



DOTT. GOFFREDO MARI

SULLA VITALITÀ DEI GLOBULI BIANCHI DEL SANGUE

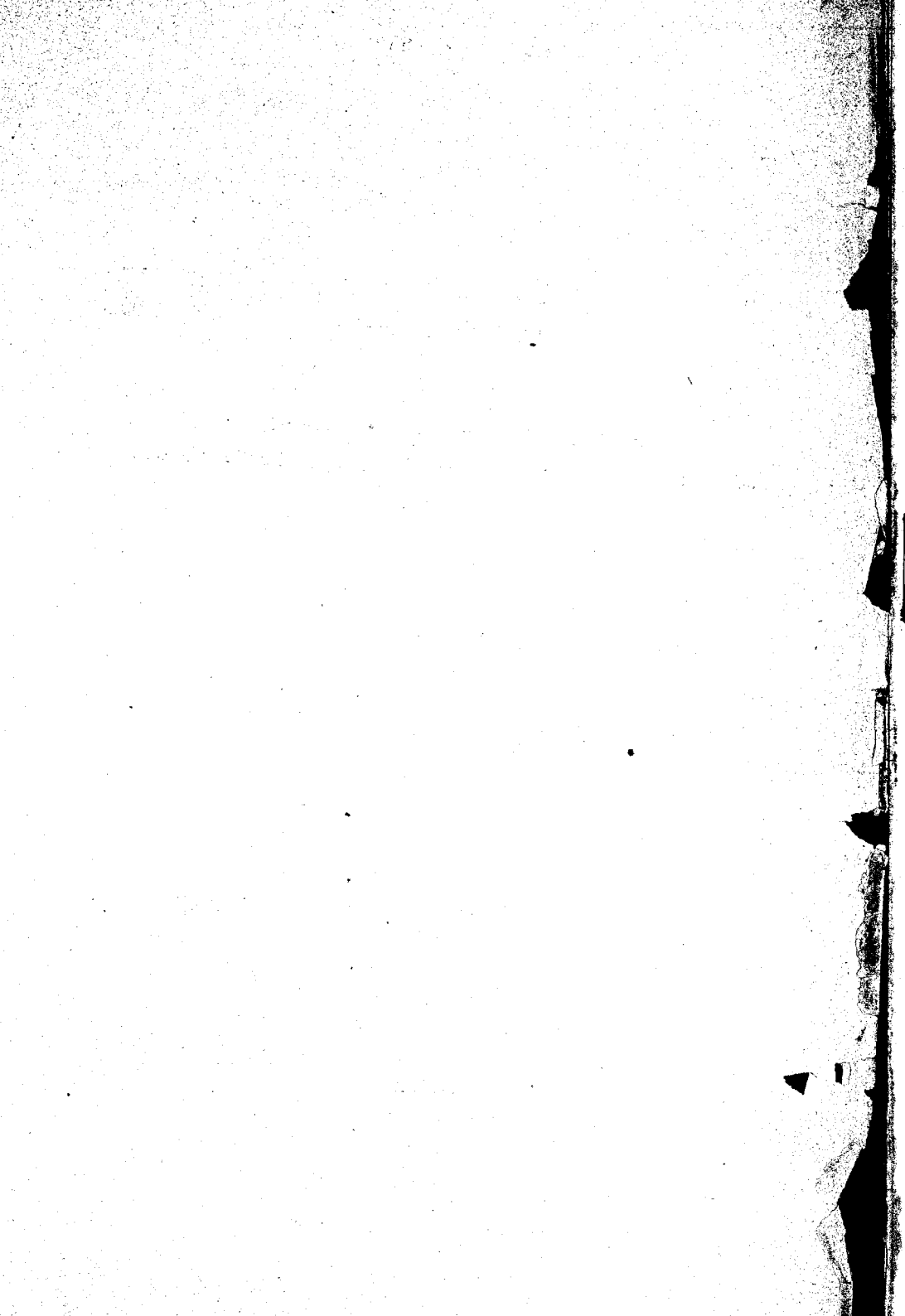
Nuovi metodi di studio — Prime ricerche
Deduzioni in merito alla ipo- ed alla iperleucocitosi nelle infezioni.



Estratto dal POLICLINICO, Volume XII-M., 1905



ROMA
N. 219 - Corso Umberto I - N. 219
—
1905



DOTT. GOFFREDO MARI

SULLA VITALITÀ DEI GLOBULI BIANCHI DEL SANGUE

Nuovi metodi di studio — Prime ricerche
Deduzioni in merito alla ipo- ed alla iperleucocitosi nelle infezioni.

Estratto dal POLICLINICO, Volume XII-M., 1905



ROMA
N. 219 - Corso Umberto I - N. 219

1905

R. CLINICA MEDICA DELLA UNIVERSITÀ DI ROMA

diretta dal prof. GUIDO BACCHELLI.

Sulla vitalità dei globuli bianchi del sangue

Nuovi metodi di studio - Prime ricerche

Deduzioni in merito alla ipo- ed alla iperleucocitosi nelle infezioni

per il dott. GOFFREDO MARI, assistente.

L'importanza degli studi sulla vitalità dei globuli bianchi del sangue appare, senz'altro, manifesta, per poco si rifletta non esservi quasi fenomeno patologico che si svolga senza l'intervento di questi elementi cellulari e per poco si consideri la parte che anche le più recenti indagini assegnano all'attività, vuoi diretta, vuoi indiretta, dei leucociti, nella lotta contro gli agenti infettivi e nei processi di immunizzazione dell'organismo.

È ancor lungi dalla sua definitiva soluzione la disputa tra i fautori della teoria cellulare fagocitaria e la teoria, per così dire, umorale, che ritiene la immunità come una pura azione del siero. Orbene è lecito aspettarsi dallo studio della vitalità dei leucociti preziosi contributi i quali valgano a meglio chiarire questo problema di così alta importanza per la dottrina della difesa opposta dall'organismo alle infezioni che ne insidiano l'integrità.

A tal uopo riteniamo debba essere non senza valore determinare se gli agenti infettivi a contatto dei leucociti esplicano sui medesimi un'azione diretta od indiretta, mercè i loro prodotti tossici di ricambio; se i mezzi medicamentosi da noi messi in opera a scopo curativo esercitano sui globuli bianchi una qualche azione, e l'indagare in che modo questa azione si esplica; ed infine quale influenza abbiano sui leucociti varie condizioni fisiche, fra cui principale quella delle temperature e massimamente la reazione febbrile dell'organismo.

Nè a ciò soltanto si limiteranno i vantaggi che possono attendersi dallo studio della vitalità dei globuli bianchi del sangue; anche dal lato clinico-

diagnostico esso ripromette utili frutti ove si riesca a cogliere le modificazioni che tale vitalità subisce nei vari momenti della lotta contro i diversi agenti morbosi.

Il campo delle ricerche al riguardo è dunque assai vasto ed anche solo una rapida esplorazione di esso, quale noi intanto ci proponiamo, richiede lavoro considerevole e tempo non breve.

I.

Scorrendo le pubblicazioni venute in luce negli ultimi decenni si resta sorpresi dall'immenso sviluppo assunto dalla letteratura ematologica, per quanto soprattutto concerne la morfologia e la struttura degli elementi bianchi del sangue, sia negli stati normali che nei patologici; ma non altrettanto rapido è proceduto lo studio fisio-patologico di queste unità viventi e ben poco è noto della loro vitalità e delle cause che la modificano.

Non che di tali ricerche non si apprezzasse l'utile; ma difettava un metodo adatto d'investigazione. Non pertanto non sono mancati tentativi, tutti basati sull'osservazione dei movimenti ameboidi del leucocito vivente. Finchè questi movimenti persistono, niun dubbio che debba persistere anche la vita della cellula; ma per quanto dimostrativi i fenomeni di motilità allorchè sono constatabili, altrettanto insufficiente è l'assenza di essi per fornire un giudizio della cessazione della vita. In quanto che e la bassa temperatura e fatti meccanici ed altre molteplici cause possono paralizzare e rendere meno evidente l'attività dei pseudopodi, mentre ancora il globulo bianco è nel suo pieno vigore di vita.

Ma astraendo da ciò, è incontestabile che il seguire i movimenti ameboidi al microscopio, col tavolino riscaldato, richiede un'osservazione estremamente paziente, faticosa, estenuante, e che nella pratica non potrà mai raggiungere una vasta applicazione.

Ne emerge la necessità di adottare per tal genere di studi altri criteri e metodi che rendano agevole e a colpo d'occhio evidente lo stato di vita o di morte della cellula.

Codesto metodo ci è fornito in modo mirabile dalla proprietà che hanno le cellule, poste a contatto di alcune sostanze coloranti, di non assumere nessuna colorazione finchè sono viventi e di colorarsi in tutto od in parte (nucleo) non appena morte.

Spetta ad Ehrlich il merito di aver messo in luce la proprietà delle cellule viventi, di ridurre le sostanze coloranti trasformandole in combinazioni scolorate. Il potere riducente della cellula deve ritenersi come l'espressione del suo bisogno di O e lo prova il fatto che il potere stesso si affie-

volisce grandemente in presenza di ricca quantità di questo elemento, mentre si rende più evidente con la sua esclusione.

Il processo per cui la sostanza colorante viene trasformata in una combinazione scolorata (leucobase) non consiste nella sottrazione diretta di atomi di O al colore; nel liquido ambiente avviene invece una scomposizione della molecola di H^2O e mentre la cellula si appropria l'O di cui abbisogna per vivere, i due atomi di H vengono assunti dalla sostanza colorante, producendosi in tal guisa una riduzione indiretta della medesima.

Esposte all'aria le sostanze decolorate, riacquistano, salvo qualche eccezione (verde diazina), il loro primitivo colore.

Le sostanze colorate che più facilmente vengono ridotte sono le basiche e tra queste le più generalmente usate sono il rosso neutro ed il bleu di metilene, preferibili anche perchè meno venefiche per il protoplasma. E la loro riduzione si compie meglio in soluzione alcalina che non in soluzione neutra od acida.

Fu dibattuto se veramente il protoplasma vivo resta sempre scolorato a contatto delle sostanze coloranti facilmente riducibili: sta di fatto che oltre le sostanze albuminoidi estranee incluse nelle cellule per fagocitosi (Plato) possono assumere il colorito col rosso neutro anche i granuli propri delle cellule, i quali non tutti sono, indubbiamente, di natura paraplasmatica come i granuli zimogeni del pancreas, ma alcuni di essi sembrano costituiti da vero protoplasma funzionante. Certo vi hanno nei batteri vivi e semoventi (Nakanishi) dei granuli, che assumono il colorito col bleu di metilene e che Nakanishi ritiene granuli generanti spore, granuli sporogeni dei bacilli. Infine è noto per gli studi di Ehrlich che il protoplasma vivente delle cellule nervose gangliari ed il cilindro assile si colorano col bleu di metilene.

Il fenomeno della colorazione di un qualche tessuto o di parti cellulari — siano queste sostanze estranee incluse nel corpo della cellula, o parti costituenti e funzionanti della cellula medesima — è designato col nome di « colorazione vitale ».

Il protoplasma vivente adunque, come i fatti addotti dimostrerebbero, può assumere vitalmente il bleu di metilene, il rosso neutro, ecc. Ma lo stesso non avviene per i nuclei cellulari. Casi di colorazione sicuramente vitale dei nuclei con dette sostanze non sono noti; cosicchè si ritiene che « sempre vi ha una colorazione del nucleo sol quando sono sopraggiunti segni sicuri della morte della cellula » (Michaelis) (1).

Il criterio che fa della colorazione del nucleo l'espressione della morte della cellula viene naturalmente adottato anche per i globuli bianchi del sangue. E gli autori che si sono occupati della colorazione vitale di detto

(1) L. MICHAELIS. *Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen* (1902).

tessuto sono omai tutti concordi nel ritenere che il nucleo dei leucociti non si colora durante la vita della cellula; ma assume rapidamente il colore tosto che essa muore.

Per la colorazione vitale del sangue furono dai vari autori usati metodi diversi.

Arnoldt, dal midollo secco di sambuco, taglia col microtomo sottilissimi dischi, che dopo aver fatto bollire, a scopo di sterilizzazione, in una soluzione al 0.7 % di cloruro di sodio ed asciugati, mette nel centro di un copri-oggetti sterile; quindi vi pone sopra una gocciolina di sangue ed applica il vetrino così preparato su un porta-oggetti a vaschetta chiudendone i margini con vaselina. Aggiungendo al preparato alcuni granuli di bleu di metilene e di rosso neutro si può osservare la colorazione vitale.

A. Wolf, studiando i movimenti ameboidi nella miscela di Deetjen (agarsalzgemenge), trovò opportuno servirsi della colorazione vitale, che egli otteneva tingendo con le sostanze coloranti, la miscela suddetta.

Pappenheim si è valso del bleu di metilene o del rosso neutro in sostanza che poneva in quantità minime sul porta-oggetti, su cui poi applicava il vetrino col preparato di sangue e ne chiudeva i margini con la cera.

Plato, allo scopo di colorare i gonococchi nell'interno dei leucociti, si è servito di una soluzione di rosso neutro assai diluita (un cmc. di una soluzione acquosa di rosso neutro, satura a freddo in 100 cmc. di una soluzione fisiologica di cloruro sodico) che poneva in un porta-oggetti a vaschetta insieme al secreto uretrale.

Un notevole progresso nella tecnica della colorazione vitale è segnato dal metodo di Nakanishi; però già Uhma, quasi contemporaneamente a lui, si era valso di un metodo analogo, allo scopo di ottenere nel pus una colorazione differenziale tra i gonococchi di Neisser ed altri bacteri.

Nakanishi (1) spalma su un porta-oggetti una soluzione acquosa satura a caldo di bleu di metilene nel modo che segue: ne fa cadere una goccia sul porta-oggetti, strofina con pannolino o con carta da filtro alcune volte in un senso e nell'altro, poi prima che la sostanza colorante si dissecchi ne asporta l'eccesso in modo che il vetrino resti di un colorito bleu-cielo. Oppure spalma il porta-oggetti con una soluzione di bleu di metilene quasi bollente e dopo seccato pulisce con un pannolino asciutto fino a che si è ottenuta l'opportuna *nuance* di colore.

Sui porta-oggetti così preparati mette il liquido da esaminare e copre col vetrino.

(1) K. NAKANISHI. *Vorläufige Mitteilungen über eine neue Färbungsmethode*, ecc. (Münch. med. W. 1900, n. 6).

Rosin e Bibergeil (1) hanno ancora perfezionato il metodo spalmando di colore il copri-oggetti, disponendo su questo il sangue in sottile strato, poi rovesciandolo su un porta-oggetti concavo e chiudendone i margini a tenuta d'aria con paraffina.

Essi si servivano possibilmente di soluzioni alcoliche o acquose concentrate e le spalmavano sul copri-oggetti col margine di un altro vetrino; questo veniva bagnato nella soluzione colorante, poi tenendolo ad angolo leggermente acuto, si faceva scorrere sulla superficie del copri-oggetti da spalmare col colore. Evaporato l'alcool il colore appare sul copri-oggetti come una leggera tinta (ombra), che si rende evidente osservando su fondo bianco.

Anche il sangue viene successivamente disposto sul porta-oggetti in leggero strato, in modo analogo, col margine di un vetrino, ed il preparato si applica infine sul porta-oggetti cavo, circondandolo con vaselina per impedire l'evaporazione. « Così si riesce a mantenere il sangue per lungo tempo fresco ed in principio persino vivente e ad ottenerlo poi colorato nel modo che si dirà più sotto ».

Con gli anzidetti metodi furono studiate varie particolarità, le quali con la colorazione vitale si rendono meglio evidenti che con le comuni colorazioni a secco; singolare interesse offrono in proposito le osservazioni di Rosin e Bibergeil sui fenomeni che precedono la morte dei leucociti trattati con diverse sostanze coloranti basiche ed acide.

Dei fatti messi in luce da questi autori rileveremo soltanto i seguenti:

I leucociti, nelle preparazioni col su'descritto metodo, mostrano da principio il loro protoplasma tinto debolmente in bleu; ma ben presto espellono il colore che forse li aveva impregnati in forma di leucobase: questo penetra nei globuli rossi circostanti che si tingono intensamente in bleu, cosicchè si vede la cellula bianca circondata da un anello di emazie di colorito bleu intenso (zona cromofora). Questo fenomeno si ha coi leucociti polinucleari e con le mastzellen, mentre nei linfociti d'ordinario non si osserva. Successivamente i movimenti ameboidi dei polinucleari a poco a poco si perdono e si rigonfiano (rigonfiano meno le cellule eosinofile, mai le basofile); in alcuni leucociti si può osservare il fenomeno singolare di un vivacissimo movimento dei granuli e infine il leucocito prende la sua colorazione definitiva, mentre gli eritrociti che avevano assunto il color bleu, si scolorano nel corso di minuti.

(1) Priv. Doz. H. ROSIN und D.r E. BIBERGEIL. *Ergebnisse vitaler Bluthfärbung*. Deutschen Med. W. 1902, n. 3-4 (contiene varie citazioni letterarie relative alla colorazione vitale).

Nei leucociti polinucleari la colorazione avviene spesso in forma esplosiva inquantochè, mentre ha luogo una contrazione, visibile al microscopio, del corpo cellulare, il nucleo si colora improvvisamente in bleu. Il protoplasma della cellula rimane scolorato e solo qua e là in alcuni leucociti si scorgono scarsi granuli colorati in bleu. Anche il corpo delle eosinofile rimane scolorato.

Nelle mastzellen i granuli vanno successivamente colorandosi di un violetto intenso (colorazione metacromatica) mentre i nuclei appaiono di debole colorito bleu; i granuli ne circondano la zona chiara, come un anello.

Un gruppo di cellule mononucleari che non sono linfociti, ma vanno annoverate tra le forme di passaggio (Übergangsformen), le quali prima della colorazione sono parimenti circondate dalla zona di eritrociti colorati, mostrano un nucleo rotondo intensamente colorato ed un protoplasma relativamente ampio, traversato da granuli filamentososi.

Nei linfociti ha luogo fin da principio una colorazione sempre più intensa dell'orlo protoplasmatico; a poco a poco si colorano anche i loro nuclei e si mantengono per più giorni definitivamente colorati nel modo che segue: nucleo bleu con un piccolo nucleolo più oscuro, rotondo, sito eccentricamente ed uno strato protoplasmatico bleu scuro d'aspetto alquanto lamelloso e sfrangiato.

Per le particolarità che riguardano gli altri elementi del sangue e degli stessi leucociti cimentati con altre sostanze coloranti rimandiamo allo scritto originale degli autori.

Nakanishi (1) avrebbe poi constatato col mezzo della colorazione vitale che il sangue di un individuo sano contiene circa dal 3 al 5 % di leucociti morti (o presso a morire) di cui la maggior parte polinucleati neutrofili, mentre i linfociti sarebbero tutti o quasi tutti vivi.

Il sangue di bue difibrinato e tenuto nel refrigerante conservava già dopo dieci giorni molti leucociti vivi scolorati e con evidenti movimenti ameboidi. Lo stesso fatto si verificò nel sangue dell'uomo e di altri animali. Negli essudati si sarebbero trovati persino dopo quattro settimane, leucociti viventi, sebbene in scarso numero.

La temperatura di 50 centigradi dopo circa mezz'ora di azione sul sangue produceva tosto la morte di tutti i globuli bianchi.

Chiudiamo questa breve rassegna bibliografica con un cenno sul metodo bioscopico di Neisser e Wechseberg (2) metodo che si scosta note-

(1) K. NAKANISHI. *Beiträge zur Kenntniss der Leucocyten und Bacteriensporen*. Munch. med. W. 1900, n. 20.

(2) M. NEISSER u. F. WECHSEBERG. *Ueber eine neue einfache Methode zur Beobachtung von Schädigungen lebender Zelle und Organismen*. Munch. med. W. 1900, n. 37.

volmente da quelli adottati dai precedenti, inquantochè consente di osservare il fenomeno della morte dei leucociti ad occhio nudo, senza ricorrere all'esame microscopico.

