95	21-5 — 10-6 — 20-6 —		
			21-6-95	21-6 — 3-7 —	Trasp. 2) 25-6 Trasp. 3) 28-6	28-6 — 2-7 — 5-7 —

Questo germe quindi, coltivato nel siero di cavallo a $+36^{\circ}$, perde con ritardo su quello tenuto a $+42^{\circ}$, la facoltà di sporificare. Solo dopo un mese e mezzo di permanenza nella stufa il ritardo a spc-

rificare sull'agar si fa notevole, e dopo due mesi non si hanno più spore al primo passaggio su agar. Attualmente si ha mancanza assoluta di spore per parecchi passaggi successivi, per cui il bacillo si può considerare come definitivamente asporogeno.

.*.

Essendo così riuscito ad avere il germe del carbonchio asporogeno, sia nel siero che nei successivi trasporti in mezzi favorevoli alla sua sporificazione, mi decisi a ripetere le esperienze con bacilli carbonchiosi di diversa provenienza.

Perciò il 3 Maggio infettai un palloncino di Pasteur con una cultura di carbonchio proveniente dal Král di Praga, e lo tenni in stufa a $+ 42^{\circ}$. Dopo cinque giorni feci trasporti su agar obliquo ed osservai già allora un ritardo nella sporificazione, perché le spore comparvero solo dopo cinque giorni, mentre il bacillo sporifica in meno di 48 ore. Dopo 10 giorni di permanenza nel siero questo germe non sporificava più al primo trasporto su agar, ma bensì, quantunque in ritardo, nei trasporti successivi. Si comportò quindi presso a poco come il bacillo di laboratorio, con cui avevo iniziato i miei studi, come può vedersi chiaramente dal seguente specchietto:

TAVOLA IV.

SIERO DI CAVALLLO IMMUNIZZATO CONTRO LA DIFTERITE, INOCULATO DI CARBONCHIO (KRÁL) TENUTO A $+ 42^{\circ}$ DAL GIORNO 3-5-95.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar		Data e risultato dell'esame di tali trasporti su agar	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti su agar
Primo passaggio in siero fatto il 3-5-95	Secondo passaggio in siero fatto il 15-5-95			
8-5-95		11-5 — 12-5 +		
13-5-95		15-5 — 18-5 — 25-5 —	Trasp. 2) 15-5	17-5 — 20-5 +
26-6-95		29-6 — 1-7 —		
	26-6-95	29-6 — 2-7 —	Trasp. 2) 2-7	5-7 — 8-7 —

Non ho fatto le corrispondenti prove colla cultura in siero tenuta a $+37^{\circ}$; solo mi limitai a constatare che esso nel siero non sporificava mai.

Volendo ricercare se il siero di sangue di altro animale si mostrasse più propizio alla sporificazione del bacillo del carbonchio, cominciai ad istituire delle esperienze con il siero di una grossa pecora, coltivando in esso, alla temperatura di $+37^{\circ}$ e $+42^{\circ}$, il bacillo carbonchioso di Král e gli altri due provenienti da Pavia.

In tutte queste culture non si ebbe mai formazione di spore, quantunque lo sviluppo fosse assai più rapido ed abbondante in questo siero che non in quello di cavallo, precedentemente adoperato.

Tale sviluppo si fece manifesto fin dal primo giorno: le forme degenerative si riscontrarono in minor numero e si ebbe produzione di filamenti più o meno lunghi.

Anche dalle culture fatte in questo siero feci trasporti su agar obliquo ed i risultati furono raccolti nella seguente tabella:

TAVOLA V.

SIERO DI PECORA INOCULATO L' 11-5-95 DI CARBONCHIO (KRÁL)
E TENUTO A $+42^{\circ}$.