N. e W. si procuravano dei leucociti in gran numero ed isolati dagli altri elementi del sangue, provocando nel cavo pleurico di un coniglio un essudato asettico mercè l'iniezione di aleuronato.

Introducevano in un tubicino da saggio, stretto, per esempio $\frac{1}{4}$ cmc. di questo essudato, lo diluivano poi con una soluzione fisiologica di Na Cl fino ad un volume totale di liquido uguale a 2 cmc.; vi aggiungevano una goccia di una soluzione tenue di bleu di metilene ed infine vi versavano uno straterello di paraffina liquida allo scopo di sottrarre il miscuglio dal contatto dell'O dell'aria. Posto il tubicino nel termostato, se i leucociti eran vivi, in capo a poco tempo, press'a poco due ore, lo strato inferiore del liquido tinto col bleu di metilene si decolorava; ma se uccidevansi previamente i leucociti, col calore o con qualsiasi altro mezzo — per esempio nel caso degli autori, mercè la leucocidina stafilococcica — allora il liquido rimaneva bleu, segno questo indubbio che i leucociti avevano perduto il loro potere riducente.

..

Metodo macroscopico. — Nell'iniziare le nostre ricerche sulla vitalità dei globuli bianchi del sangue noi prendemmo le mosse appunto dal testè citato metodo bioscopico, basandoci però su un principio diverso da quello di Neisser e Wechseberg, sul principio cioè di utilizzare quale indice della durata della vitalità dei leucociti non il fenomeno della riduzione macroscopica della soluzione di bleu di metilene, ma quello invece della successiva sua ricolorazione dopo la loro morte, ricolorazione che ha luogo allorchè l'accesso all'O non è impedito dalla chiusura con uno strato di olio di vaselina, rimanendo perfettamente libero il contatto dell'aria atmosferica col liquido.

E per procedere con ordine, noi pensammo anzitutto che non fosse necessario isolare i leucociti dagli altri elementi del sangue per osservare il fenomeno della riduzione; sarebbe semplicemente bastato procurare nel sangue raccolto in un tubicino la separazione di uno strato di leucociti dai globuli rossi mercè la centrifuga.

I leucociti che si raccolgono sulla parte superiore del sedimento in immediato contatto colla soluzione colorata avrebbero dovuto manifestare su questa il loro potere riducente.

Nel procedere all'esperimento fu mescolata al sangue, nell'atto della sua fuoriuscita, una soluzione tenue di bleu di metilene in ossalato di sodio all' 1 % e questo allo scopo d'impedire la coagulazione.

Avvenne quanto era stato preveduto: la colonna liquida del tubicino, al di sopra del sedimento si decolorava nello spazio di circa due ore, come negli esperimenti di N. e W.

È da notare che la decolorazione non si inizia sempre ad immediato contatto col sedimento; ma spesso un poco più in alto; ciò verosimilmente per il fatto che con una limitata centrifugazione non tutti i leucociti vengono perfettamente depositati e mentre quelli rimasti sospesi nel liquido per procurarsi l'O devono più subitamente procedere alla riduzione del bleu di metilene, gli altri invece dello strato più infimo lo fanno solo più tardi, potendo intanto usufruire dell'O che si diffonde dall'emoglobina dei sottostanti globuli rossi.

Si sarebbe potuto obiettare a questo nostro procedimento che sperimentando non sui leucociti isolati, ma su un intero tessuto contenente altri elementi, come il plasma, le emazie, ecc., questi avrebbero potuto se non determinarlo interamente, almeno prender parte al fenomeno della riduzione.

Intanto, per quanto le precedenti esperienze ponessero fuori di qualsiasi dubbio la proprietà riducente dei globuli bianchi, nondimeno volemmo convincerci, con esperienze, che i leucociti separati direttamente dal sangue estratto dai vasi fossero in grado di indurre una riduzione macroscopica sulla soluzione di bleu di metilene.

Se si centrifuga del sangue in tubi aventi ambo le estremità affilate a capillare e dopo la centrifugazione si elimina il sedimento di globuli rossi spezzando con la lima ed asportando il segmento di tubo che lo contiene, centrifugando poi di nuovo in senso inverso, avviene che i globuli rossi, ancora rimasti mescolati ai leucociti, si separano per raccogliersi nella porzione più distale del capillare e si possono quindi successivamente eliminare; si riesce così a raccogliere un certo numero di globuli bianchi quasi isolati dai rossi. Ebbene, essi a contatto della soluzione di bleu di metilene esercitano un'energica azione riducente.

Se abbastanza agevole è per tal modo l'ottenere dal sangue dei globuli bianchi quasi isolati, ben più difficile, anzi impossibile è l'ottenere dei globuli rossi privi dei bianchi. Tuttavia si può considerevolmente diminuire il numero di questi ultimi defibrinando il sangue. Si sa che nell'atto della coagulazione va distrutto dal 60 all'80 % di leucociti. Se poi si centrifuga il sangue defibrinato e si eliminano gli strati superiori del sedimento, si ottengono delle emazie non completamente libere da leucociti, ma con un numero poverissimo dei medesimi, tanto che procedendo alla prova bioscopica, mentre si constata come i globuli rossi non producano alcuna riduzione macroscopica visibile, anche l'azione dei globuli bianchi residuanti è così scarsa che non si rende più manifesta ad occhio nudo.

Neppure il siero, almeno nella concentrazione di colore che si adoperava, ha provocato una scolorazione evidente.

Si sarebbe anche potuto verificare l'azione delle piastrine separandole con la prolungata centrifugazione dagli altri elementi del sangue di maggior peso specifico. Ma ci è parsa superflua una tale ricerca, avendo gli studi di Deetjen reso noto che la vitalità di questi elementi fuori dell'organismo è molto debole e breve, cosicchè se pure sono in grado di esercitare una riduzione macroscopica visibile della soluzione di bleu di metilene, la loro azione non potrà essere che di breve durata.

Assodato così che la presenza degli altri elementi del sangue non influiva notevolmente sulla riduzione operata dai leucociti sulla soluzione di bleu di metilene ci parve che si potesse trarre da questo fenomeno un metodo facile e pratico per lo studio macroscopico sulla durata della vitalità di questa specie di cellule, se dessa è sempre uguale negli individui sani, se è modificata dagli stati patologici, come ed in qual misura influiscono su di essa trattamenti diversi.

La tecnica da noi adottata per queste ricerche è in breve la seguente.

Si prepara una soluzione saturata a caldo di bleu di metilene rettif. sec. Ehrlich (Grübler) in una soluzione all' 1 % di ossalato sodico.

Da 2 a 3 cmc. di questa soluzione vengono diluiti in 100 cmc. di una soluzione all'1 % dello stesso ossalato di sodio. Il liquido così allestito viene

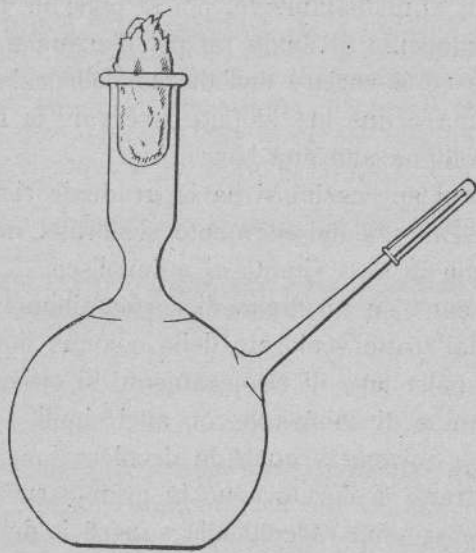


FIG. 1.

reso sterile alla stufa di Koch, entro la fialetta qui sopra raffigurata (fig. 1) e da noi fatta appositamente costruire. Insieme si preparano e si sterilizzano dei

tubetti di vetro come alla fig. 2, aventi una lunghezza totale di 10-12 cm. con un'estremità affilata ed una strozzatura in vicinanza dell'estremità opposta, la quale viene chiusa con ovatta. Questi tubicini hanno un lume di circa 2 mm.

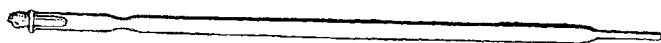


FIG. 2.

Volendo fare ricerche di confronto è uopo occupare un segmento di tubicino sempre della medesima altezza. Noi nelle nostre esperienze ne segniamo 5 cm. a cominciare dall'estremità inferiore, là ove cessa l'assottigliamento capillare ed il lume del tubo si fa costante.

Dei 5 cm. due occupiamo con la soluzione di ossalato sodico, colorata in bleu; 3 col sangue.

S'introduce dapprima il liquido che dal beccuccio della fialetta si fa scorrere direttamente nell'estremità affilata del tubicino, evitando così ogni pericolo d'inquinamento.

Il sangue si ottiene dal polpastrello di un dito, che previa accurata disinfezione si punge con un ago a lancetta. Il sangue, che deve fuoriuscire spontaneamente o solo dietro lievissima pressione, si raccoglie nel tubicino in cui penetra per capillarità e per gravità, quando si abbia l'avvertenza di tenerlo un po' inclinato in basso.

Si chiude da ultimo l'estremità affilata alla lampada o con ceralacca si centrifuga immediatamente, poi si pone in termostato, richiudendolo in un vaso contenente al fondo un po' d'acqua e ciò allo scopo d'impedire la vaporazione ed il variare dell'altezza della colonna liquida.

Dopo una o due ore si può osservare la riduzione di un certo tratto di questa colonna alla sua base.

Nei giorni successivi si ha la graduale ricolorazione dall'alto al basso, riducendosi l'altezza del segmento scolorato, man mano che i leucociti periscono o che la loro vitalità si affievolisce.

Se si segna su un foglio di carta millimetrata il massimo dell'altezza raggiunta dal tratto scolorato della colonna liquida, poi il successivo suo abbreviarsi nella fase di ricoloramento si ottiene un tracciato che può servire da termine di confronto con altri simili.

Il tempo durante il quale la decolorazione si effettua e l'altezza raggiunta dal tratto scolorato sono in gran parte in rapporto al numero dei leucociti che si sono raccolti alla superficie del segmento; quindi il tenerne conto non ci parve avesse in via generale molto interesse, certo non tanto quanto il considerare il tempo che la colonna liquida e il sedimento dei leucociti impiegano a ricolorarsi.

Questa ricolorazione da principio procede molto regolarmente ed in

modo graduale; ma prolungandosene la durata per più giorni, avviene che nel frattempo gli elementi cellulari bianchi e rossi già periti si dissolvono. Dagli eritrociti si diffonde l'emoglobina che tinge in rosso la parte più bassa della colonna liquida e man mano ascende fino ad incontrarsi con la tinta bleu discendente.

Ora, accade talora, quando l'emoglobina è molta, che il suo colore mascheri il color bleu.

Di più, sembra che con l'emoglobina si dissolvano anche delle sostanze albuminoidi, le quali, se abbondanti, impediscono che la ricolorazione proceda fino al sedimento. Infatti, immergendo in acqua bollente uno di questi tubicini, in cui è mancata la ricolorazione completa della colonna liquida in basso, vedremo formarsi là dove essa si è arrestata, un denso coagulo di albumina.

Questo inconveniente, del resto non costante, disturba nelle osservazioni la cui durata si estende per vari giorni; ma ove si tratti di sperimentare sostanze, o sottoporre il sangue a trattamenti che abbiano sulla massa dei leucociti un'azione pronta o a breve distanza, il descritto metodo macroscopico costituisce un mezzo d'indagine per quanto grossolano, altrettanto comodo e rapido.

Ove accada che alla ricolorazione già abbastanza avanzata subentri di un tratto una nuova decolorazione della colonna liquida è da pensare senza altro ad inquinamento con germi.

Il metodo su cui ci siamo testè intrattenuti trova applicazione anche in batteriologia e può servire alla investigazione della vitalità dei batteri.

Si fa di questi un'emulsione in cloruro di sodio od in qualsivoglia altro liquido, che non espliciti sulla sostanza colorante alcuna azione riducente; si aggiunge all'emulsione una quantità determinata di bleu di metilene e si introduce la miscela nel tubicino nel modo che si fa pel sangue; si centrifuga, si pone in termostato e si attende più o meno lunghi giorni (a seconda della specie del germe e delle condizioni in cui fu posto), che alla decolorazione della colonna liquida succeda la ricolorazione, la quale dovrebbe comprendere anche il sedimento.

Potrei, a dimostrazione del metodo, riportare qui esperienze e tracciati; ma questo ci allontanerebbe troppo dall'argomento che ora ci occupa.

*
**

Metodo microscopico. — Una più esatta investigazione sulla durata della vita dei vari elementi bianchi, contenuti in un sangue estratto dai vasi, e sulle condizioni che detta vitalità modificano, può eseguirsi con un secondo metodo che costituisce una reazione assai delicata e che per quanto a noi consta non fu ancora da altri sperimentato.

Esso consiste nel determinare la proporzionalità dei leucociti che all'esame microscopico eseguito in diversi periodi di tempo si rinvencono morti, di



fronte a quelli che ancora mantengono viventi nel sangue conservato fuori dell'organismo in condizioni propizie di vita.

Il metodo è basato sul fatto finora forse non ben considerato, che cioè i leucociti messi fuori della corrente sanguigna in riposo, conservano dopo morte la loro forma più a lungo che non nel circolo.

Sia per gli urti che subiscono nel torrente circolatorio, sia per l'esistenza di organi (milza, ecc.) a ciò deputati, sia per cause che finora ci sfuggono, i globuli bianchi dell'organismo si disfanno, a quanto sembra, subito dopo la loro morte. E se così non fosse, quale ingombro non deriverebbe dal riempimento dei vasi di elementi morti, data l'enorme cifra di leucociti e di emazie che di continuo periscono?

A quale ecatombe essi vadano incontro ne dà un'idea un calcolo del dottor Arneth (1), che in un importante lavoro recentemente venuto in luce, si è addentrato nello studio dell'evoluzione morfologica dei leucociti neutrofili desumendola dal grado di sviluppo del loro nucleo. Egli divide pertanto detti leucociti in cinque classi a seconda del numero dei nuclei o frazioni di nucleo che contengono (da una a cinque o più). Con numerosi conteggi ha poi determinato la percentualità delle varie classi di neutrofili che s'incontrano nel sangue normale ed ha composto così tabelle o schemi di 100 leucociti ciascuna, che riproducono il quadro ematologico dei neutrofili negli individui sani. Nei casi patologici, variando la percentualità delle diverse classi dei neutrofili, il quadro in discorso si scosta più o meno dalla norma e le alterazioni sono rese prontamente evidenti dal raffronto delle tabelle.

Ora, in un caso di polmonite cruposa, comparando il quadro ematologico normale dei leucociti neutrofili di un dato individuo allo stato sano con quello che lo stesso individuo, colpito da polmonite, presentava due giorni e mezzo prima del sopravvenire della crisi, si riscontra alterata la proporzione fra le varie classi dei neutrofili ed uno spostamento nel quadro ematologico, con una differenza del 41 %, la quale segna un aumento di elementi bianchi nelle classi più giovani, corrispondente a pari diminuzione di elementi nelle classi di cellule più mature. Ed essendosi computati col Thoma-Zeiss 12,500 leucociti in un mmc. la differenza relativa ascende a 5125.

Riferendo questa cifra a 10 litri di sangue, Arneth calcola la presenza di 51,250,000,000 nuovi esemplari di cellule nella massa totale del sangue in sostituzione di un egual numero di leucociti periti o altrimenti consumati. Inoltre, le rimanenti cellule in proporzione pel 59 %, se sono in ambo le tabelle equivalenti nella forma non sono però propriamente le stesse. E pertanto Arneth aggiunge: « Noi dobbiamo riflettere che questo processo (d' infezione pneumonica) è esteso per più giorni; che forse e verosimil-

(1) Priv. Doz. dott. I. ARNETH. *Die Neutrophilen Weissen Bluthkörperchen*. Jena, 1904.

mente, ad ogni momento, nel fiorire della malattia, vengono consumate ingenti masse di leucociti, e che il 59 % delle cellule per forma equivalenti, partecipano anch'esse, ed in grado forse maggiore, a sostituire il fabbisogno; il che solo parzialmente ci è dato dedurre dalla loro più particolare costituzione. Dobbiamo poi anche considerare che di sovente bastano sol poche ore a produrre queste potenti alterazioni, quantunque già di per sé il nostro corpo può gettare in circolo dal suo deposito quantità grandissime di leucociti neutrofili senza che il quadro ematologico ne venga notevolmente alterato (leucocitosi digestiva) ».

« Soltanto così noi acquistiamo una debole idea delle enormi dimensioni che assumono le alterazioni della massa dei leucociti in siffatte malattie infettive ».

Vero è che una parte di essi migra fuori dei vasi per portarsi nel luogo del bisogno ed ivi si accumulano; ma è da ritenere come indubitato (infezioni senza localizzazioni a focolaio) che un'altra parte non indifferente perisca nel torrente circolatorio.

Del resto, astraendo dai casi in cui l'organismo è colpito da processi infettivi, sta di fatto che esso è quotidianamente esposto ad offese che fanno risentire i loro effetti sul sangue e sui suoi elementi figurati; e già nel compimento delle funzioni fisiologiche (della nutrizione, del ricambio, ecc.) buone quantità di questi elementi bianchi vengono consumate.

Ora, nel sangue, appena estratto dai vasi, siamo ben lungi dal rinvenire quella proporzione di elementi morti che indicherebbero i dati sovraesposti. Essi dunque scompaiono improvvisamente dal torrente circolatorio senza lasciar traccia di sé; in una parola si disgregano prontamente.

Nakanishi avrebbe trovato che il sangue di un individuo sano contiene dal 3 al 5 % di leucociti morti. Pur non avendo istituito su vasta scala speciali ricerche a proposito, tuttavia in varie osservazioni fatte sul sangue di diversi individui sani e malati, gli elementi colorati da noi rinvenuti ci parvero inferiori alla cifra data dal Nakanishi.

Siamo per altro propensi a ritenere questi elementi, che nel sangue fresco appena estratto ci si presentano colorati, non già come preesistenti nel circolo allo stato di morte, ma aventi solo vitalità assai debole, che tosto si spegne nell'atto della loro fuoriuscita dai vasi, sia per influenze meccaniche, termiche, chimiche dei disinfettanti, ecc., o in seguito alle manipolazioni cui vengono assoggettati.

Che nell'atto della fuoriuscita dai vasi moltissimi leucociti vadano distrutti, fu sostenuto da Schmidt, Cohnheim, Lövit, ecc.; altri lo negano, e nei tempi più recenti sono andate sempre più modificandosi le opinioni al riguardo, nel senso di riconoscere ai globuli bianchi una maggiore resistenza.

Ora, pur non volendo contestare il fatto che alcuni di essi, forse quelli di più avanzata evoluzione, periscano o si disgreghino nell'atto o poco dopo la fuoriuscita dai vasi, è però da ritenere che i leucociti non siano quegli elementi così fragili e sensibili che al solo contatto con liquidi isotonici, come la soluzione fisiologica di cloruro di sodio o di altri sali subitamente si alterino e si dissolvano; e che ciò non avvenga lo provano, fra le altre, anche le nostre esperienze.

Noi vediamo conservarsi in vita, per vari giorni consecutivi, degli elementi morfologici del sangue diluito a metà con una soluzione all' 1 % di ossalato sodico; non solo, ma serbare una delle loro funzioni più caratteristiche, il potere fagocitario, ed inoltre — ciò che per il compito che ci siamo proposto massimamente importa — gli elementi che vengono a morte non si disgregano con la stessa rapidità che nel circolo; ma conservano ancora dopo morte per un tempo più o meno lungo la propria forma.

A conferma di quanto diciamo, va pure notato che, mentre normalmente nel sangue fresco, salvo forse casi di leucemia e cachessie gravi, non è dato rinvenire leucociti che presentino la cosiddetta degenerazione vacuolare — la quale è ritenuta come un indizio della loro morte — nel sangue conservato nell'accennato modo si veggono, trascorse alcune ore (24 o più), varii di tali leucociti offrire numerosi piccoli vacuoli.

Del resto, che i leucociti fuori del torrente sanguigno, in riposo, possano, benchè morti ed esposti all'azione continua di agenti nocivi, conservare nullameno per qualche tempo la loro forma, ce ne convince l'esame di qualsiasi non troppo inveterata raccolta di pus.

Ora, è precisamente la persistenza, più o meno a lungo, della forma del leucocito, dopo che ogni sua vitalità si è spenta e la sua ritardata disgregazione allorchè si trova fuori dei vasi in riposo, ciò che permette di valutare la proporzionalità dei leucociti morti in confronto di quelli ancora in vita.

Certo non può pretendersi trarre da esperienze in vitro criteri sulla vitalità assoluta, poichè non può esser messo in dubbio che il fatto stesso del trovarsi i leucociti fuori dell'ambiente naturale sia loro di danno, così come l'aggiunta di anticoagulanti, di sostanze coloranti, ecc. che alterano la concentrazione molecolare del siero ed esplicano anche un'azione venefica. Vero è che movendo da un altro punto di vista, quello cioè delle minori esigenze funzionali, cui i leucociti debbono sottostare fuori del circolo, si potrebbe invece pensare che, minore essendo in conformità del minor lavoro il loro consumo, la durata della vita ne avvanti.

Ma anche quando si tengano in conto soltanto i fattori nocivi, riflettendo che essi son sempre gli stessi ed eguali in tutte le prove, non può dubitarsi che da ricerche di confronto debbano scaturire conclusioni sicuramente attendibili.

V'ha forse alcuno che neghi fede ai risultati di un metodo invero assai diffuso e tenuto in grande onore, la conta dei globuli bianchi col Thoma-Zeiss? Eppure, quanti danni e ben maggiori non debbono ricevere i leucociti dall'aggiunta della soluzione acetica, e quanti non se ne distruggono con lo sbattimento indispensabile a rendere l'emulsione uniforme, e nel quale interviene anche l'azione di un corpo contundente, la pallottola di vetro?

D'altro canto non si può non ammettere che niun altro mezzo meglio dello studio del sangue in vitro permette di determinare in modo facile ed esatto l'azione che date sostanze esplicano sugli elementi bianchi. L'iniettare nel circolo le sostanze, di cui si vuol studiare l'azione sui leucociti e l'estrarre successivamente ed esaminare a diversi periodi di tempo una goccia di sangue non è un metodo che ben corrisponda allo scopo; inquantochè nell'organismo vivente l'azione della sostanza in esame non solo può essere modificata da altri elementi, ma viene in gran parte mascherata dal rapido disfacimento dei leucociti danneggiati e dalla pronta sostituzione e rigenerazione dei medesimi per opera degli organi ematopoietici; ciò che si evita con la prova in vitro.

Or dunque, al nostro intento è innanzi tutto e in ogni caso essenziale mantenere i leucociti fuori dell'organismo in condizioni le più propizie e durature di vita.

A queste condizioni, che sono molteplici, meno che mai risponde il preparato microscopico, anche se conservato in una camera umida; l'immediato contatto delle singole cellule con il porta ed il copri-oggetti, tra cui son distese in sottilissimo strato se non schiacciate, ed il difetto di O, ben presto fanno perire gli elementi figurati del sangue. Nè le condizioni richieste sono meglio realizzate dal porta-oggetti cavo, dove l'essiccamento e la coagulazione apportano danni non certo minori.

A nostra esperienza si adattano abbastanza bene alla conservazione di piccole quantità di sangue dei tubicini sottili di vetro, aventi un lume di 2-3 mm. in diametro e di cui l'estremità inferiore è chiusa a tenuta di liquido, l'altra semplicemente con ovatta, in guisa da non essere impedito l'accesso all'aria. La forma che noi sogliamo dare a questi tubicini è quella riprodotta nella fig. 2; il sangue vi si conserva mescolato ad un opportuno anticoagulante.

L'indice più adatto per svelare lo stato di vita o di morte della cellula, è certo quello sopradiscusso della colorazione del nucleo. Ma ad ottenerla troviamo conveniente di scostarci dai metodi dagli altri autori finora preferiti, quelli cioè di aggiungere al sangue il colore in sostanza. Essi mirano con ciò ad evitare che l'aggiunta di qualche liquido alteri di per sé gli elementi cellulari.

Ora, questo timore, come dicemmo, è esagerato; l'aggiunta di adatte soluzioni anticoagulanti tende piuttosto a conservare che non a distruggere i leucociti, i quali invece si disgregano in gran numero precisamente nell'atto della coagulazione.

Di più, il mezzo colorante in sostanza abbisogna di un qualche tempo per disciogliersi; a un dato momento la sua concentrazione sarà maggiore in un punto che in un altro del preparato, per modo che, mentre alcune cellule ne difettano e quindi benchè morte o presso a morire non possono colorarsi, altre risentono più intensamente dell'azione venefica, sia pur tenue, esercitata dalla sostanza colorante.

Gli è per ciò che noi preferiamo ricorrere ai mezzi coloranti allo stato disciolto, perchè così si distribuiscono in modo più rapido ed uniforme in tutte le parti del preparato e se un danno esplicano, esso sarà sempre lo stesso e sempre eguale per tutte le cellule, quindi anche nel danno sarà conservata la proporzionalità.

Anzi ci è parso che le soluzioni coloranti aventi una modica concentrazione si convengano meglio di quelle assai tenui, perchè le prime colorano subito anche i leucociti che hanno un debolissimo residuo di vita. Onde minore è l'inconveniente — durante il conteggio — di eventuali variazioni nella proporzionalità tra gli elementi colorati e gli scolari.

Ma veniamo alla tecnica. I liquidi e gli attrezzi occorrenti sono presso a poco gli stessi che abbiamo accennati nel dire del metodo macroscopico. Si tengano adunque pronti:

1°) una soluzione (ipertonica) di ossalato di sodio all'1 %;

2°) una soluzione di bleu di metilene rettificato (Ehrlich, Grüber) in ossalato di sodio all'1 %. Questa può prepararsi versando circa un grammo del bleu di metilene in 100 gr. di una soluzione all'1 % di ossalato di sodio quasi bollente; si lascia in riposo per 24 ore e più; poi si filtra; così la soluzione è pronta all'uso e si mantiene lungamente;

3°) tubetti sottili come alla fig. 2 e già sopra descritti.

Di più un ago a lancetta, una piccola ansa di filo sottilissimo di platino, ecc. Il tutto vuol essere sempre accuratamente sterilizzato.

Nei tubicini s'introduce una quantità determinata della soluzione semplice di ossalato e sempre uguale in modo, che poi la proporzione della mescolanza di questa col sangue sia in tutte le prove presso che costante, come di 2 a 3 ovvero di metà a metà.

Il sangue si ottiene dal polpastrello di un dito: dopo che questo si è nettato con acqua e sapone, alcool ed etere, si fa con l'ago a lancetta una puntura abbastanza profonda in guisa che il sangue fuoriesca in certa quantità, spontaneamente o solo mercè lievissima pressione.

Il sangue, seguendo l'istessa tecnica già descritta nel metodo macroscopico, si fa penetrare direttamente in quantità determinata nei singoli tubicini contenenti già la soluzione di ossalato. Si chiude l'estremità inferiore di questi con ceralacca, si centrifuga immediatamente, ma non troppo a lungo e si pone in termostato.

Volendo sperimentare l'azione che esplicano sui leucociti i vari batteri o sostanze diverse, si mescolano queste alla soluzione di ossalato, subito prima di raccogliere il sangue.

A dati intervalli di tempo si toglie dal termostato uno di questi tubicini; con una piccola lima si spezza pochi mm. al di sotto del sedimento dei globuli bianchi e si utilizza quel segmento del tubetto ove insieme alla colonna liquida son rimasti i primissimi strati del sedimento medesimo, che sono i più ricchi di leucociti. Questa parte del sedimento insieme ad un poco del liquido soprastante si fa cadere nella vaschetta di un porta-oggetti incavato.

Dopo avere disteso su un comune porta-oggetti ben deterso una piccola ansa della soluzione suindicata di bleu di metilene, vi si pongono 2-3 anse del liquido in cui son sospesi i leucociti; si fa che la soluzione colorante si mescoli intimamente ad esso. Vi si adagia sopra un copri-oggetti, poi si toglie l'eccesso del liquido, accostando cautamente ai margini del vetrino delle listerelle di carta bibula.

È ozioso avvertire che in tutte queste manipolazioni è richiesta la maggiore delicatezza e soprattutto bisogna evitare lo strisciamento tra i due vetri che racchiudono il preparato: il minor numero di leucociti e i frammenti di essi che s'incontrano nei preparati allestiti per l'osservazione a secco dimostrano a sufficienza che con lo strisciamento molti degli elementi bianchi vanno distrutti.

Fra l'allestimento del preparato e la sua messa a fuoco decorrono d'ordinario due o tre minuti, appunto quanto basta perchè i leucociti morti assumano il colore; quindi si può procedere senz'altro all'osservazione microscopica. Per questa è sufficiente un obiettivo a secco (n. 7 Leitz, con oculare n. 1 o n. 2, cui per facilitare la numerazione dei leucociti, è bene applicare un micrometro oculare quadrato), senza apparecchio di illuminazione Abbé; ma è indispensabile un tavolino traslatore.

Allorchè si incontrano ammassi di leucociti si ottiene a colpo d'occhio la proporzione d'insieme tra colorati e scolorati, ossia tra quelli che son morti e gli altri che ancora vivono; ma spesso le cellule sono saldate le une alle altre, i loro contorni non ben distinti, di guisa che gli ammassi, in genere non sono usufruibili pel conteggio; noi ci siamo sempre attenuti di preferenza ai leucociti che si incontrano isolati.

La numerazione va eseguita almeno su due diversi preparati perchè

eventuali eccessive sproporzioni giovano a renderci avvertiti che qualche inconveniente è avvenuto nello allestimento dei preparati medesimi; in ogni caso però, rimanendo costanti le condizioni di mescolanza tra sangue ed indice colorante, tempo d'osservazione, temperatura, ecc. saranno sempre più attendibili i dati del preparato in cui s'incontri il minor numero di cellule morte.

Si notano mano mano su una colonna i leucociti il cui nucleo si rinviene colorato e su di un'altra quelli che ci si presentano scolorati, da ultimo si calcola la proporzione. Il numero dei leucociti colorati sta alla somma dei leucociti contati, come X sta a 100.

I risultati saranno naturalmente tanto più esatti quanto maggiore è il numero delle cellule contate e sono da considerare poco attendibili quei conteggi che non comprendono almeno un numero di 100 a 150 cellule; meglio se si arriva a 200-300 o più.

La numerazione dev'essere espletata in un tempo possibilmente breve; a seconda della ricchezza del preparato in globuli bianchi e della pratica dell'osservatore, per 150-200 cellule d'ordinario non s'impiegano più di 15-20 minuti; nel qual tempo le variazioni che possono avvenire nella proporzione fra i colorati e gli scolorati sono trascurabili, purchè nell'approntare il preparato non si sien fatti subire insulti ai leucociti. Che le variazioni succedentisi nel corso di 30-40 minuti nei preparati allestiti con le debite cautele ed osservati a temperatura ambiente temperata siano minime, abbiamo potuto convincerci tornando a più riprese a contare i leucociti colorati e gli scolorati che s'incontrano in una stessa linea.

Il metodo è in vari sensi suscettibile di perfezionamenti.

Opportuno ad impedire lo schiacciamento del preparato tra i due vetri sarebbe l'impiego di speciali porta-oggetti costruiti a guisa di quello del Thoma-Zeiss, in cui tra esso ed il copri-oggetti intercede una distanza di $\frac{1}{10}$ di mm.; la camera però vorrebbe essere molto più vasta.

Allo scopo poi di rendere più comoda la raccolta del sangue e di semplificare vari dettagli della tecnica, ai tubicini semicapillari abbiamo ritenuto utile sostituire un piccolo apparecchio, che in pratica corrisponde egregiamente.

Una provetta, il cui *lume* misura circa 6-7 mm. in diametro, alla sua estremità superiore libera porta applicato a smeriglio od a mezzo di un anello di gomma o di un turacciolo, un tubo a due branche della foggia rappresentata dalla fig. 3. Entro la branca verticale di questo scorre un secondo tubetto semicapillare piegato a gomito, avente sufficiente lunghezza da giungere, occorrendo, fino al fondo della provetta. Il suo tratto superiore piegato orizzontalmente è graduato in divisioni indicanti ciascuna la capacità di $\frac{1}{100}$ centesimo di cmc. Anche la provetta è graduata alla base ed ogni segno corrisponde ad un contenuto di cmc. 0.25.

Le divisioni del capillare servono a misurare le soluzioni delle sostanze, di cui si vuol studiare l'azione sui leucociti; quelle della provetta servono a misurare l'anticoagulante ed il sangue.

Ed ecco come si procede:

Con un tubicino di gomma applicato al tubo *a*) dell'apparecchio, si aspira nel semicapillare *b*) la quantità voluta della sostanza da sperimen-

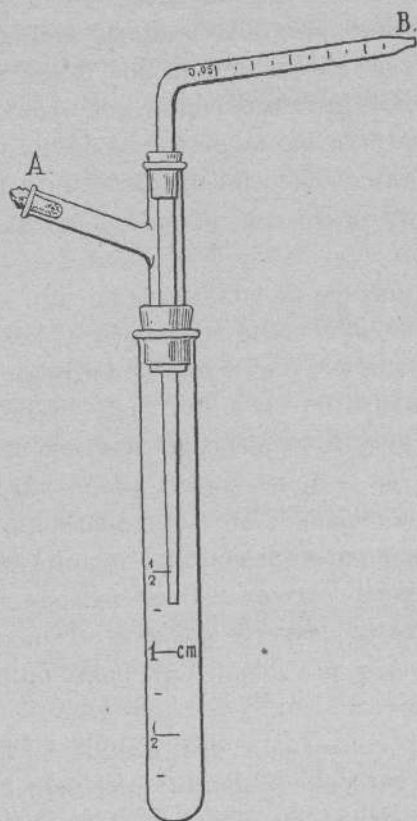


FIG. 3.

tare sui leucociti, e successivamente la soluzione sterilizzata di ossalato di sodio nella quantità che basta a raggiungere, p. es., $\frac{1}{2}$ cmc. Dopo ciò si aspira nella stessa maniera, ma lentamente e con garbo $\frac{1}{2}$ cmc. di sangue mano mano che esso fuoriesce dalla puntura. Da ultimo si toglie la parte superiore dell'apparecchio e la provetta, chiusa con un tappo di gomma sterilizzato, è posta, anche senza centrifugare, in termostato (1). Quivi gli

(1) Il piccolo apparecchio è assai comodo anche per eseguire la prova siero-agglutinante del Vidal nel tifo in rapporti quantitativi diversi fra siero ed emulsione bacillare. Da quanto sopra fu detto se ne comprende senz'altro il funzionamento.

elementi figurati del sangue non tardano a depositarsi spontaneamente, rimanendo i globuli bianchi a preferenza negli strati superiori.

A tempo voluto, con una pipetta ben sterilizzata, si toglie dalla provetta un po' di liquido con un poco della parte superiore del sedimento, così da avere una sospensione non troppo densa di cellule; questa si mescola alla soluzione colorante e si osserva nel modo sopradetto.

Nell'esperimentare l'azione di qualche sostanza sui globuli bianchi di un dato sangue, dovrebbesi sempre istituire una prova di controllo con quello stesso sangue, senz'altra aggiunta che il solo liquido anticoagulante.

Si trarranno dal metodo risultati tanto più attendibili quanto minore è l'intervallo delle ore decorse tra la presa del sangue e l'osservazione microscopica di esso: allora i leucociti si presentano meglio conservati e più netta è la distinzione tra quelli che mostrano un nucleo colorato e quelli totalmente scolorati.

Con l'invecchiare, mentre la vitalità degli uni si spegne, quella dei rimanenti sempre più si affievolisce; ed allora danni anche minimi bastano a farla cessare, sicchè già nel corso stesso dell'osservazione microscopica, le cellule vanno colorandosi.

Allora più spesso si offrono all'occhio leucociti che, pur non lasciando ben distinguere un nucleo il quale spicchi pel suo colorito bleu scuro, mostrano tutto il loro protoplasma d'un colore bleu diffuso abbastanza intenso, e si resta incerti da qual parte classificarli. A tutta prima noi avevamo di tali leucociti costituito una classe distinta (classe degli incerti); ma più tardi, rendendoci sempre più esperti, abbiamo saputo assegnar loro il dovuto posto tra le due classi precedenti ed abbiám fatto così cadere la classe degli incerti.

Nel sangue a lungo conservato, disgregandosi i leucociti, si forma del detrito che è facile scorgere nei preparati microscopici.

Ma formazione di detrito può aversi pure nel sangue relativamente fresco, quando si siano messi i leucociti a contatto di sostanze che molto li danneggino. In tal caso conviene tener conto della sua presenza, che sta ad indicare un danno maggiore di quello che non risulti a tutta prima dalla semplice proporzione tra cellule colorate e scolorate.

Esercitano forte azione disgregante sui leucociti soprattutto i batteri di esaltata virulenza e le alte temperature.

Al contrario, a temperature relativamente basse poco al disotto dei 37° C, i globuli bianchi si conservano meglio, anzi durante la stagione fredda si mostrano in genere dotati di maggior resistenza che non nell'estate, ciò che ne rende in quell'epoca più facile lo studio e più attendibili i risultati.

Abbiamo creduto indispensabile intrattenerci un po' a lungo sui particolari tecnici inquantochè, avendosi a che fare con elementi di così fragile

esistenza, l'esattezza dei risultati è in stretta relazione alla correttezza usata nella tecnica.

E se le nostre prime ricerche possono in qualche parte lasciare a desiderare, va tenuto presente che la strada da noi battuta era finora affatto buia e che nell'iniziare il nostro lavoro molte particolarità ci erano ignote, che più tardi ci furono apprese man mano dall'esperienza.

Ci siamo poi trovati dinanzi anche non lievi difficoltà materiali, come quella del cattivo funzionamento dei termostati, causa la bassissima pressione del gas, incidente da noi molto deplorato, al quale mal ripara l'espediente, cui si è ricorso, di notare cioè nelle tabelle le oscillazioni della temperatura.

II.

Venendo a dire in particolare delle ricerche da noi finora eseguite, esponiamo anzitutto i risultati delle conte proporzionali fra leucociti morti e viventi che si rinvennero, a diversi periodi di conservazione, nel sangue di individui sani mescolato alla sola soluzione anticoagulante di ossalato di sodio.

Le lettere *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, che contrassegnano le tabelle, stanno ad indicare le persone da cui il sangue fu tratto.

A è un individuo di 57 anni, colpito circa un paio d'anni or sono, da trauma alla spina, e di cui ora restano gli esiti; egli è un contadino robusto con sanguificazione normale.

B è un bambino ben nutrito, dell'età di sei anni, guarito già da vari giorni da disturbi gastro-enterici acuti.

Le lettere *C* e *D* si riferiscono ad individui sani, dell'età fra i 35 ed i 40 anni; *E* ad un isterico della stessa età.

In ogni tabella sono scritte le date in cui la ricerca fu eseguita, nonché le ore in cui il sangue venne messo in termostato.

La numerazione dei leucociti veniva praticata quasi sempre nel pomeriggio fra le 3 e le 6.

In ciascuna tabella si trovano infine trascritte le temperature segnate dal termostato dalle 9 del mattino alle 6 circa di sera; disgraziatamente non fu possibile controllare le temperature della notte, quelle più soggette a sbalzi. In genere però si aveva nelle prime ore un innalzamento di uno o più gradi sulle temperature serali, cui succedeva al mattino un notevole abbassamento.

E veniamo all'analisi delle tabelle:

TABELLA N. 1. — (A).