Data del 1° trasporto su agar dalle culture in siero	Data e risultato dell'esame di tale trasporto su agar	Data dei successivi passaggi su agar	Data e risultato dell'esame di tali passaggi
15-5-95	17-5 +		
22-5-95	24-5 +		
26-5-95	28-5 — 30-5 +		
29-5-95	31-5 — 10-6 — 22-6 —	Trasp. 2) 31-5-95	3-6 +
26-6-95	30-6 — 5-7 —	Trasp. 2) 30-6-95	2-7 — 8-7 —
		Trasp. 3) 5-7-95	7-7 — 10-7 —

Dopo dieci giorni quindi il bacillo sporificava ancora nel primo passaggio su agar. Si aveva però, anche in questo caso, un ritardo

nella comparsa delle spore, il quale andò aumentando fino ad aversi, dopo 18 giorni, un primo trasporto asporogeno. Coltivato in siero per un mese, questo germe diventò incapace di produrre spore anche per parecchie culture successive. Invece, per le culture tenute a $+37^{\circ}$, si osservò che il germe con maggior ritardo aveva modificata la sua proprietà, tanto è vero che dopo 35 giorni si otteneva una cultura su agar, che sporificava ancora in quinta giornata. Facendo però delle successive culture in siero, si vede che il primo trasporto su agar ha già perduto definitivamente la sua proprietà dopo un mese e mezzo dacchè è incominciato l'esperimento. Trasportandolo da questo agar in altri tubi, non riuscì ancora a fare perdere definitivamente al germe il potere di sporificare.

TAVOLA VI.

SIERO DI PECORA SEMINATO L'11-5-95 DI CARBONCHIO (KRÁL)
E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar dal		Data e risultato dell'esame di tali trasporti	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
primo passaggio in siero fatto l'11-5-95	secondo passaggio in siero fatto il 25-5-95			
15-5-95		17-5 +		
25-5-95		27-5 — 29-5 +	Trasp. 2) 27-5	31-5 — 3-6 — 5-6 +
6-6-95		10-6 — 14-6 — 16-6 +	Trasp. 3) 31-5	3-6 — 5-6 +
	1-6-95	3-6 +		
	21-6-95	24-6 — 30-6 — 2-7 — 8-7 —	Trasp. 2) 24-6	26-6 +

Col bacillo del carbonchio, proveniente da una pustola maligna, ripetei la cultura in siero di pecora, ed anche per questo germe

vidi lo sviluppo abbondante delle forme vegetative, ma non riscontrai alcuna spora. Anche per i trasporti su agar obliquo ebbi press' a poco gli stessi risultati che per gli altri germi prima sperimentati.

TAVOLA VII.

SIERO DI PECORA SEMINATO L'11-5-05 CON CULTURA DI CARBONCHIO
ISOLATA DA UNA PUSTOLA MALIGNA E TENUTO A + 42°.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar		Data e risultato dell'esame di tali trasporti	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
Primo passaggio in siero fatto l'11-5-05	Secondo passaggio in siero fatto il 29-5-05			
15-5-95		17-5 +		
22-5-95		24-5 — 26-5 — 29-5 +	Trasp. 2) 24-5	27-5 +
29-5-95		31-5 — 5-6 — 10-6 —	Trasp. 2) 4-6	3-6 — 5-6 +
25-6-95		30-6 — 2-7 — 8-7 —		
	26-6-95	2-7 — 5-7 —	Trasp. 2) 2-7 Trasp. 2) 4-7	5-7 — 8-7 — 6-7 — 10-7 —

Si rileva da questa tavola notevole ritardo nella comparsa delle spore già dopo 10 giorni di permanenza nel siero, perdita della facoltà di sporificazione al primo trasporto dopo 18 giorni, si nota però che persiste ancora la sporificazione nei successivi trasporti, in cui si ha solo semplice ritardo.

Continuando la permanenza nel siero, si rende asporogeno il

germe anche nei successivi trasporti, sia sperimentando colla cultura del primo passaggio in siero, come con quella dei successivi.

Le culture tenute a $+37^{\circ}$ invece presentavano un ritardo già dopo soli cinque giorni di soggiorno in siero, ritardo che si trasmise dopo sedici giorni alle successive culture, le quali dopo meno di un mese non sporificavano più.