	4 gennaio ore 5 p.	5 gennaio ore 9½ a.	6 gennaio ..	7 gennaio ..	8 gennaio ..	9 gennaio ..	10 gennaio ..	11 gennaio ..
Temperatura del termostato								
	37	36, 35, 37	35.6, 37	35.6, 36.7	37.5, 36.5	36.3, 37	36.1	..
		Dopo 16 ore 						
NB. — La colonna nera rappresenta il tratto scolorato del tubetto chiuso superiormente con olio di vaselina. — La colonna a linee riproduce il tratto scolorato del tubetto aperto a libero contatto dell'aria.								
		Dopo 24 ore		Dopo 72 ore	Dopo 96 ore	Dopo 120 ore		
Scolorati . . .	..	217	..	98	46	27	..	Nessun scolorato, molti colorati e discretamente conservati; destritto.
Incerti . . .	..	5	..	56	40	125	..	
Colorati . . .	..	28	..	120	123	121	..	
	..	13 %	..	64 %	78 %	90 %	..	

TABELLA N. 2. — (A).

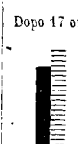
	12 gennaio ore 4½ p.	13 gennaio ore 9½ a.	14 gennaio ..	15 gennaio ..	16 gennaio ..	17 gennaio ..	18 gennaio ..	19 gennaio ..
Temperatura del termostato								
	37	35, 36.5	37	39	36.5	35.2	35.5	..
		Dopo 17 ore 						
NB. — La colonna nera rappresenta il tratto scolorato del tubetto chiuso superiormente con olio di vaselina. — La colonna a linee riproduce il tratto scolorato del tubetto aperto a libero contatto dell'aria.								
		Dopo 24 ore	Dopo 48 ore	Dopo 96 ore				
Scolorati . . .	..	213	162	60	..	..	..	..
Incerti . . .	..	10	36	30	..	..	..	..
Colorati . . .	..	42	93	127	..	..	..	..
	..	19 %	44 %	72 %	..	..	..	..

TABELLA N. 3. — (A).

	12 marzo ore 5 p.	13 marzo ..
	Temperatura del termostato	
	32	33, 35
		Dopo 24 ore
Scolorati	..	127
Colorati.	..	19
	..	13 %

TABELLA N. 4. — (A).

	14 aprile ore 3½ p.	15 aprile ..
	Temperatura del termostato	
	32,5	32, 32,5
		Dopo 24 ore
Scolorati	..	108
Colorati.	..	12
	..	10 %

TABELLA N. 5. — (B).

	30 marzo ore 10½ a.	31 marzo ore 5 p.
	Temperatura del termostato	
	33, 31	32,5
		Dopo 30 ore
Scolorati	..	196
Incerti	..	2
Colorati.	..	35
	..	15 %

TABELLA N. 6. — (C).

	9 maggio ore 5 p.	10 maggio ..	11 maggio ..
	Temperatura del termostato		
	36	35, 36	36
		Dopo 24 ore	Dopo 48 ore
Scolorati	..	129	92
Incerti	..	..	5
Colorati	..	31	50
	..	19 %	37 %

TABELLA N. 7. — (D).

	16 maggio ore 5 p.	17 maggio ..
	Temperatura del termostato	
	36	36, 37
		Dopo 24 ore
Scolorati	..	92
Colorati.	..	22
	..	19 %

TABELLA N. 8. — (D).

	31 maggio ore 11 a. o 5½ p. Temperatura del termostato 36,5, 37
	Dopo ore 6½
Scolorati	119
Colorati	18
	13 %

TABELLA N. 9. — (D).

	3 giugno ore 10 a. e 5 p. Temperatura del termostato 37, 35.6
	Dopo 7 ore
Scolorati	140
Colorati	11
	7 %

TABELLA N. 10. — (D).

	5 giugno ore 11 ½ a. e 6 p. Temperatura del termostato 37.8, 38.5
	Dopo ore 6 ½
Scolorati	95
Colorati	8
	8 %

TABELLA N. 11. — (E).

	9 giugno ore 11 a.	10 giugno ..
	Temperatura del termostato	
	37, 37.2	37
		Dopo 30 ore
Scolorati	..	118
Colorati	..	64
	..	35 %

TABELLA N. 12. — (E).

	11 giugno ore 11 ¼ a. Temperatura del termostato 36
	Dopo 6 ore
Scolorati	190
Colorati	10
	5 %

TABELLA N. 13. — (D).

	15 giugno ore 11 ¼ a. e 5 ¾ p. Temperatura del termostato 35, 35.5
	Dopo 7 ore
Scolorati	89
Colorati	11
	11 %

TABELLA N. 14. — (D).

	16 giugno ore 11 ½ a. e 5 p.	17 giugno ..
	Temperatura del termostato	
	36.5, 37.5	36.2
	Dopo 7 ore	
Scolorati	95	..
Colorati	6	..
	6 %	.

TABELLA N. 15. — (D).

	28 novembre ore 11 ½ a.	29 novembre ore 10 ½ a.
Temperatura del termostato		
	36,5	34,5
		Dopo 23 ore
Scolorati	..	158
Colorati	..	33
	..	17 %

TABELLA N. 16. — (D).

	20 novembre ore 10 a. e 3 ½ p. Temperatura del termostato 36
	Dopo ore 5 ½
Scolorati	96
Colorati	11
	10 %

TABELLA N. 17. — (D).

	30 novembre ore 11 ½ a. e 3 p.	1 dicembre		2 dicembre
		ore 11 a.	ore 3 p.	
Temperatura del termostato				
	35, 34,5	33	34, 35	34
		Dopo 24 ore	Dopo 28 ore	Dopo 47 ore
Scolorati	..	202	121	20
Colorati	..	53	39	14
	..	20 %	24 %	40 %

TABELLA N. 18. — (D).

	3 dicembre ore 10 ½ a. e 3 ¼ p. Temperatura del termostato 31, 34,5
	Dopo 6 ore
Scolorati	128
Colorati	10
	7 %

TABELLA N. 19. — (D).

	26 dicembre ore 4 p.	27 dicembre
Temperatura del termostato		
	34	32,5, 33
		Dopo 24 ore
Scolorati	..	120
Colorati	..	18
	..	13 %

Quadro riassuntivo delle precedenti tabelle.

TABELLE		Individuo che fornì il sangue	Ore d'intervallo	Temperatura di conservazione	Percentuale dei leucociti morti	OSSERVAZIONI
N.	Data					
8	31 maggio 1904 . . .	D	6 $\frac{1}{2}$	36.5-37	13	Dal 5 al 13 %.
9	3 giugno	D	7	37 -35.6	7	
10	5 giugno	D	6 $\frac{1}{2}$	37.8-38.5	8	
12	11 giugno	E	6	36	5	
13	15 giugno	D	7	35 -35.5	11	
14	16 giugno	D	7	36.5-37.5	6	
16	29 novembre	D	5 $\frac{1}{2}$	36	10	
18	3 dicembre	D	6	34 -34.5	7	Dal 10 al 20 %.
1	5 gennaio 1904 . . .	A	24 circa	37 -35	13	
2	13 gennaio	A	»	37 -35	19	
3	13 marzo	A	»	32 -35	13	
4	15 aprile	A	»	32.5-32	10	
6	10 maggio	C	»	36 .35	19	
7	17 maggio	D	»	36	19	
15	29 novembre	D	»	36.5-34.5	17	
17	1 dicembre	D	»	35 -33	20	
19	27 dicembre	D	»	34 -32.5	13	Dal 15 al 35 %.
5	31 marzo 1904. . . .	B	30 circa	33 -31	15	
11	10 giugno	D	»	37.2-37	35	
17	1 dicembre	D	»	35 -33	24	Dal 37 al 44 %.
2	14 gennaio 1904. . .	A	48 circa	37 -35 -37	44	
6	11 maggio	C	»	36 -35 -36	37	
17	2 dicembre	D	»	35 -33 -35	40	Dal 64 al 72 %.
1	7 gennaio 1904. . .	A	72 circa	37 -35 -37	64	
2	15 gennaio	A	»	37 -35 -39	72	78 %.
1	8 gennaio 1904 . . .	A	96 circa	37 -35 -37.5	78	
1	9 gennaio 1904 . . .	A	120 circa	37 -35 -37.5	90	90 %.

Valutiamo anzitutto i risultati ottenuti entro le prime 24 ore dall'estrazione del sangue, come i più attendibili e praticamente più importanti, indi quelli ottenuti nei giorni susseguenti fino alla morte di tutti gli elementi figurati.

In quel primo periodo constatiamo dopo circa 6-7 ore una mortalità che va dal 5 al 13 %, poi, decorse 24 ore, un numero di leucociti morti che oscilla dal 10 al 20 %.

Queste oscillazioni, discretamente ampie, ma non eccessive, sono da ascrivere principalmente a difetti di tecnica, di cui i più agiscono aumentando i valori della mortalità; ma ve ne han pure di quelli che favoriscono la conservazione dei leucociti.

Aumentano la mortalità di questi elementi errori, spesso inavvertiti, in cui si può cadere già al momento della raccolta del sangue, sia che esso venga a contatto dei disinfettanti, sia che fuoriesca a stento dietro troppo forte compressione della parte punta — perchè allora si mescola al sangue anche il succo dei tessuti ed è più facile la formazione di coaguli — sia infine per difetto di nettezza dei tubi di vetro o dei recipienti, o per inquinamento con germi.

Durante la conservazione del sangue in termostato sono le alte temperature, come vedremo ancor meglio in appresso, quelle che menano a più rapida morte i leucociti e ne facilitano la disgregazione.

Nell'allestimento del preparato e da ultimo durante l'osservazione microscopica sono cause di danno ed affrettano visibilmente la morte dei globuli bianchi, lo schiacciamento fra i due vetri, l'evaporazione, le temperature eccessive, soprattutto rigide, dell'ambiente.

Pertanto nel sangue esaminato 6-7 ore dopo la sua estrazione, la più elevata cifra di morti del 13 % è da riferire a fattori artificiali che una più accurata tecnica può ben evitare.

È inoltre da tener presente che il breve intervallo qui interceduto fra la presa del sangue e l'esame di esso, nonché le condizioni propizie di sua conservazione escludono che nel frattempo abbia potuto aver luogo una disgregazione di globuli bianchi così notevole da indurre alterazioni nei rapporti fra i leucociti che si rinvenivano colorati e quelli scolorati. Ciò del resto è confermato dal fatto che nei preparati a fresco manca un numero apprezzabile di leucociti in via di disfacimento e vi ha quasi totale assenza di nuclei isolati e di detrito. Rimanendo quindi escluso che i leucociti, nel perire, si sieno subito disgregati, sono indubbiamente da ritenere più conformi al vero quelle proporzioni della mortalità che risultano più basse e che infatti nella nostra tabella sono in grande prevalenza.

Certo è dunque che negli esperimenti ben condotti il numero dei leucociti morti dopo 6-7 ore di conservazione del sangue in termostato, non supera la cifra del 5-8 %.

Dopo 24 ore, in cui vediamo la mortalità oscillare dal 10 al 20 %, la cifra del 10 % rappresenta una percentuale insolitamente bassa; in parte la si deve forse ad una tecnica più felicemente riuscita; ma più devono avervi contribuito circostanze favorevoli alla conservazione dei leucociti e cioè le temperature relativamente basse del termostato.

Si è quindi indotti a valutare nel sangue conservato a 37° C. intorno al 15 e non oltre il 20 %, la somma dei leucociti morti dopo 24 ore.

Facendo un preparato a secco del sangue conservato si rinvencono già sin da questo momento alcuni leucociti il cui protoplasma presenta numerosi piccoli vacuoli, cioè segni evidenti della cosiddetta degenerazione vacuolare; altri lasciano scorgere nel loro interno dei cristalli inglobati di ossalato, e se il sangue è rimasto eventualmente inquinato, si rinvencono anche dei microrganismi.

Decorse 24 ore, raramente prima, cominciano ad apparire nei preparati, per divenire poi a mano a mano più numerosi, dei leucociti con colorazione incerta, ossia leucociti imperfettamente o diffusamente colorati in bleu, in cui il nucleo non solo non spicca pel suo colorito più intenso, ma non è neppure nettamente distinguibile. Onde nasce imbarazzo nell'apprezzarli. Di essi alcuni sono verosimilmente da ascrivere a leucociti degenerati che male assumono il colore; altri forse a leucociti di debole vitalità e quindi con potere riducente assai affievolito. Comunque, nella determinazione della percentuale noi credemmo opportuno, come più rispondente al vero, sommare gl'incerti ai colorati.

Ma col crescere dell'intervallo tra la presa del sangue ed il suo esame la valutazione della percentualità fra leucociti morti e viventi si rende sempre meno esatta oltrechè per le sorgenti d'errore già considerate, anche per un altro ordine di cause, che vanno esplicandosi con progressiva intensità. Esse consistono nel disgregamento — che a grado a grado va effettuandosi — dei leucociti precedentemente morti e nella affievolita vitalità di quelli che ancora rimangono in vita; cosicchè assai lievi influenze meccaniche, termiche, ecc., bastano a farla cessare.

I dati che precedono e le tabelle ci offrono tutti gli elementi per uno esame minuto delle cifre ottenute dai leucociti conservati oltre le 24 ore; ma nel timore di stancare ce ne dispensiamo, limitandoci soltanto a riassumere i risultati:

Dopo 30 ore si hanno valori del 15-24-35 %, ossia una mortalità che oscilla intorno ad una media di 25;

Decorse 48 ore si ottennero le cifre di 37-40-44 %, adunque il 40 % di leucociti morti;

Dopo 3 giorni le tabelle n. 21-1-2, danno le proporzioni di 57-64-72

(quest'ultimo dopo un balzo del termostato a 39); la percentuale media può quindi stabilirsi, senza andar lungi dal vero, nella cifra del 60 %;

Al 4° giorno si è riscontrato il 78 % di leucociti morti;

Dopo il 5° giorno il 90 %.

Nei giorni susseguenti i leucociti, perfettamente scolorati, tendono a scomparire; i colorati vanno mostrando continui segni di disfacimento, finchè da ultimo si dissolvono in detrito.

I traccati macroscopici che riportiamo nelle nostre tabelle sono in perfetta armonia con i risultati delle conte al microscopio.

Nelle condizioni di conservazione da noi adottate, la durata della vita dei più resistenti dei globuli bianchi è, come risulta da varie prove, di circa 6-8 giorni.

Nakanishi, come fu riferito, avrebbe rinvenuto nel sangue defibrinato, molti leucociti scolorati e con movimenti ameboidi dopo dieci giorni, e negli essudati sterilmente provocati sugli animali, anche dopo quattro settimane.

In un sangue raccolto in un tubetto con ogni cautela antisettica, defibrinato e conservato (senz'aggiunta di alcun liquido o sostanza) a temperatura ambiente intorno a 20 C o poco più, noi potemmo osservare soltanto fino al decimo giorno, appena qualche raro leucocito scolorato e punto mobile.

Le divergenze nei risultati, si giustificano in parte sapendo che non si può parlare in modo assoluto della vita dei leucociti fuori dei vasi senza tenere esatto conto della temperatura di conservazione.

Nel sangue subito estratto dai vasi resta per noi dubbio, come già discutemmo, che esistano realmente leucociti morti ancor integri nella loro forma.

Volendo pertanto tracciare una scala della percentuale dei leucociti che vanno gradatamente perdendo la loro vitalità nel sangue conservato, fuori dell'organismo, in tubicini di vetro, a temperatura intorno alla fisiologica, essa risulterebbe costituita approssimativamente delle cifre seguenti:

Sangue appena estratto	0 %	Dopo ore 48	40 %
Dopo ore 6-7	5-8 %	Id. 72	60 %
Id. 24	15-20 %	Id. 96	75 %
Id. 30	25 %	Id. 120	90 %

La mortalità dunque comporterebbe la cifra approssimativa — ulteriori e più estese esperienze potranno fornirci valori più precisi — di non oltre 20 leucociti ogni 24 ore.

Del resto la determinazione esatta degli ultimi gradi della scala; oltre all'essere, per le suesposte ragioni, difficile, non ha molta importanza pratica. Per lo studio delle modificazioni che i leucociti subiscono nella loro

vitalità, a contatto di svariati agenti o sottoposti a trattamenti diversi, basta, è anzi preferibile, perchè offre maggiori garanzie di esattezza, attenersi al confronto soltanto delle cifre che si ottengono nelle prime ore o nel primo giorno.

A base della tracciata scala stanno osservazioni eseguite per la maggior parte nella stagione fredda o temperata.

Nella stagione calda ed afosa la mortalità dei leucociti sale più rapidamente nel sangue estratto dai vasi, e se errori di tecnica non ci hanno tratto in inganno, avrebbe sorpassato in alcune esperienze anche il 40% nelle 24 ore.

Il dott. Arneth nel citato lavoro, comparso quando già le nostre ricerche erano da tempo avviate, deduce, come dicemmo, lo stato di evoluzione dei leucociti neutrofili dal numero dei nuclei o frazioni di nucleo che contengono.

Parrebbe pertanto che la morte dei leucociti neutrofili, analogamente a quanto accade in circolo, dovesse anche in vitro succedersi, a cominciare dalle classi più adulte per discendere alle più giovani, in ordine appunto al grado di evoluzione dall'Arneth stabilito. Ma se dobbiamo esprimere l'impressione raccolta dall'insieme delle nostre esperienze, non risulterebbe che i leucociti fuori dei vasi periscano precisamente nell'ordine suddetto.

L'argomento attende la sua soluzione da ricerche dirette e minute, le quali meneranno altresì a distinguere se le diverse specie di leucociti hanno funzioni speciali, e se le varie sostanze portate a loro contatto agiscono elettrivamente sugli uni o sugli altri.

Nelle pagine che precedono si è indagato quanta parte abbiano gli errori di tecnica nelle oscillazioni dei risultati; ma indipendentemente dalla tecnica portano con tutta probabilità a qualche differenza nei risultati anche altri fattori. Sebbene non ancora sperimentalmente noto, pure è da credere che nel sangue dei vari individui od anche di uno stesso, esistano in momenti diversi condizioni ora più ora meno propizie alla vita dei suoi elementi figurati; a cagion d'esempio la maggiore o minore alcalinità del mezzo in cui son sospesi, lo stato di digiuno o di digestione, quello di riposo o di fatica, l'età, il sesso, le diatesi, gli intossicamenti ecc.

Il rilevare in tutti questi casi le eventuali differenze spetta a studi ulteriori.

Temperatura. — Ci accadde già ripetute volte di accennare che i leucociti, fuori dell'organismo, si mostrano molto sensibili alle temperature. Essi in genere al di sopra dei 37 C resistono meno che non a temperature più basse. Tuttavia temperature molto basse affievoliscono il potere riducente dei globuli bianchi e lo dimostrano le esperienze che seguono:

Dei tubetti di sangue, preparati per la reazione macroscopica nel modo

indicato nella parte generale e con aggiunta di uno strato di olio di vaselina per escludere il contatto dell'aria, vengon posti in termostato a 37. Dopo un'ora si ha già una riduzione ben manifesta nel segmento della colonna liquida più prossimo al sedimento dei leucociti.

Altri tubetti dello stesso sangue, egualmente preparati e tenuti in ghiaccio, non presentano riduzione apprezzabile. Dopo sedici ore, la colonna liquida di questi ultimi, alla base e pel tratto di mezzo cmc. presenta una riduzione molto tenue, perchè, se può notarsi un colorito bleu, meno intenso che nel segmento superiore, si è però ancora ben lungi da una decolorazione completa.

Trasferiti in questo momento i tubicini in termostato a 37, ed osservati dopo poco più di due ore, si trova la colonna liquida alla base perfettamente decolorata ed il tratto scolorato raggiunge la medesima altezza che si è avuta nei tubicini di controllo, tenuti sin dal primo momento a 37.

Adunque alla temperatura di 0° il potere riducente dei globuli bianchi era quasi totalmente paralizzato, non però distrutto, nonostante la loro permanenza di sedici ore a detta temperatura; poichè, riportati i leucociti in termostato a 37, questo potere si è reso manifesto quasi nella sua piena intensità. Dopo 30 ore di conservazione in ghiaccio, il potere riducente, come apparve da una 2ª prova, non si ravvivò più al termostato.

Ma i dati forniti dal primo esperimento, mostrando che i leucociti sono in grado di resistere ottimamente e per più ore alla temperatura di 0°, contraddicono i risultati, cui pervenne Maurel (1) nello studiare la vitalità dei leucociti in base ai loro movimenti ameboidi. Questi a 14° C. cesserebbero definitivamente per non più ristabilirsi col risalire della temperatura, onde Maurel ne conchiude che a temperatura di 14° C. i leucociti dell'uomo muoiono.

L'errore è conseguenza dell'imperfezione del metodo. Va però notato che nei preparati microscopici, trovandosi i leucociti isolati e disposti in sottil strato fra due vetri, — quando pure non restino schiacciati, — risentono più sfavorevolmente dell'azione delle basse temperature, cosicchè anche col metodo da noi seguito, quando la temperatura ambiente è eccessivamente bassa essi periscono in gran numero, colorandosi già nel corso di pochi minuti.

Per sperimentare l'azione delle temperature elevate fu messo un tubetto, preparato come i precedenti e con la colonna liquida a libero contatto dell'O atmosferico, in termostato a 35°, e dopo cinque ore, quando già si era ottenuta la riduzione di un bel tratto della colonna liquida, il tubicino fu passato in un altro termostato alla temperatura di 46,5. Dopo un'ora e mezzo di permanenza a questa temperatura si vedeva il tratto scolorato

(1) E. MAUREL. *Recherches expérimentales sur les leucocytes*. Doin-Paris, 1890.

già evidentemente accorciato. Lasciando in stufa tra 46,5 e 47 per tutta la notte, al mattino seguente, e cioè dopo 15 ore, si osservava ricolorazione quasi completa del tratto ridotto, ed inoltre una nube intensa di emoglobina, sollevatasi dal sedimento, svelava che anche le sottostanti emazie si erano in gran parte dissolte.

A noi qui non interessa tracciare i limiti esatti di temperatura oltre i quali la vita dei leucociti diviene impossibile; ma ci piace mostrare ancora con un esperimento la grande sensibilità dei leucociti alle temperature alte.

TABELLA N. 20. — *Termostato ad alte temperature (esperienza parallela al N. 1). (A).*

	4 gennaio ore 3 p.	5 gennaio ore 9 ½ a.	6 gennaio ..	7 - gennaio ..	8 gennaio ..	9 gennaio ..	10 gennaio ..
Temperatura del termostato							
	40	38.5, 40 e 39	39.8, 41 e 39.1	38, 37.3 e 40	38.8, 38.5 e 40	..	..
		Dopo 24 ore	Dopo 48 ore	Dopo 72 ore			
Scolorati. . . .	..	155	60	22	Non più scolorati; i colorati discretamente ben conservati; detrito	..	Scarsi leucociti colorati in disfacimento; moltissimo detrito.
Incerti	..	26	27	65		..	
Colorati	..	84	118	129		..	
	..	41 %	70 %	90 %			

La tabella qui riportata fa vedere ad evidenza che temperature oscillanti intorno ai 40 C raddoppiano la proporzione della mortalità quotidiana nei leucociti conservati fuori dei vasi.

Questi risultati valgono a mettere in luce, o meglio a fornire un indice della grande distruzione di leucociti che deve avvenire nell'organismo per effetto degli elevamenti febbrili di temperatura.

Stati patologici. — Sul comportamento che fuori dei vasi ha la vitalità dei leucociti del sangue di persone malate non abbiamo finora eseguito che assai limitate ricerche, fra cui notevole un caso di anemia aplastica che verrà ampiamente illustrato dal prof. Zeri, nel cui reparto il paziente era ricoverato.

Trattavasi di un individuo (facchino) dell'età di 46 anni preso, senza alcuna causa constatabile, da grave anemia, con notevole e progressiva

diminuzione delle emazie, che dalla cifra di 1,423,000 al 23 novembre, erano discese nel successivo gennaio al disotto di 500,000 per mm.³ — Avevasi poichilocitosi, micro e macrocitemia, degenerazione policromatofila, nonchè assenza assoluta e costante di forme rigenerative nucleate. I globuli bianchi in ripetute conte risultarono in numero di 3000 a 4000 per mm.³ (in luogo di 6000, che è la cifra media allo stato normale); la proporzione tra i polinucleati neutrofili e mononucleati era di 1: 1 anzichè di 3: 1.

All'autopsia il midollo osseo non mostrava alcun accenno a reazione linfoide nelle diafisi, non solo; ma si rinvenne midollo grasso (e più giallo che nelle diafisi) nelle epifisi e nelle ossa piatte (ov'era di colorito arancione).

Ora la prova della vitalità dei globuli bianchi di un tal malato, eseguita il 23 gennaio, dà le cifre riportate nel seguente quadro:

TABELLA N. 21. — *Caso di anemia aplastica.*

	23 gennaio ore 5 p.	24 gennaio ..	25 gennaio ..	26 gennaio ..	27 gennaio ..	28 gennaio ..	29 gennaio ..	30 gennaio ..	31 gennaio ..	1 febbraio ..	2 febbraio ..
Temperatura del termostato											
	35	34, 37, 3	33, 35, 5	34, 35 e 34	34, 33 e 34, 5	37, 2 e 36, 5	36, 2 e 35	35, 5	36, 8	35, 5	40 e 37
Scolorati . . .	Nel preparato di sangue fresco appena estratto si rinviene sol qualche raro leucocita colorato, in egual proporzione che nel sano.	Dopo 24 ore 167	Dopo 48 ore 128	Dopo 72 ore 102	Dopo 96 ore 52	..	Dopo 144 ore 11	Scorrendo molti campi del preparato si scorge ancora qualche rarissimo scolorato; d'altrio.	..	..	Pochi leucociti discretamente conservati; i più in disfacimento; d'altrio.
Incerti . . .		10	6	11	13	..	31		..	..	
Colorati . . .		39	81	125	107	..	144		..	..	
		22 %	40 %	57 %	69 %	.	94 %		..	..	

Dalla tabella dunque risulterebbe un comportamento analogo a quello del sangue normale, anzi parrebbe che la durata della vitalità sia maggiore che nella norma. Ma fa d'uopo osservare al riguardo che le temperature di conservazione del sangue furono di qualche grado più basse della fisiologica e quindi più favorevoli — come sappiamo — ad una più lunga durata della vita dei leucociti. Comunque, non sembra correre gran differenza fra il comportamento di questi e quello dei leucociti contenuti in un sangue normale.

Questo risultato non è senza interesse dal punto di vista del quesito della origine delle cellule neutrofile.

Si ritiene che officina di queste cellule polinucleari neutrofile sia il midollo osseo, ed alcuni negherebbero che possa formarsi all'infuori di esso, mentre altri sostengono la loro formazione anche dal sistema linfatico.

Noi incliniamo a vedere nel caso presente un contributo in favore di quest'ultima dottrina, solo dobbiamo deplorare che l'esame anatomico, pur eseguito diligentemente su varie ossa, non siasi esteso, come sarebbe stato desiderabile, a tutte indistintamente le ossa del corpo. Tuttavia, attenendosi ai fatti osservati, si constata che il midollo osseo, anzichè reagire allo stato anemico in modo normale con formazione di tessuto linfoide, offriva qui, financo nelle epifisi, i caratteri del midollo grasso. Ed infatti si era mostrato in vita totalmente incapace alla rigenerazione del sangue, del che danno ampia prova le profonde alterazioni offerte dalle emazie — di cui è ormai stabilita negli adulti l'origine esclusiva dal solo midollo — e l'assenza di forme giovani nucleate di globuli rossi.

Nel riferito caso adunque i globuli rossi normali diminuivano gradatamente senza essere sostituiti appunto per difetto di funzionalità del midollo, che, incapace a rigenerare le emazie, è da ritenere lo fosse anche a produrre cellule bianche. Se nondimeno i neutrofili, qui esistenti nel rapporto del 50 % della massa dei leucociti, mostravano affatto inalterata la loro vitalità, è lecito inferirne che la loro produzione non fosse di così vecchia data, ne' opera di un organo così profondamente degenerato e mal funzionante; e si è invece indotti ad ammettere che al midollo osseo malato si sian sostituiti, sia pur parzialmente, altri organi ematopoietici nella generazione di questa specie di cellule.

Fra le poche altre prove eseguite su individui malati riportiamo ancora la curva ottenuta, col metodo macroscopico, da un sangue tratto da un giovanetto di sedici anni sofferente per un attacco non grave di appendicite, che in pochi giorni si dileguò senza dar luogo ad ascesso. Si erano avute temperature oltre i 39° e al momento della presa del sangue la temperatura ascellare segnava 38°.

Non furono fatte conte proporzionali che una sola volta, circa cinque ore dopo la presa del sangue, rinvenendosi il 2, 7 % di leucociti morti. La temperatura, a cui il sangue venne conservato, oscillò sempre tra i 33 e i 35 C; all'ottavo giorno si osservavano ancora, nei preparati, vari leucociti scolorati; all'undicesimo giorno di scolorati non ve n'era più alcuno. La maggior parte dei globuli bianchi era in via di disfacimento.

TABELLA N. 22. — *Caso di appendicite.*

	26 febbraio ore 10½ a. e 3½ p.	27 febbraio ore 9½ a.	28 febbraio	29 febbraio	1 marzo	2 marzo	3 marzo	4 marzo	5 marzo	6 marzo	7 marzo
Temperatura del termostato											
	33	31	33, 34	33, 35	35	32	33, 34	32,5, 33,5	34,5, 35,5	33	33
	Dopo 5 ore	Dopo 23 ore									
Nube di emoglobina che si diffonde											
Seolorati. . .	Dopo ore 5½ 173	..	..	..	..	..	..	Ancora vari leucociti seolorati	..	..	Non più leucociti di- stintamente seolo- rati; molti disfatti.
Colorati . . .	5	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
	2.7 %	..	..	..	..	..	..	..	..	..	

Ultima una conta eseguita in un sangue leucemico 7 ore dopo la sua estrazione.

TABELLA N. 23. — *Sangue leucemico.*

	29 dicembre ore 10 a. e 5 p. Temperatura del termostato 36,5
	Dopo 7 ore
Seolorati.	295
Colorati	4
	1.3 %

Osservato in ogni suo punto, il preparato microscopico non presentava all'occhio una proporzionalità di morti maggiore di quella risultante dalla

tabella, quasi che, quando siano insieme uniti in gran numero, i leucociti riescano a meglio difendersi da influenze nocive ed a resistere in vita più a lungo che non quando siano scarsi od isolati.

Sostanze medicamentose. — Le tabelle che seguono danno i risultati di poche ricerche eseguite, a titolo di prova, con alcuni medicamenti.

TABELLA N. 24. — *Antipirina*. (A).

	19 febbraio ore 4 ½ p.	20 febbraio ore 9 ½ a.	21 febbraio ..	22 febbraio ..	23 febbraio ..	24 febbraio ..	25 febbraio ..	26 febbraio ..
Temperatura del termostato								
	34	31, 30.5	32	31, 34	..	35.6	36	33
								
Scolorati.	..	Dopo 24 ore 169	Proporzione tra colorati e scolorati invariata da quella del sangue senza antipirina.	..	..	..	..	Molto detrito, i colorati mal conservati; an- cora rarissimi scolorati.
Colorati	..	24		..	..	..	..	
	..	15 %		..	..	..	..	

TABELLA N. 25. — *Cocaina* (D)
(cmc. 0.10 di una soluzione all'1 %).

	27 maggio ore 5 p.	28 maggio ..	29 maggio ..
Temperatura del termostato			
	36.5	37.8, 37.8 37	35, 36.5
		Dopo 24 ore 64	Dopo 48 ore 82
Scolorati.	..	60	48
Colorati	..	48 %	36 % detrito

TABELLA N. 26. — *Cocaina* (D)
(soluzione all'1 % cmc. 0.12).

	31 maggio ore 12 a. e 5 p.	1 giugno ..
Temperatura del termostato		
	36.5, 37	37.3
	Dopo 5 ore 108	Dopo 24 ore 98
Scolorati	42	85
Colorati.	28 %	46 %

TABELLA N. 27. — *Pancreatina* (D).

	3 giugno ore 10 a. e 5 p. Temperatura del termostato 37, 35.6
	Dopo 7 ore
Scolorati.	131
Colorati	6
	4 %
Controllo al n. 9.	

A proposito delle medesime ci limitiamo a far notare che nelle tabelle riguardanti la cocaina, mentre le cifre della mortalità che salgono al 28 % dopo 5 ore e quelle concordi del 48 e 46 % dopo 24 ore, chiaramente svelano l'azione dannosa di questo medicamento sui globuli bianchi, la cifra del 36 % dopo 48 ore sembrerebbe essere in contrasto con le proporzioni precedenti.

Ma il contrasto è solo apparente, poichè nel preparato microscopico del sangue conservato per 48 ore si notavano leucociti in disfacimento e considerevole detrito, ciò che sta a dimostrare che molti globuli bianchi si erano rapidamente disgregati, inducendo un'alterazione nella proporzione fra leucociti colorati e scolorati, ossia fra i morti ed i viventi.

L'argomento dell'azione che le varie classi delle sostanze medicamentose esercitano sui leucociti è oggetto di studio del nostro collaboratore dott. Mars, cui siamo legati da viva riconoscenza per l'opera assidua ed intelligente a noi prestata nelle presenti faticose ricerche.

Ci affrettiamo ad abbandonare quest'argomento, per volgerci ad esplorare il campo di altre indagini rese possibili dal nostro metodo ed intese a determinare l'azione dei germi infettivi e dei loro prodotti di ricambio sui leucociti.

Microbi infettivi. — Riferiamo senz'altro i risultati delle primissime esperienze che il tempo limitato ed i mezzi di cui disponevamo ci hanno finora consentito.

Bacilli tubercolari. — Da una coltura che data da 27 giorni e sviluppata assai lentamente, si tolgono alcune anse di bacilli che si emulsionano in $\frac{1}{2}$ cmc. di ossalato di sodio all'1 %; poi si aspira questa emulsione in

tubetti semicapillari mescolandola al sangue in proporzione volumetrica di 2 a 3, ossia un segmento di due cm. di emulsione su tre di sangue.

TABELLA N. 28. — *Bacilli tubercolari* (A).

	28 febbraio ore 5 p.	29 febbraio ..	1 marzo ..	2 marzo ..	3 marzo ..	4 marzo ..	5 marzo ..	6 marzo ..	7 marzo ..
Temperatura del termostato									
	34	33, 35	35	32	33, 34	32, 5, 33, 5	34, 5, 35, 5	33	33
Scolorati . . .	..	228	112	76	45	..	Ancora alcuni scolorati, i colorati sono in ge- nere abbastanza con- servati; detrito.	..	Se ne è scorto ancora uno scolorato; detrito.
Incerti	..	4	18	34	67	..		..	
Colorati	..	78	147	195	180	..		..	
	..	26 %	59 %	75 %	84 %	..		..	

Le cifre risultanti, messe a confronto con quelle che seguono, mostrerebbero che il bacillo della tubercolosi uccide i globuli bianchi meno energicamente di tutti gli altri che furono da noi esaminati, il che forse è in rapporto al più lento sviluppo di questo germe.

Solo al terzo o quarto giorno furono fatti preparati con lo Ziehl e si rinvennero bacilli tubercolari attorno ai nuclei di cellule bianche mezzo disfatte.

Bacillo della difterite. — Quasi un'intera patina di un tubo di cultura (datata da 48 ore) fu emulsionata nell'acqua di condensazione dell'agar, poi distribuita nei tubetti, a ciascuno in ragione di $\frac{1}{2}$ cm. di segmento su 5 cm. del solito miscuglio di sangue e di ossalato.

I bacilli dunque si trovavano, in quantità straordinaria, mescolati al sangue, il che non deve ritenersi senza influenza sull'abbastanza alta mortalità che offrono le cifre seguenti:

TABELLA N. 29. — *Bacillo difterico* (A).

	5 febbraio ore 4½ p.	6 febbraio ..	7 febbraio ..	8 febbraio ..	9 febbraio ..	10 febbraio ..	11 febbraio ..
Temperatura del termostato							
	35.5	33	33, 34.8	34, 35	33	32.5, 34.5	33, 34
Scolorati	..	107	83	60	45	..	Ancora rarissimi scolorati; i colorati mal conservati; moltissimo detrito.
Incerti	..	25	89	95	119	..	
Colorati	..	76	139	157	201	..	
	..	48 %	73 %	80 %	87 %	..	

Nei preparati a secco, colorati, i bacilli si rinvenivano, numerosissimi, entro e fuori le cellule.

Pneumococco di Fraenkel. — La prima esperienza fu eseguita nel marzo; con uno stipite alquanto attenuato. Parte della patina fu emulsionata nell'acqua di condensazione dell'agar e distribuita nei tubetti.

TABELLA N. 30. — *Pneumococco di Fraenkel* (A).

	12 marzo ore 5 p	13 marzo ..	14 marzo ..	15 marzo ..	16 marzo ..	17 marzo ..
Temperatura del termostato						
	32	33, 35	33, 35	33, 35.2	31.5, 35.7	34
Scolorati	..	176	204	51	14	Ancora pochi scolorati; i più colorati, detrito.
Incerti	..	10	15	62	55	
Colorati	..	73	350	185	64	
	..	32 %	64 %	82 %	89 %	

Controllo al N. 3.

Nella seconda, ripetuta in aprile, il pneumococco adoperato era virulentissimo. Da una cultura agar-sangue di 24 ore, furono tolte due o tre

anse di patina ed emulsionate in un cmc. di un miscuglio a parti eguali di sangue e soluzione ossalato-sodica all'1 %.

TABELLA N. 31. — *Diplococco capsulato* di Fraenkel, virulentissimo. (A).

	7 aprile ore 5 p.	8 aprile ..	9 aprile ..
Temperatura del termostato			
	30	34, 31	35.5
Scolorati . . .	..	136	244
Incerti	..	21	33
Colorati	..	95	177
	..	46 %	46 % Detrito

Si rinvenne, dopo 24 ore, il 46 % di leucociti morti; dopo 48 ore la proporzione rimase la stessa, ma la presenza di detrito mostrava che vi era stata distruzione di leucociti, il che può darci ragione del mancato aumento nella proporzione dei leucociti morti.

Maggiore importanza — anche per il numero delle esperienze eseguite — hanno le ricerche fatte sui germi che seguono.

Streptococco. — La prima esperienza nel febbraio fu fatta con uno stipe abbastanza vecchio di questo cocco.

Una cultura di 24 ore fu emulsionata nell'acqua di condensazione dell'agar e distribuita in vari tubicini in quantità di circa $\frac{1}{4}$ di cm. di segmento, per ogni singolo tubetto, su 5 cm. del miscuglio sangue e soluzione ossalato-sodica all'1 %.

TABELLA N. 32. — *Streptococco I* (poco virulento). (A).

	7 febbraio ore 4 $\frac{1}{2}$ p.	8 febbraio ..	9 febbraio ..	10 febbraio ..	11 febbraio ..	12 febbraio ..
Temperatura del termostato						
	..	33, 34	36	34, 35	34	..
Scolorati	..	154	79	40	17	Ancora rarissimi scolorati; i colorati sono discretamente conservati; detrito.
Incerti	..	7	10	11	30	
Colorati	..	82	137	191	192	
	..	36 %	65 %	83 %	92 %	

Nei preparati a secco colorati, gli streptococchi si rinvennero a catene fuori dei leucociti e dentro le cellule.

In una seconda ricerca, nell'aprile, fu adoperato lo stesso streptococco, che nel frattempo si era eccellentemente abituato alla vita saprofita.

La sua virulenza era talmente attenuata che 3 cmc. di una cultura in brodo, iniettati nel coniglio, non davano che soli fenomeni d'infiltrazione ed ascessi locali a lento svolgimento.