In questo caso la temperatura di $+37^{\circ}$ favorì la produzione della varietà asporogena, mentre nella esperienza più sopra citata si mostra a questo scopo assai più adatta quella di $+42^{\circ}$.

TAVOLA VIII.

SIERO DI PECORA INOCULATO L'11-5-95 CON CULTURA DI CARBONCHIO
ISOLATO DA UNA PUSTOLA MALIGNA E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Giorno del 1° trasporto su agar dai passaggi in siero		Data e risultato dell'esame della i trasporti	Data dei successivi passaggi in agar	Risultato dell'esame di tali trasporti
Primo fatto l'11-5-95	Secondo fatto il 29-5-95			
15-5-95		17-5 — 22-5 — 25-5 +		
25-5-95		27-5 — 31-5 — 5-6 +	27-5	5-6 — 11-6 — 15-6 +
6-6-95		24-6 — 3-7 — 10-7 —	Trasp. 2) 25-6	28-6 — 3-7 — 15-7 —
			Trasp. 3) 28-6	3-7 — 6-7 — 12-7 —
	1-6-95	3-6 — 10-6 — 22-6 —	Trasp. 2) 3-6	5-6 +
	21-6-95	24-6 — 30-6 — 5-7 —	Trasp. 2) 25-6	27-6 — 2-7 — 8-7 —
			Trasp. 3) 28-6	1-7 — 5-7 — 10-7 —

Anche col carbonchio proveniente da Pavia ed isolato da una vaccina, la proprietà di sporificare andò perduta prima a $+37^{\circ}$ che non a $+42^{\circ}$, come risulta dalla comparazione delle due seguenti tavole. A $+42^{\circ}$ anzi non sono neppure riuscito ad avere un ritardo nella sporificazione sull'agar obliquo, mentre a $+37^{\circ}$, colle primitive culture su siero, avevo ritardo dopo un mese e perdita della facoltà di sporificare dopo 40 giorni al primo passaggio su agar, con ritardo nei passaggi successivi.

Il fare trasporti in siero influì anche su questo germe, avendo ottenuto un ritardo notevole nello sporificare e produzione di scarso numero di spore già dopo 19 giorni.

TAVOLA IX.

SIERO DI PECORA INOCULATO L'11-5-95 DI CARBONCHIO
RICAVATO DA UNA VACCINA E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar dal		Data e risultato dell'esame di tale trasporto	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
primo passaggio in siero fatto l'11-5-95	secondo passaggio in siero fatto il 29-5-95			
15-5-95		17-5 +		
24-5-95		27-5 +		
15-6-95		17-6 — 19-6 — 21-6 +		
21-6-95		24-6 — 28-6 — 4-7 —	Trasp. 2) 24-6	26-6 — 2-7 +
	1-6-95	3-6 + (*)		
	15-6-95	18-6 — 22-6 — 25-6 +		
	18-6-95	20-6 — 25-6 — 3-7 —	Trasp. 2) 24-6	26-6 — 28-6 +

(*) Rare spore.

TAVOLA X.

SIERO DI PECORA INOCULATO L'11-5-95 DI CARBONCHIO
RICAVATO DA UNA VACCINA E TENUTO A + 42°.

Giorno in cui fu fatto il primo trasporto su agar dal		Data e risultato dell'esame di tale trasporto
primo passaggio in siero fatto l'11-5-95	secondo passaggio in siero fatto il 29-5-95	
15-5-95		17-5 +
22-5-95		24-5 +
29-5-95		31-5 +
26-6-95		1-7 +
	10-6-95	12-6 +
	15-6-95	17-6 +
	26-6-95	1-7 +

Le prove fatte col siero di vitello rimontano a minor tempo, ma anche da queste risulta la mancanza assoluta di spore nella cultura in siero, il ritardo ed infine la perdita assoluta di sporificare non solo al primo, ma anche nei successivi trasporti su agar. Bastino a dimostrarlo queste due tabelle:

TAVOLA XI.