Due anse di questo streptococco, tolte da una cultura di 24 ore, si mescolano ad un cmc. del miscuglio a parti uguali di sangue e soluzione di ossalato.

TABELLA N. 33. — *Streptococco I*
(pochissimo virulento) (A).

	3 aprile ore 5½ p.	4 aprile ..	5 aprile ..
Temperatura del termostato			
	35,5	34,5, 33,5	32, 33
Scolorati . . .	..	204	163
Incerti	..	4	31
Colorati	..	56	108
	..	22 %	46 %

Nei preparati secchi colorati rinvenngonsi gli streptococchi, ma in scarso numero.

Nel terzo esperimento, ad un cmc. di sangue e soluzione di ossalato si mescolarono due o tre anse di uno streptococco virulentissimo, di cui 3 cmc. di una cultura in brodo davano la morte dell'animale in circa 27 ore ed infiltrato emorragico nel punto d'inoculazione.

TABELLA N. 34. — *Streptococco II*
(virulentissimo). (A).

	6 aprile ore 5 p.	7 aprile ..	8 aprile ..
Temperatura del termostato			
	31	32, 30	34
Scolorati . . .	..	206	30
Incerti	..	54	12
Colorati	..	110	121
	..	44 %	81 %

In questi esperimenti con lo streptococco di diversa virulenza, come da quelli eseguiti col pneumococco e col bacillo del tifo risulta abbastanza chiaramente che col crescere della virulenza di un dato germe, cresce anche il suo potere di uccidere i leucociti.

Stafilococco piogene aureo. — Alcune (4-5) anse di una cultura recente di stafilococco vengono emulsionate in $\frac{1}{2}$ cmc. della soluzione ossalato-sodica all'1 % e questa distribuita in vari tubetti in proporzione volumetrica di 2 su 3 di sangue.

TABELLA N. 35. — *Stafilococco piogene aureo*.
(A).

	12 gennaio ore 4½ p.	13 gennaio ..	14 gennaio ..
	Temperatura del termostato		
	37	35, 36, 5	37
Scolorati . . .	..	24	Rarissimi scolorati; pochissimi colorati; detrito.
Incerti	..	3	
Colorati	..	188	
	..	88 %	

Nei preparati microscopici i leucociti sono scarsissimi, tanto che è occorso allestirne parecchi per mettere insieme la somma di 215, quale è appunto quella dei conteggiati nella tabella.

Tale è tanto rapida fu la distruzione di essi che in tutti i tubetti si è formato, nella colonna liquida, quando ancora non tutti gli elementi bianchi si eran depositati, un coagulo di aspetto mucoso, che al microscopio risulta composto di un ammasso di granuli risultanti dai globuli bianchi disfatti.

Una cultura fatta da uno dei tubetti, nove giorni dopo istituito l'esperimento, dà uno sviluppo rigoglioso di stafilococchi.

Una seconda ricerca fu istituita, aggiungendo ad una miscela a parti eguali di sangue e soluzione ossalato-sodica due piccole anse di una cultura di stafilococco aureo.

TABELLA N. 36. — *Stafilococco piogene aureo*.

	22 marzo ore 5 p.	23 marzo ..	24 marzo ..
	Temperatura del termostato		
	35	32, 35	34,5
Scolorati . . .	..	60	16
Incerti . . .	..	15	19
Colorati . . .	..	175	142
	..	76 %	90 % detrito

Ambedue queste esperienze sono concordi nel dimostrare che i leucociti cimentati con lo stafilococco aureo in breve tempo restano uccisi e disgregati in proporzioni, la cui altezza non è raggiunta da nessun altro dei germi da noi finora provati.

Tifo. — Furono adoperati bacilli di virulenza diversa.

Nelle prime ricerche si aveva un germe (Tifo I) che da lungo tempo non aveva subito passaggi in animali ed era quindi relativamente attenuato. La prima prova fu fatta emulsionando in circa un cmc. della nostra soluzione ossalato-sodica 5 anse di bacilli, prelevati da una coltura di 24 ore. L'emulsione fu distribuita in tubetti con sangue, nelle solite proporzioni volumetriche di 2/3.

TABELLA N. 37. — *Tifo I. (A).*

	15 febbraio ore 5 a.	16 febbraio ..	17 febbraio ..	18 febbraio ..
	Temperatura del termostato			
	..	34, 36,5	35,5, 36,5	41, 36
Scolorati .	..	214	66	5
Incerti .	..	26	66	99
Colorati .	..	261	208	120
	..	57 %	80 %	97 % detrito

Un secondo esperimento con gli stessi bacilli da un'agar-cultura di due giorni dà i risultati che seguono:

TABELLA N. 38. — *Tifo I. (A).*

	27 marzo ore 5 p.	28 marzo ..	29 marzo ..	30 marzo ..
Temperatura del termostato				
	34	35, 33,5	32,5, 34	34, 31
Scolorati .	..	147	64	30
Incerti . .	..	31	57	102
Colorati. .	..	142	181	109
	..	54 %	78 %	87 % detrito

La terza ricerca si fece con lo stesso germe, ma iniettato di recente ad una cavia e da questa nuovamente isolato (*Tifo II*). Se ne emulsionarono due anse su un cmc. di sangue e soluzione ossalato-sodica.

TABELLA N. 39. — *Tifo II. (A).*

	18 aprile ore 4½ p.	19 aprile ..	20 aprile ..
Temperatura del termostato			
	33	33	32
Scolorati . . .	..	51	65
Incerti	..	8	12
Colorati. . . .	..	85	67
	..	64 %	54 % Leucociti assai rari; molto de- trito.

Il terzo e il quarto esperimento furono fatti con lo stesso germe divenuto virulentissimo (*Tifo III*) dopo un secondo passaggio attraverso il corpo

della cavia. In ambo le ricerche si emulsionarono due anse di bacilli in un cmc. del miscuglio di sangue e soluzione ossalato-sodica.

TABELLA N. 40. — *Tifo III. (D).*

	16 maggio ore 5 p.	17 maggio ..
	Temperatura del termostato	
	35, 5	36, 37
Scolorati	..	59
Incerti	..	1
Colorati	..	25
	..	30 % detrito
Controllo al N. 7.		

TABELLA N. 41. — *Tifo III. (D).*

	30 maggio ore 10 ½ a. e 6 ½ p.	31 maggio ..
	Temperatura del termostato	
	35, 37	36, 5
	Dopo ore 6 ½	Dopo ore 3 6
Scolorati	104	101
Colorati	51	40
	32 %	28 % molto detrito

Nei preparati a secco colorati scorgevansi già dopo qualche ora i leucociti infarciti di bacilli e fortemente vacuolizzati.

Infine fu fatta una quinta prova col germe I, emulsionandone un paio di anse in mezzo cmc. della soluzione ossalato-sodica all'1 %, aggiungendovi del siero agglutinante in proporzione di 1,50 e da ultimo mezzo cmc. di sangue.

TABELLA N. 42. — *Tifo I con siero agglutinante.*
(E).

	18 maggio ore pomerid.	19 maggio ..
	Temperatura del termostato	
	36	25, 30
Scolorati	..	66
Colorati	..	98
	..	59 %

L'azione del siero agglutinante (che nel controllo si mostrò positiva) non parve attenuare l'azione dei bacilli sui leucociti. Però è bene far noto

che il sangue fu mescolato all'emulsione quando ancora l'azione del siero agglutinante non si era resa manifesta sui bacilli, rendendoli immobili ed aggruppati.

Dalla comparazione di tutte le esperienze surriferite emerge che col tifo I si sono avute sempre risultanze concordi:

Dopo 24 ore una mortalità, rispettivamente alle varie esperienze, di 57, 54, 59.

Dopo 48 ore di 80-78.

Dopo 72 ore di 87-97.

Col germe II, più virulento, la mortalità dopo 24 ore sale a 74 e dopo 48 ore si ha la cifra del 54 %, in apparenza più bassa ma spiegata dall'enorme disgregazione dei leucociti nel frattempo avvenuta e svelata dalla scarsità dei medesimi nei preparati e dall'abbondante detrito.

Col tifo III, virulentissimo, si ha dopo sei ore e mezzo una mortalità del 32 %, mortalità che dopo 24 ore scende apparentemente a 28 e 30, per le medesime ragioni di cui poco sopra.

Oltre alla maggiore virulenza del germe, qui si ebbe una temperatura di conservazione al termostato più alta, per quanto di solo qualche grado, che non nelle prove col tifo I, e questa più alta temperatura, mentre era più favorevole allo sviluppo dei bacilli, era anche, come ben sappiamo, meno propizia alla durata della vita dei leucociti.

Emerge da tutte queste esperienze nel modo più evidente che i microbi infettivi, almeno quelli da noi presi in esame, esercitano tutti, chi più chi meno, a seconda della loro specie, un danno sui leucociti ed in grado che varia non solo in rapporto alla moltitudine dei germi, ma anche col variare della loro virulenza. Lo stafilococco p. aureo si è mostrato il più nocivo e subito dopo il bacillo del tifo.

Nei preparati colorati potevasi poi constatare che i germi misti al sangue venivano già nelle prime ore per la massima parte inglobati dai globuli bianchi. In alcune prove istituite con sangue leucemico potevasi riscontrare che il massimo potere fagocitario verso i microbi l'esercitano i leucociti neutrofili e quasi in pari grado i mielociti, mentre assai debole risultò il potere fagocitario negli eosinofili, e nullo nei basofili.

All'inglobamento dei germi seguiva spesso formazione di vacuoli, precisamente come è descritto da Metchnikoff. Questa formazione di vacuoli, dovuta, secondo lo stesso Metchnikoff, ad una secrezione intorno al germe di sostanze atte a digerirlo, rappresenterebbe una reazione di difesa; ma i leucociti che hanno inglobati i batteri, sia che in questa reazione di difesa esauriscano più rapidamente la loro vitalità, sia, più verosimilmente, che il germe li danneggi, certo è che non tardano a perire; il loro nucleo

a contatto del bleu di metilene assume il colore; i vacuoli del protoplasma aumentano di numero e d'ampiezza fino a che il leucocito si disgrega. Si scorgono allora nei preparati colorati a secco dei nuclei con all'intorno residui di protoplasma e mucchi di bacilli, e si riceve l'impressione che i microbi abbiano trasformato il protoplasma del leucocito morto in terreno di cultura.

Quanto accade in vitro è lecito supporre debba analogamente verificarsi in circolo, per lo meno in quei casi in cui ha luogo nel sangue invasione copiosa di microbi patogeni di alta virulenza.

La più rapida morte e distruzione che avviene dei leucociti a contatto dei batteri vivi e virulenti rende interessante indagare per qual modo questa azione leucocidica si esplica, se per l'influenza diretta del germe vivente o per prodotti del suo ricambio, o per le sostanze derivanti dalla disgregazione dei corpi batterici morti ed inglobati dai globuli bianchi.

Quest'argomento si riconnette strettamente ai problemi sui processi di infezione, d'intossicazione e d'immunizzazione dell'organismo e meriterebbe esauriente esame. Noi finora non potemmo eseguire che poche esperienze in merito. Il materiale ci fu gentilmente favorito dal R. Istituto sperimentale d'igiene in Roma, e ne rendiamo grazie infinite all'insigne professor Celli ed alla squisita cortesia de' suoi aiuti, professori Casagrandi e De Blasi.

Tossine. — Fra le tossine meglio conosciute abbiamo provato la tetanica e la difterica, provenienti entrambe dall'Istituto Sieroterapico di Milano.

La loro virulenza fu previamente saggiata sugli animali:

la tossina difterica, iniettata in dose di cmc. 0,025 sotto cute nella regione pettorale di una cavia del peso di gr. 250 uccideva questa al 6° giorno;

la tossina tetanica in dose di mezzo cmc. ipodermicamente uccideva un'altra cavia dello stesso peso in circa 48 ore.

Ora, ambedue queste tossine, la tetanica e la difterica furono aggiunte in quantità di una goccia a un cmc. della miscela a parti uguali di sangue ed ossalato sodico all'1% (da quale proporzione per la tossina difterica corrisponde al doppio della dose letale). Ambedue, come risulta dalle tabelle con le relative prove di controllo si mostrarono affatto inattive sui leucociti.

TABELLA N. 43. — *Tossina difterica*. (C).

	9 maggio ore 5 p.	10 maggio ..	11 maggio ..
Temperatura del termostato			
	36	36.5, 36	36
		Dopo 24 ore	
Scolorati	..	153	128
Incerti	..	..	3
Colorati	..	40	49
	..	20 %	29 %

Controllo al N. 6.

TABELLA N. 44. — *Tetano-tossina*. (B).

	30 marzo ore 10 ½ a.	31 marzo ..
Temperatura del termostato		
	33, 31	32, 32.5
		Dopo ore 30
Scolorati	..	250
Incerti	..	3
Colorati	..	39
	..	14 %

Controllo al N. 5.

Tali esperienze furono successivamente ripetute (Tabelle dal 43 al 49) e con quantità ancor maggiori di tossina (cmc. 0,10).

TABELLA N. 45. — *Tossina difterica cmc. 0,15*. (D).

	24 novembre ore 11 ½ a.	29 novembre ore 10 ½ a.
Temperatura del termostato		
	36.5	31.5
		Dopo 23 ore
Scolorati	..	119
Colorati	..	25
	..	17 %

Controllo al N. 15.

TABELLA N. 46. — *Tossina difterica cmc. 0,10*. (D).

	29 novembre ore 10 a. e 3 ½ p. Temperatura del termostato ..
	Dopo ore 5 ½
Scolorati	150
Colorati	19
	11 %

Controllo al N. 16.

TABELLA N. 47. — *Tossina difterica cmc. 0. 10.*
(D).

	3 dicembre ore 10 ½ a. e 3 ¼ p.	4 dicembre ore 10 a. ore 4 p.		5 dicembre ..
	Temperatura del termostato			
	34, 34.5	33.5	36.6	34
	Dopo 5 ore	Dopo 23 ore	Dopo 29 ore	
Scolorati .	110	187	55	..
Colorati. .	8	21	8	..
	6 %	10 %	12 %	..

Controllo al N. 18.

TABELLA N. 48. — *Tetano-tossina cmc. 0. 10.*
(D).

	30 novembre ore 11 ½ a. e 3 p.	1 dicembre		2 dicembre ore 9 ½ a.
		ore 11 a.	ore 3 p. e 4 ½ p.	
		Temperatura del termostato		
		35, 34.5	33	34, 35
	Dopo ore 3 ½	Dopo 23 ore	Dopo 27 ore	Dopo circa 46 ore
Scolorati .	155	198	221	83
Colorati. .	5	16	28	39
	3 %	8 %	11 %	31 %

Controllo al N. 17.

TABELLA N. 49. — *Tetano-tossina cmc. 0. 10.*
(D).

	26 dicembre ore 4 p.	27 dicembre	28 dicembre
	Temperatura del termostato		
	34	32.5-33	..
		Dopo 24 ore	Dopo 48 ore
Scolorati . . .	..	145	70
Colorati . . .	..	15	30
	..	9 %	30 %

Controllo al N. 13.

I risultati, come vedesi, non furono diversi, anzi la cifra della mortalità dei leucociti fu in genere singolarmente bassa, forse perchè la piccola aggiunta di brodo, quello ove eran disciolte le tossine, costituiva per leucociti un buon mezzo di conservazione.

Codesti risultati armonizzano pienamente con quanto è già noto dell'azione di entrambi questi veleni, tetanico e difterico, sui vari esseri unicellulari.

Pur astraendo dal fatto che queste tossine si mostrano inoffensive verso

i microbi, i quali anzi possono pullulare nei liquidi ove sono disciolte e distruggerle, le esperienze di Gengou (1) e di altri sugli infusori ciliati concludono per la nessuna azione delle tossine menzionate sui parameci.

Per quanto riguarda il loro comportamento di fronte ai globuli bianchi, è notevole l'osservazione di Arneth. Questi nello studiare le alterazioni che subisce il quadro ematologico dei leucociti neutrofili nelle varie malattie infettive, trovò che nel tetano codesto quadro resta affatto inalterato, ossia la distruzione dei globuli bianchi non viene aumentata; la qual cosa anch'egli spiega con la nessuna affinità che, a differenza delle cellule nervose, i leucociti avrebbero per la tossina tetanica.

Non altrettanto concordi coi nostri apparirebbero i reperti di Arneth nella difterite, in cui le alterazioni nel quadro ematologico dei neutrofili, sono assai notevoli. Per vero in tutti e tre i casi riferiti l'infezione fu gravissima, alta la febbre, rapido l'esito letale e, secondo lo stesso Arneth ammette, in uno almeno di essi era sopravvenuto un processo settico che infettava direttamente il sangue. Ma pur ritenendo che negli altri due casi si fosse diffusa in circolo la sola tossina, provocando le alterazioni ematologiche dall'A. osservate, non per questo vi sarebbe da dubitare degli esperimenti in vitro. Anzi i loro risultati sono qui tanto più netti, inquantochè non turbati da influenze d'altra natura, quali invece sono facili ad aversi nell'organismo vivente.

Nè le alterazioni nel quadro ematologico, nè la leucocitosi in seguito al passaggio di questi veleni in circolo sono necessariamente da ascrivere all'opera diretta delle tossine, potendo, a nostro vedere, esser provocate per via indiretta. Ma di ciò in appresso.

Tubercolina. — Dal gruppo delle proteine scegliemmo per le nostre prime prove la più nota tra esse, cioè la tubercolina. Il prodotto adoperato proveniva dall'Istituto vaccinogeno di Berna. Disponevamo di un tubetto, saldato alla lampada, di tubercolina concentrata, di cui un volume unito ad otto volumi di liquido dava una soluzione normale di tubercolina ad 1/10.

Si istituirono varie esperienze, unendo al sangue dosi abbastanza alte di tubercolina, quali:

1° cmc. 0,005 di tubercolina concentrata su cmc. 1 della miscela sangue e soluzione di ossalato, venendo così a formare una soluzione di tubercolina circa metà del normale, cioè ad 1/20;

2° cmc. 0,01 di tubercolina concentrata su cmc. 1 della solita miscela formando una soluzione quasi normale di tubercolina, cioè a circa 1/10;

(1) GENGOU. *Sur l'immunité naturelle des organismes monocellulaires contre les toxines.* Ann. de l'Inst. P. — Vol. XXII, 1898.

3° cmc. 0,05 di tubercolina concentrata su cmc. 1 di sangue e soluzione ossalato sodica.

TABELLA N. 50. — *Tubercolina (concentrata cmc. 0,005). (D).*

	5 giugno ore 11 ½ a. e 5 ½ p.	6 giugno		7 giugno	8 giugno	9 giugno
		ore 10 ½ a.	ore 5 ¼ p.	..	..	..
	Temperatura del termostato					
	37,8, 38,6	32	34	..	..	..
	Dopo ore 6	Dopo ore 23	Dopo ore 30			
Scolorati	176	74	74	..	..	Molto detrito, vari colorati, alcuni incerti; nessun scolorato.
Colorati	26	80	46	..	..	
	12 %	51 %	38 % detrito	..	..	

Controllo al N. 10.

TABELLA N. 51. — *Tubercolina (concentrata cmc. 0,01). (D).*

	5 giugno ore 11 ½ a. e 5 ½ p.	6 giugno ore 6 ½ p.	7 giugno	8 giugno	9 giugno
			..	..	..
	Temperatura del termostato				
	37,8, 38,6	32, 34	..	..	..
	Dopo 7 ore	Dopo 30 ore			
Scolorati	89	Molti colorati; detrito.	..	..	Maggiore il detrito, scarsi i leucociti rimasti e tutti colorati.
Colorati	12		..	..	
	12 %		..	..	

Controllo al N. 10.

TABELLA N. 52. — *Tubercolina*
(concentrata cmc. 0.05). (D).

	13 giugno ore 11½ a e 5 p.	14 giugno ore 5½ p.
	Temperatura del termostato	
	35, 35	34.5, 35.5
	Dopo 6 ore	Dopo 30 ore
Scolorati	92	104
Colorati	8	42
	8 %	28 %

La mortalità dei globuli bianchi dopo le prime sei, sette ore risultò, come vedesi, dell'8 al 12 %, ossia non apprezzabilmente aumentata in confronto della norma (vedasi anche controllo n. 10). Dopo 24-30 ore i leucociti che si rinvennero morti furono per vero in alcune prove abbastanza numerosi e nei preparati si scorgeva anche del detrito; ma nel valutare i risultati conviene tener conto che la stagione calda e le alte temperature del termostato non eran certo le più propizie alla lunga conservazione dei leucociti. Onde è prudente restringere il confronto alle cifre ottenute dopo le prime ore di contatto.

Esse mostrerebbero che la tubercolina, nelle dosi con cui si sperimentò, non esplica un'azione evidentemente nociva sui globuli bianchi.

Leucocidina stafilococcica. — Essendo noto per gli studi di Van de Welde, di Bail e di Neisser e Wechseberg, che lo stafilococco produce un veleno (leucocidina) il quale agisce direttamente sui leucociti, uccidendoli e dissolvendoli, credemmo opportuno provarne l'azione col nostro metodo e di studiare anche quale influenza ha sui leucociti lo stafilococco morto indipendentemente dalla leucocidina da esso segregata.

La leucocidina stafilococcica si forma, come è risaputo, nelle colture in brodo a cominciare dal 4° giorno e raggiunse nell'ottavo il suo massimo.

Noi, per eliminare la possibilità di una qualsiasi azione del terreno di coltura sui leucociti, in luogo delle colture in brodo, preferimmo servirci delle colture in agar.

Tenuto pertanto lo stafilococco piogene aureo per cinque giorni in agar-cultura, ne furono emulsionate tre patine in una soluzione di ossalato di sodio all'1 %.

L'emulsione fu conservata per 24 ore in termostato a 42 c. e da ultimo filtrata con le dovute cautele attraverso filtri di porcellana. Si raccolsero

così cmc. 7 di un filtrato perfettamente sterile, come dimostrarono le intraprese prove culturali di controllo.

Cmc. 0,25 di questo filtrato furono aggiunti, insieme ad altri cmc. 0,25 di semplice soluzione di ossalato di sodio, a cmc. 0,50 di sangue puro.

Osservato dopo circa sei ore di permanenza nel termostato, il tubetto, ove era raccolto il miscuglio, lasciava scorgere intensa emolisi e la numerazione, tosto eseguita dava le cifre trascritte nella sottostante tabella.

TABELLA N. 53. — *Filtrato di stafilococco piogene aureo* (cmc. 0.25). (E).

piogene auree (Cm. 11		
---	--	--

In una seconda esperienza, la dose del filtrato di stafilococco fu diminuita e portata a soli cmc. 0,10. Questi, diluiti con cmc. 0,40 di soluzione semplice di ossalato di sodio, furono uniti a cmc. 0,50 di sangue. Anche qui si ebbe dopo poche ore un'evidente emolisi nel tubetto ove era raccolto il sangue ed una forte proporzione di leucociti colorati.

TABELLA N. 54. — *Filtrato di stafilococco aureo* (cmc. 0.10). (E).

	11 giugno ore 11½ a. e 6 p. Temperatura del termostato 36
	Dopo 7 ore
Scolorati	95
Colorati	56
	37 %
Controllo al N. 12.	

L'alta percentualità dei leucociti morti rinvenuta in ambo le prove e che sale nella prima tabella al 50 % e nella seconda al 37 %, dopo solo sei, sette ore di contatto, non trova riscontro in nessun'altra delle esperienze da noi finora eseguite con sostanze tossiche, come pure senza riscontro è la profonda alterazione subita in sì breve lasso di tempo dai leucociti. Ed invero si scorgevano nei preparati microscopici frammenti e leucociti in via di disfacimento; in molti globuli colorati anche il nucleo appariva alterato, avendo perduto la nettezza dei suoi contorni.

L'azione leucocidica del filtrato dello stafilococco ha dunque anche col nostro metodo la più ampia dimostrazione.

Filtrato di culture di tifo. — Dalle precedenti esperienze, dirette ad investigare l'azione dei batteri vivi, sui globuli bianchi del sangue, abbiamo visto risultare che fra i germi esaminati, il bacillo del tifo, dopo lo stafilococco, è quello che uccide in maggior numero i leucociti.

Ora sorge spontaneo il quesito: l'uccisione e la distruzione dei leucociti è anche qui esercitata, analogamente a quanto fa lo stafilococco, a mezzo di un veleno leucocidico?

Indagini sull'esistenza di un veleno tifico con azione dannosa sui leucociti furono tentate con diverse prove.

In una prima esperienza furono emulsionate quattro patine di agar-cultura di tifo, vecchie di tre giorni, in circa cmc. 8 di una soluzione fisiologica di cloruro di sodio. L'emulsione fu tenuta per un'ora a 70 C. e dopo dodici ore filtrata.

Del filtrato furono presi cmc. 0.05 ed aggiunti ad un cmc. del miscuglio sangue ed ossalato di sodio. Il risultato fu affatto negativo.

TABELLA N. 55. — *Filtrato di tifo emulsionato in soluzione fisiologica di NaCl, cmc. 0.05. (D).*

		20 maggio ore 5 p.	21 maggio ..	22 maggio ..
		Temperatura del termostato		
		35.5	36.5, 36.8	35.2
Scolorati . . .	..	Dopo 24 ore	Dopo 48 ore	
	..	136	100	
	..	26	53	
Colorati . . .	..	16 %	34 %	
	..			
	..			

In una seconda prova si raccolsero egualmente tre patine di tifo, ma del numero III, più virulento, e si tennero due giorni in plasmolisi in circa cmc. 6 della soluzione fisiologica di cloruro di sodio; poi, dopo averle esposte per tre quarti d'ora a temperatura di 58, furono filtrate.

Al sangue si unì una dose maggiore di filtrato e cioè cmc. 0.15 su cmc. 1.00.

TABELLA N. 56. — *Filtrato di tifo emulsionato in soluzione fisiologica di Na Cl, cmc. 0.15. (D).*

	28 maggio ore 5 ½ p.	29 maggio ..	30 maggio ..
	Temperatura del termostato		
	37	35, 36.5	35, 36.5
		Dopo 24 ore	Dopo 48 ore
Scolorati . . .	..	115	60
Colorati . . .	..	30	40
	..	20 %	40 %

Come vedesi dalle cifre percentuali, neppure in questo caso si ottennero risultati positivi.

Si passò pertanto ad un terzo gruppo di ricerche, procedendo alla preparazione del filtrato in maniera perfettamente identica a quella praticata per lo stafilococco piogene aureo (V. pag. 54).

Agar-culture di tifo I e di tifo III, datanti da 5 giorni, furono emulsionate in ossalato di sodio all'1% (quattro patine del tifo I in cmc. 5 della soluzione suddetta e quattro patine del tifo III in cmc. 4 della medesima). Le emulsioni furono poscia tenute per 24 ore alla temperatura di 42°, quindi filtrate; ed i rispettivi filtrati nella prova sul sangue furono, come dalla tabella, i seguenti:

Nella tabella 57 a cmc. 0.50 di sangue puro vennero aggiunti cmc. 0.25 della soluzione all'1% di ossalato di sodio e cmc. 0.25 del filtrato di tifo I.

TABELLA N. 57. — *Filtrato di tifo I emulsionato in una soluzione all'1% di ossalato sodico, cmc. 0.25. (D).*

	15 giugno ore 11 ¼ a. e 5 ¼ p. 35, 36.5 Temperatura del termostato
	Dopo ore 6 ½
Scolorati	95
Colorati	5
	5 %

Alla tabella 58, le stesse proporzioni della precedente; ma i cmc. 0.25 di filtrato appartenevano al tifo III.

TABELLA N. 58. — *Filtrato di tifo III emulsionato in una soluzione all'1 % di ossalato sodico, cmc. 0.25. (D).*

	15 giugno ore 11 $\frac{1}{4}$ a. e 5 $\frac{1}{4}$ p.	16 giugno ore 11 a.
Temperatura del termostato		
	35, 35,2	36,2
	Dopo ore 6 $\frac{1}{2}$	Dopo 24 ore
Scolorati	130	80
Colorati.	8	39
	5 %	32 %
Controllo al N. 13.		

Nella tabella 59 il filtrato dal tifo III fu unito a parti eguali col sangue cmc. 0.50 : 0.50.

TABELLA N. 59. — *Filtrato di tifo III emulsionato in una soluzione all'1 % di ossalato sodico, cmc. 0.50. (D).*

	16 giugno ore 11 $\frac{1}{2}$ a. e 5 p.	17 giugno ore 11 $\frac{1}{2}$ a.
Temperatura del termostato		
	36,5, 37,5	36,2
	Dopo ore 5 $\frac{1}{2}$	Dopo 24 ore
Scolorati	91	61
Colorati.	9	39
	9 %	39 %
Controllo al N. 14.		

In un'ultima ricerca il filtrato fu ottenuto da un'emulsione nella soluzione ossalato-sodica (cmc. 8) di tre culture di tifo vecchie di oltre un mese, e tenute per 24 ore in plasmolisi a temperatura ambiente.

Esso fu mescolato a parti eguali col sangue cmc. 0.50 : 0.50.

TABELLA N. 60. — *Filtrato di un'emulsione di bacillo di tifo in ossalato sodico all'1%, cmc. 0.50. (D).*

	30 dicembre ore 10½ a. e 3½ p.	31 dicembre ore 3½ p.
Temperatura del termostato		
	35.5, 37	35
	Dopo 5 ore	Dopo 29 ore
Scolorati	144	165
Colorati	15	82
	9 %	33 %

Seguendo il criterio su cui abbiamo altre volte insistito, e cioè sulla convenienza di scegliere come termine di confronto soltanto le prime cifre, i risultati delle sei suesposte tabelle ci appariranno tutti concordi nel mostrare che in nessuno dei vari filtrati del bacillo tifico si contenevano sostanze nocive alla vitalità dei leucociti. Le percentuali ottenute furono infatti:

Tabella 57.	Dopo 6-7 ore	5 %;
Id. 58.	Id.	5 %;
Id. 59.	Id.	9 %;
Id. 60.	Id.	9 %; dopo circa 30 ore 33 %.
Id. 55.	Dopo circa 24 ore	16 %;
Id. 56.	Id.	20 %;

Il contrasto fra queste cifre e quelle ottenute col filtrato di stafilococco (50, 37 % dopo sei, sette ore nonostante la minor quantità di filtrato mescolata al sangue) salta agli occhi con la massima evidenza.

Germi morti. — Le esperienze coi germi morti furono limitate agli stafilococchi ed al tifo.

Questi germi furono raccolti dal filtro dopo la preparazione dei filtrati, emulsionati ed uccisi infine col calore.

L'emulsione degli stafilococchi constava di tre patine (tolte da tubetti

di agar-cultura) in cmc. 5 di soluzione all'1 % di ossalato di sodio; e restò esposta per un'ora alla temperatura di circa 80°.

Con ciò, oltre l'uccisione dei germi, provata dalle culture di controllo rimaste sterili, si ottenne anche la distruzione di qualunque residuo di leucocidina dai germi segregata, essendo noto che questa già a 50° viene distrutta in 20 minuti ed a 58° in soli 10.

Cmc. 0.25 della detta emulsione, diluiti con altri cmc. 0.25 di soluzione ossalato-sodica, indi uniti a cmc. 0.50 di sangue puro, dettero i seguenti risultati:

TABELLA N. 61. — *Emulsione di stafilococco morto, cmc. 0.35. (E).*

	9 giugno ore 11 a. e 5½ p.	10 giugno ore 5 p.
Temperatura del termostato		
	37, 37.2	37
	Dopo ore 6½	Dopo 30 ore
Scolorati	95	99
Colorati.	18	41
	15 %	29 %
Controllo al N. 11.		

In una seconda esperienza la quantità dell'emulsione fu diminuita e portata a soli cmc. 0.10.

TABELLA N. 62. — *Stafilococco morto, cmc. 0.10. (E).*

	11 giugno ore 11½ a. e 6 p. Temperatura del termostato 36
	Dopo ore 6½
Scolorati	104
Colorati	12
	10 %

In ambo le tabelle la mortalità è bassa, rispettivamente del 15 e del 10% dopo 6 ore e $\frac{1}{2}$ di contatto; essa è certo molto inferiore a quella ottenuta con la leucocidina.

Di più nei tubetti contenenti il sangue con i cocchi morti, a differenza di quanto risultava operando col filtrato degli stafilococchi vivi, non comparve traccia alcuna di emolisi.

Finalmente nei preparati microscopici, sebbene si scorgessero, colorandoli a secco, dei leucociti pieni di cocchi ed alcuni anche con leggera vacuolizzazione, pure, osservandoli a fresco dopo le prime sei, sette ore, non era constatabile alcun detrito, nè apparivano i gravi segni di disfacimento che mostravano i globuli bianchi trattati con la leucocidina.

Adunque il potere venefico di quest'ultima è evidentemente assai maggiore e più pronto di quello delle sostanze derivanti dalla disaggregazione dei cocchi che l'avevano prodotta.

Pel germe del tifo, nelle esperienze a cui si riferiscono le tabelle n. 63 e 64, l'emulsione seguì nella soluzione fisiologica di cloruro di sodio a 0.85% ed in proporzione di una, due patine in circa 5 cmc.; i bacilli vennero uccisi mediante bollitura per mezz'ora a bagnomaria.

Di queste emulsioni furono adoperate quantità invero troppo tenui; per un primo esperimento (tab. 63) cmc. 0.10 e per un secondo (tab. 64) cmc. 0.05.

TABELLA N. 63. — Emulsione di bac. tifico morto, cmc. 0.10.

	18 aprile ore 4½ p.	19 aprile ..	20 aprile ..
Temperatura del termostato			
	33	33	32
		Dopo 24 ore	Dopo 48 ore
Scolorati . . .	..	77	57
Incerti	..	1	8
Colorati	..	40	45
	..	34 %	48 %

TABELLA N. 64. — Bacillo tifico morto, cmc. 0.05.

	20 maggio ore 5 p.	21 maggio ..
Temperatura del termostato		
	35.5	36.5, 36.8
	Dopo 24 ore	
Scolorati	..	134
Incerti	..	11
Colorati	..	47
		30 %

Nella esperienza che segue vennero sospese quattro patine in circa cmc. 5 della soluzione di ossalato di sodio, di guisa che ne risultò una emulsione assai densa di bacilli che furono uccisi col calore a 80°, analogamente a quanto si era praticato per lo stafilococco.

Questa emulsione aggiunta in parti eguali al sangue, dette i risultati riprodotti nella tabella n. 65.

TABELLA N. 65. — *Bac. tifico morto, cmc. 0.50.*
(D).

	16 giugno ore 11½ a. e 5 p.	17 giugno ore 11½ a.
Temperatura del termostato		
	36.5, 37.5	36.2
	Dopo ore 6	Dopo ore 24
Scolorati	40	54
Colorati.	22	62
	35 %	53 %
Controllo al N. 14.		

Nella tabella 66 l'emulsione adoperata era di una patina in circa 6 cmc. della soluzione all'1 % di oss. di sodio.

TABELLA N. 66. — *Bac. tifico morto, cmc. 0.50.*
(D).

	21 dicembre ore 5 p.	22 dicembre ..	23 dicembre ..
Temperatura del termostato			
	34.5	33	..
	Dopo ore 24		
Scolorati	..	80	..
Colorati.	..	45	..
		36 %	

Da ultimo fu eseguita un'esperienza di raffronto fra l'azione dei bacilli morti e quella dei bacilli vivi nel modo qui sotto indicato.

Una cultura di tifo datante da 48 ore fu emulsionata in circa cmc. 5 della solita soluzione di ossalato di sodio. Da questa emulsione, quando ancora i bacilli eran vivi, furono prelevati cmc. 0.10 ed aggiunti ad altri cmc. 0.40 della semplice soluzione di ossalato ed a cmc. 0.50 di sangue (tab. 68). Il resto dell'emulsione, dopo esposta per oltre 3/4 d'ora ad una

temperatura da 70° ad 80°, allo scopo di uccidere i germi, fu provata sul sangue mescolandovela a parti eguali cmc. 0.50:0.50 (tab. 67).

TABELLA N. 67. — *Bac. tifo morto.*

	23 dicembre ore 4½ p.	24 dicembre ..
	Temperatura del termostato	
	35.5	34
Scolorati	..	78
Colorati.	..	55
		41 %

TABELLA N. 68. — *Bac. tifo vivo di raffronto.*

	23 dicembre ore 3½ p.	24 dicembre ..
	Temperatura del termostato	
	33.5	34
Scolorati	..	Dopo 24 ore 91
Colorati.	..	134
		59 %

Le cifre risultanti dalle tabelle fanno vedere, — quanto del resto emerge anche dalle esperienze che precedono — che i microbi vivi, nonostante la assai minor moltitudine che ne fu aggiunta al sangue, esplicano in confronto dei germi morti un'azione leucocidica evidentemente più intensa. contuttoche nel nostro caso la cultura adoperata non fosse molto virulenta.

Nei preparati a secco, colorati i bacilli tifici aggiunti morti al sangue, a differenza di quelli viventi, assumevano assai male la tinta, per guisa che il più delle volte riesciva difficile scorgervi nell'interno dei globuli bianchi.

Una comparazione tra la veneficità — pei leucociti — delle due diverse specie di germi morti, lo stafilococco ed il tifo, è resa difficile dalle condizioni diverse degli esperimenti. Sembrerebbe tuttavia che l'azione nociva dei bacilli morti del tifo prevalesse su quella degli stafilococchi morti.

Comunque queste indagini, dovute interrompere intempestivamente, verranno riprese a miglior epoca.

III.

Conclusioni e deduzioni.

Dopo le prove fornite nel presente lavoro, niun dubbio crediamo debba esistere sull'attendibilità dei metodi da noi proposti e di cui, se il primo può ritenersi grossolano, il secondo è certamente molto delicato ed esatto. Esso ha base nei fatti qui in breve riassunti.

Quando si conservano in condizioni propizie, e soprattutto in modo da

non permettere la coagulazione, i globuli bianchi si mantengono a lungo in vita nel sangue estratto dai vasi. E venendo poi gradualmente a morte, non soggiacciono ad una disgregazione immediata come nel sangue circolante, ma anche dopo che ogni vitalità è spenta, conservano per qualche tempo la forma.

La mercè di questo fatto, oltre l'indagarne la durata della vita, si rende possibile calcolare a mezzo di conte proporzionali fra i morti ed i viventi, il numero dei globuli bianchi che man mano periscono in vari periodi di tempo.

Indice rivelatore dello stato di vita o di morte delle singole cellule è il bleu di metilene, che colora rapidamente e intensamente i nuclei delle cellule spente, mentre lascia totalmente scolorate quelle ancora vitali.

Con tal metodo si è constatato che entro i vasi di regola non esistono leucociti morti e che la loro mortalità fuori dell'organismo, nel sangue non coagulato e conservato a temperatura di circa 37 C, è valutabile nella cifra approssimativa del 20 % ogni 24 ore; le cellule più resistenti possono, nelle condizioni suddette, durare in vita oltre una settimana.

Ma i globuli bianchi mostrano di possedere una grande sensibilità alle temperature. Pari mantenendo le rimanenti condizioni di conservazione, a temperature relativamente basse essi resistono a lungo, anzi si mantengono in vita anche se esposti per più ore a 0°; mal sopportano al contrario le temperature che varcano i 37 C. Queste non solo ne accelerano la morte, ma ne facilitano anche il disgregamento; il che dà un indizio della notevole distruzione dei leucociti che deve avvenire nell'organismo nei processi febbrili già pel solo fatto dell'elevazione della temperatura.

Le susseguenti nostre ricerche pongono in evidenza la grande pratica utilità del metodo per lo studio del comportamento dei leucociti a contatto di svariate sostanze — medicamenti, veleni cellulari, prodotti di ricambio, ecc. — le quali tutte isolate od in varia combinazione fra loro, offrono smisurata materia all'investigazione scientifica. Massimamente interessanti sono poi le indagini coi germi patogeni e coi loro prodotti tossici.