SIERO DI VITELLA INOCULATO IL 17-6-95 DI CARBONCHIO (KRÁL)
E TENUTO A + 37°.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar dalla cultura in siero	Data e risultato dell'esame di tale trasporto	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
22-6-95	24-6 —	Trasp. 2) 25-6	27-6 —
	3-7 —		2-7 —
	10-7 —		8-7 —
		Trasp. 3) 27-6	1-7 —
			5-7 —
		Trasp. 4) 1-7	3-7 —
			5-7 —
			10-7 —
		Trasp. 5) 3-7	5-7 —
			10-7 —

TAVOLA XII.

SIERO DI VITELLA INOCULATO IL 17-3-95 DI CARBONCHIO (KRÁL)
E TENUTO A $+ 42^{\circ}$.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar dalla cultura in siero	Data e risultato dell'esame di tale trasporto	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
22-6-95	24-6 —	Tarsp. 2) 25-6	27-6 —
	30-6 —		2-7 —
	5-7 —		
		Trasp. 3) 28-6	2-7 + (*)

(*) Rarissime spore

Lo stesso dicasi per il siero di cavallo, non sottoposto alle iniezioni di tossina difterica. Lo sviluppo è assai più abbondante che nel siero di cavallo prima sperimentato; si ha un minor numero di forme degenerative, ma anche in questo nessuna spora. Maggiore poi il ritardo nel rendersi asporogeno del bacillo del carbonchio, come si vede dalla seguente tabella.

Trascrivo solo queste prove fatte col bacillo proveniente da Praga, essendo quasi identiche quelle per gli altri germi, su cui ripetei le prove.

TAVOLA XIII.

SIERO DI CAVALLO INOCULATO DI CARBONCHIO (KRÁL)
IL 17-3-95 E TENUTO A $+ 37^{\circ}$.

Data del 1° trasporto su agar dalle culture in siero	Data e risultato dell'esame di tale trasporto	Data del successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
22-6-95	24-6 —	Trasp. 2) 25-6	27-6 —
	28-6 —		30-6 —
	2-7 +		1-7 +
		Trasp. 3) 27-6	30-6 —
			2-7 +
		Trasp. 4) 1-7	3-7 +

Dal risultato di tutte le esperienze riferite si può concludere che la temperatura di $+37^{\circ}$ o quella di $+42^{\circ}$ poco influiscono nel rendere asporogeno il bacillo del carbonchio. Pare piuttosto che un germe perda più o meno presto la facoltà di sporificare a seconda della qualità del siero in cui si coltiva e che vi influisca pure assai la qualità del germe con cui si sperimenta.

Volli riscaldare previamente il siero per parecchie ore a $+55^{\circ}$... $+60^{\circ}$, temperatura alla quale il siero si mantiene tuttora liquido ed in cui, com'è dimostrato, perde alcune sue proprietà, come per esempio il suo potere battericida. Dopo due ore di permanenza a questa temperatura il siero diventa leggermente opalino.

Feci culture con tutti e quattro i bacilli coi quali avevo eseguito la prima serie delle mie esperienze nei sieri previamente riscaldati fra i $+55^{\circ}$ ed i $+60^{\circ}$. In tutti constatai assenza assoluta di spore e le forme vegetative si svilupparono né più né meno che nel siero ordinario non riscaldato.

Facendo trasporti su mezzi solidi pare quasi che il bacillo si renda più presto asporogeno. Una cultura di siero di vitello fatta con un bacillo carbonchioso proveniente da una pustola maligna dell'uomo, tenuta in stufa a $+37^{\circ}$ per 7 giorni, aveva già perduto la facoltà di sporificare non solo al primo, ma anche ai successivi trasporti su agar.

TAVOLA XIV.

SIERO DI VITELLA, PREVIAMENTE RISCALDATO A $+55^{\circ}$, INOCULATO IL 10-6-05
DI CARBONCHIO RICAVATO DA UNA PUSTOLA MALIGNA E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Data del 1° trasporto su agar dalla cultura in siero	Data e risultato dell'esame di tali trasporti	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
22-6-05	24-6 — 3-7 —	Trasp. 2) 25-6	27-6 — 3-7 —
		Trasp. 3) 27-6	2-7 — 5-7 —
		Trasp. 4) 2-7	4-7 — 6-7 —

Anche lo siero di cavallo riscaldato dà gli stessi risultati.

TAVOLA XV.

SIERO DI CAVALLO, PREVIAMENTE RISCALDATO A $+55^{\circ}$, INOCULATO IL 15-6-95
DI CARBONCHIO DI LABORATORIO E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Data del 1° trasporto su agar dalla cultura in siero	Data e risultato dell'esame di tali trasporti	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
26-6-95	24-6 — 2-7 —	Trasp. 2) 25-6-95 Trasp. 3) 27-6-95	3-7 — 5-7 — 1-7 +

Nello stesso periodo di tempo lo siero di pecora riscaldato non riuscì a rendere asporogena una sola cultura, come può vedersi dai seguenti specchietti:

TAVOLA XVI.

SIERO DI PECORA, PREVIAMENTE RISCALDATO A $+55^{\circ}$, INOCULATO IL 15-6-95
DI CARBONCHIO RICAIVATO DA UNA PUSTOLA MALIGNA E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Data del 1° trasporto su agar dalla cultura in siero	Data e risultato dell'esame di tali trasporti	Data dei successivi trasporti su agar	Data e risultato dell'esame di tali trasporti
22-6-95	24-6 — 30-6 — 3-7 +	Trasp. 2) 25-6-95 Trasp. 3) 27-6-95	28-6 — 3-7 + 30-6 — 3-7 +

TAVOLA XVII.

SIERO DI PECORA, PREVIAMENTE RISCALDATO A $+55^{\circ}$, INOCULATO IL 15-6-95
DI CARBONCHIO DI LABORATORIO E TENUTO A $+37^{\circ}$.

Giorno in cui fu fatto il 1° trasporto su agar dalle culture in siero	Risultato dell'esame di tale trasporto
11-6-95	14-6 +
21-6-95	24-6 + (*) 3-7 +
22-6-95	24-6 — 30-6 — 3-7 +
—	(*) Rarissime spore

Il risultato di tutte le esperienze fatte si può in breve riassumere nelle seguenti:

CONCLUSIONI (1).

1°) I bacilli del carbonchio di varia provenienza coltivati nel siero di due cavalli, di una pecora e di un vitello, non produssero mai spore.

2°) Questo fatto è da attribuirsi all'esistenza di speciali sostanze che trovansi nel siero e non alla deficienza d'ossigeno.

3°) Permanendo in siero il bacillo del carbonchio, sia alla temperatura di $+37^{\circ}$ che a quella di $+42^{\circ}$, può perdere definitivamente la facoltà di sporificare nelle culture su agar.

4°) Il diventare più o meno presto asporogeno dipende dalla natura del siero e dalla provenienza del bacillo.

5°) Il riscaldamento preventivo a $+55^{\circ}$ non fa perdere al siero la proprietà di impedire la sporificazione.

6°) Il bacillo del carbonchio diventa più facilmente asporogeno se viene trasportato da siero a siero a brevi intervalli di tempo.

(1) Le conclusioni di questo lavoro furono comunicate dal prof. Foà all'Accademia di Medicina di Torino nella seduta del 19 luglio 1905.

7°) La forma vegetativa del bacillo del carbonchio possiede talora una resistenza assai grande al calore, potendo in alcuni casi mantenersi viva per più di un'ora a $+80^{\circ}$.

8°) Il bacillo del carbonchio si conserva a lungo nelle culture in siero, avendolo trovato vivo anche dopo cinque mesi.

Roma, 15 settembre 1895.