Dai primi esperimenti al riguardo, è risultato che nè la tossina tetanica, nè la difterica mostrano neppure l'indizio di un'azione leucocidica. Ben altra invece è l'azione dei microorganismi viventi: i globuli bianchi che hanno inglobato microbi, periscono più rapidamente degli altri. Se pertanto i fagociti ghermiscono i batteri, questi alla lor volta non restano passivi di fronte agli aggressori; ma infliggono ai leucociti danni or maggiori or minori a seconda della loro diversa specie ed a seconda anche del grado di loro virulenza.

I leucociti adunque restano assai di frequente succumbenti nella lotta

coi microbi infettivi; è tuttavia difficile negare decisamente ad essi ogni e qualsiasi partecipazione alla difesa dell'organismo. Senza entrare nel meccanismo con cui assolvono un tale compito, ci sembra in ogni caso che l'intento da parte loro non si raggiunge sempre d'un tratto; ma più e più schiere di fagociti dovranno succedersi l'una all'altra prima che il nemico venga completamente debellato.

Ora è da chiedersi, in qual modo il germe danneggia la cellula? — È fuor di dubbio che dei batteri, come, per esempio, lo stafilococco, producono sostanze direttamente venefiche per leucociti (leucocidine); in altri però, che pur mostrano un energico potere distruttivo sui medesimi, come ad es. il tifo, la produzione di sostanze leucocidiche non poté essere dimostrata.

Ma considerando appunto il tifo, se si esclude omai che esso segreghi attivamente delle tossine, si ammette peraltro che contenga nel suo corpo un veleno analogo a quello del colera, una tossina intracellulare, un'endotossina, la quale si rende libera soltanto alla morte del germe. — Essa nell'organismo dell'animale infetto diviene libera mercè la batteriolisi specifica effettuata dagli anticorpi del siero. Ma oltre la batteriolisi specifica ve ne ha una non specifica, in cui le endotossine contenute nel corpo dei bacilli, vengono messe in libertà per processi autolitici. Ed infatti Conradi per primo ottenne l'endotossina nel filtrato di emulsioni di tifo.

I vari nostri filtrati di emulsione di bacilli tifici, essendo stati preparati in modo molto simile a quelli del Conradi, contenevano anch'essi — è ragionevole presumerlo, — endotossina attiva.

Questi filtrati tuttavia si mostrarono innocui verso i leucociti, onde conviene dedurne che la endotossina tifica non ha proprietà leucocidiche.

Altre ricerche mostrano che i corpi morti del bacillo tifico — come quelli dello stafilococco, — posti a contatto dei leucociti, ne aumentano la mortalità. Dobbiamo dunque ammettere che nel corpo dei bacilli sono contenute altre sostanze dannose ai leucociti, le quali non attraversano il filtro.

Data la moltitudine dei corpi batterici che i singoli fagociti sogliono inglobare, la quantità di queste sostanze, che entra in azione contro uno stesso elemento cellulare, dev'essere considerevole. Probabilmente esse non sono che i comuni componenti proteici dei corpi bacillari e non ci sembra si possa pensare a tossine specifiche leucocidiche, anche perchè le temperature fino ad 80° C., cui vennero sottoposti i batteri per la sterilizzazione, sogliono in genere rendere inattive le tossine. — La questione verrà meglio chiarita da ulteriori esperienze.

Interessa intanto rilevare, in base ai risultati concordi di tutte le nostre indagini, che i germi vivi esplicano sui leucociti un'azione ben più energica

che non i loro corpi morti e tanto più energica quanto maggiore ne è la virulenza, ciò che fa pensare ad un'azione diretta dei batteri a danno dei globuli bianchi, riferibile verisimilmente all'attività vitale di essi, anche astraendo dal concorso delle tossine.

In armonia al concetto di un'azione distruttiva diretta dei batteri sui globuli bianchi stanno, a nostro vedere, i risultati delle infezioni sperimentali e lo studio delle setticemie.

Rieder, Werigo, Achard e Loeper ed altri sperimentatori hanno constatato che l'inoculazione di microbi i più vari nelle vene di un animale ha, per conseguenza immediata una leucopenia, che si effettua a detrimento dei polinucleari. Alla leucopenia suole subentrare, in breve, una leucocitosi, ma non costantemente; quando il germe iniettato è molto virulento la leucocitosi non si produce (Tchistowitch, Williamson).

In base alla teoria della chemiotassi si ritiene dai più che l'ipoleucocitosi iniziale in queste infezioni sia solo apparente, dovuta cioè non a reale diminuzione dei leucociti; ma a modificata ripartizione dei medesimi, che, per effetto di una specie di repulsione, si rifugierebbero negli organi profondi (milza, fegato, polmoni), diminuendo nel sangue periferico. — Successivamente dai capillari profondi i leucociti migrerebbero, secondo Schultze, nei capillari superficiali, onde iperleucocitosi, la quale però da altri è più giustamente riferita ad una maggior produzione di leucociti da parte degli organi ematopoietici eccitati.

Ma non tutti convengono nell'idea della repulsione e vi è chi (Löwit) riferisce l'ipoleucocitosi a distruzione dei leucociti e particolarmente dei leucociti polinucleari.

La prova diretta fornita dalle nostre indagini, di una notevole azione leucocidica dei germi infettivi è tutta in favore del concetto che la leucopenia nelle infezioni sia infatti dovuta alla distruzione dei globuli bianchi per opera dei batteri.

Ove questi sian vinti dalle forze di difesa dell'organismo ed asportati dal torrente circolatorio, alla leucopenia succede la iperleucocitosi reattiva; quando invece i germi, sia per la loro moltitudine, sia per la loro virulenza, resistono alla difesa opposta dall'ospite, allora permangono in circolo, vi si moltiplicano, proseguono a distruggere sempre nuovi globuli bianchi e la leucopenia si fa duratura.

Analogamente a quanto accade nelle infezioni sperimentali, anche nelle malattie infettive umane si verificherebbe una ipoleucocitosi iniziale passeggera, che nel più dei casi sfugge all'osservazione. Certo è in ogni modo che nelle infezioni gravi, nelle vere setticemie di prognosi quasi sempre infausta, in cui fu constatato circolare costantemente nel sangue molti germi infettivi, si ebbe ad osservare ipoleucocitosi.

Parecchi casi di questa specie, cioè di setticemie accompagnate ad ipoleucocitosi, son citati fra gli altri da Arneth, il quale, in base ai suoi studi sulle alterazioni che subisce il quadro ematologico dei neutrofili nelle malattie infettive, pone l'ipotesi: le batteriemia dà leucopenia, la tossiemia provoca iperleucocitosi.

Siffatta ipotesi ha del vero; ma solo in parte; certo è inesatto credere come fa l'Arneth, che solo occasionalmente possa darsi una batteriemia con iperleucocitosi e che nella difterite e nella polmonite si abbia per lo più a che fare soltanto con un'azione tossica.

Oggidi non è più lecito ritenere come eccezionale la presenza di microbi patogeni nel sangue; una tecnica batteriologica più perfezionata ha rivelato che non è infrequente rinvenirveli nel corso delle infezioni. E per limitarci ad un solo esempio, il Prochaska nella Clinica di Eichhorst, ha mostrato che nella polmonite fibrinosa i pneumococchi si rinvencono senza eccezione in circolo purchè si usino per la semina quantità sufficienti di sangue (circa 10 cmc.). Ora appunto la pneumonite è una di quelle malattie che suol andare unita a notevole iperleucocitosi.

Adunque la batteriemia è ben lungi dall'avere per conseguenza necessaria e costante la leucopenia.

E ben si comprende del resto che nel decorso di una malattia infettiva batteri possono penetrare ad ogni momento nel torrente circolatorio; vi si possono quindi rinvenire tanto più facilmente quanto maggiore è la quantità di sangue che si semina nel terreno di cultura.

Perchè i batteri penetrati in circolo producano con la grande distruzione dei globuli bianchi una sensibile leucopenia v'ha bisogno del concorso di varii fattori: anzitutto la specie del germe, la sua capacità leucocidica, il grado di sua virulenza, la moltitudine delle unità che ha invaso il sangue, ed infine la recettività dell'ospite in rapporto ai maggiori o minori poteri di difesa di cui dispone nel suo siero o nei suoi globuli. Solo allorchè le condizioni son tali da permettere ai germi un facile sviluppo essi prevarranno nella lotta contro i leucociti, che hanno il compito di eliminarli dal circolo, e solo allora condurranno a rapida ed estesa distruzione di questi, cioè a leucopenia.

Pertanto se non può in via generale affermarsi essere la batteriemia causa di ipoleucocitosi, deve nondimeno ritenersi che, ove la ipoleucocitosi di una certa durata non dipenda da condizioni morbose degli organi ematopoietici, essa sia indice di batteriemia spesso grave.

Quante ipotesi non furon tratte in campo per spiegare la leucopenia nell'infezione tifoide? L'ineguale ripartizione dei globuli bianchi nei diversi territori vasali, la chemiotassi negativa, l'azione inibitrice o paralizzante che una supposta tossina tifica eserciterebbe sul midollo osseo o su altri

organi ematopoietici, ecc. ecc. Ma se tutte queste ipotesi potevano apparire giustificate fino a poco fa, quando ancora la setticemia nel tifo era passata inavvertita, non hanno più ragione d'essere ora che ben noti sperimentatori quali Castellani, Schottmüller, ecc., hanno dimostrato la presenza quasi costante ed altri poi (Courmont, Busquet) sempre costante del bacillo di Eberth nel sangue dei tifosi.

E dacchè le nostre indagini in vitro hanno messo in evidenza quanto grande sia l'azione distruttiva di questo germe sui leucociti, sembra a noi non si possa più dubitare che la leucopenia in questa infezione sia legata alla presenza del bacillo nel sangue.

Il comportamento di questo germe nell'organismo è forse tale, che mentre provoca una grande disgregazione dei leucociti (favorito verisimilmente in quest'opera dalle temperature costantemente alte), non dà luogo che ad una produzione assai scarsa o nulla di sostanze atte a stimolare gli organi ematopoietici a maggiore produzione di cellule bianche.

La seconda parte dell'ipotesi di Arneth, vuole che l'iperleucocitosi sia opera soprattutto dei veleni batterici diffusi nel sangue. Ma è l'azione attribuita a codesti veleni in ogni caso immediata, diretta?

È certo razionale ritenere che le leucotossine esercitino un'azione diretta sui tessuti ematopoietici, azione che, in modica misura, si risolve in uno stimolo pei medesimi.

Ma all'infuori delle leucocidine vi sono altre tossine d'origine batterica (tossina difterica, ecc.) che in vitro si mostrano affatto inoffensive verso i globuli bianchi del sangue, mentre iniettate in circolo, per affermazione concorde di vari sperimentatori, danno alterazioni nel quadro ematologico ed iperleucocitosi.

Si deve adunque credere ad un comportamento diverso dentro i vasi e, nonostante il risultato negativo in vitro, ammettere che queste tossine esplicino un'azione sugli elementi figurati del sangue e sugli organi ematopoietici?

Nessun bisogno vediamo, per chiarire nei cennati casi il fenomeno della iperleucocitosi, di deviare le tossine, — aventi affinità specifica verso dati tessuti, — dalla loro mèta per dirigerle a danno dei globuli bianchi od a stimolo degli organi ematopoietici.

Lasciando che — conforme alla teoria di Ehrlich — le tossine, penetrate nell'organismo, vadano coi loro gruppi aptofori a collegarsi con quei tessuti, le cui cellule hanno i ricettori corrispondenti, volgiamoci piuttosto a considerare i prodotti di dissoluzione degli elementi lesi dal veleno.

L'azione che codesti prodotti di dissoluzione degli elementi danneggiati dalle tossine esercitano sugli altri elementi cellulari ancor integri del-

l'organismo costituisce un fattore finora poco o nulla valutato nella interpretazione dei fenomeni clinici, perchè l'attenzione era rivolta soprattutto ai veleni batterici.

A cominciare dal Pellacani potremmo citare una lunga serie di autori italiani e stranieri, che fecero oggetto dei loro studi l'azione degli estratti organici iniettati ad animali viventi, e le alterazioni che inducono nei tessuti. — Ne è risultato che, sebbene ottenuti da animali sani, tali estratti agiscono come veleni e provocano in genere negli elementi cellulari dei diversi organi dapprima fenomeni irritativi, che vengono sostituiti più tardi da fenomeni necrobiotici.

Buchner ha poi veduto che certi principi risultanti dalla distruzione dei tessuti o dalla trasformazione di albumine godono di proprietà chemiotattiche, e di egual proprietà godono le albumine stesse e gli estratti organici.

Questi fatti ci menano a credere che fattori diretti della iperleucocitosi susseguente alla diffusione delle tossine batteriche nell'organismo, sieno appunto i prodotti di disassimilazione e di disgregazione degli elementi offesi. — La iperleucocitosi è per noi conseguenza immediata dello stimolo che essi portano sugli organi ematopoietici, stimolo che è in rapporto teleologico col compito funzionale dei leucociti di allontanare dai tessuti i detriti delle cellule danneggiate.

Noi riassumiamo adunque le nostre idee nelle seguenti proposizioni: Nelle malattie infettive la iperleucocitosi è provocata prevalentemente dai prodotti di dissoluzione degli elementi cellulari offesi e necrotizzati; la ipoleucocitosi è opera dell'azione leucocidica diretta dei batteri ed è indice di batteriemia grave.

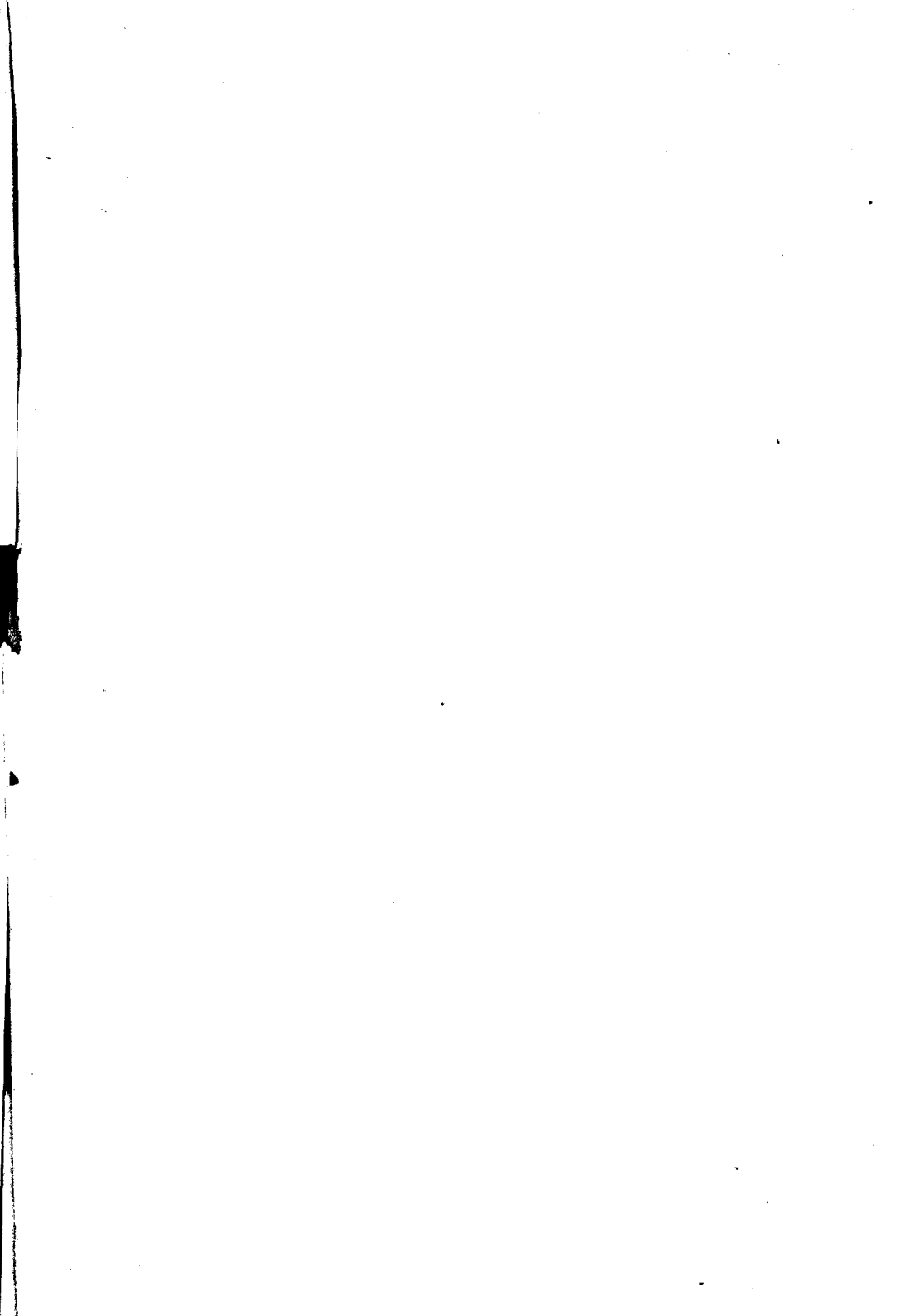
Su questi e su argomenti affini di non minore interesse ci proponiamo di ritornare con la scorta di più numerose ricerche.

Esprimiamo intanto la fiducia che le nuove vie da noi aperte allo studio di questi elementi cellulari, cui eminenti autori assegnano una posizione addirittura onnipotente fra gli organismi elementari del corpo, sien feconde di nuovi ed importanti frutti alla patologia delle infezioni, alla dottrina dell'immunità, ed, abbiamo motivo di crederlo, anche all'investigazione clinica.

*
* *

Al venerato maestro prof. Baccelli, che tanto benevolo interesse ha accordato alle nostre ricerche, ci sia lecito esprimere le nostre più vive grazie.





IL POLICLINICO

PERIODICO DI MEDICINA, CHIRURGIA E IGIENE

DIRETTO DAI PROFESSORI

GUIDO BACCELLI | FRANCESCO DURANTE

DIRETTORE DELLA R. CLINICA MEDICA
DI ROMA

DIRETTORE DEL R. ISTITUTO CHIRURGICO
DI ROMA

con la collaborazione di altri Clinici, Professori e Dottori italiani e stranieri

si pubblica in tre Sezioni distinte:

Medica — Chirurgica — Pratica

IL POLICLINICO
chirurgia e dell'igiene.

nella sua parte originale (Archivi) pubblica i lavori dei più distanti clinici e cultori delle scienze mediche, riccamente illustrati, sicché i lettori vi troveranno il riflesso di tutta l'attività italiana nel campo della medicina, della

LA SEZIONE PRATICA

che per sé stessa costituisce un periodico completo, contiene lavori originali d'indole pratica, note di medicina scientifica, note preventive e tiene i lettori al corrente di tutto il movimento delle scienze mediche in Italia e all'estero. Pubblica perciò numerose e accurate riviste su ogni ramo delle scienze suddette, occupandosi soprattutto di ciò che riguarda l'applicazione pratica. Tali riviste sono fatte da valenti specialisti.

Pubblica brevi ma sufficienti relazioni delle sedute di Accademie, Società e Congressi di Medicina, e di quanto si viene operando nei principali centri scientifici, speciali corrispondenze.

Non trascura di tenere informati i lettori delle scoperte ed applicazioni nuove, dei rimedi nuovi e nuovi metodi di cura, dei nuovi strumenti, ecc. ecc. Contiene anche un ricettario con le migliori e più recenti formule.

Pubblica articoli e quadri statistici intorno alla mortalità e alle malattie contagiose nelle principali città d'Italia, e dà notizie esatte sulle condizioni e sull'andamento dei principali ospedali.

Pubblica le disposizioni sanitarie emanate dal Ministero dell'Interno, potendo esserne informato immediatamente, e una scelta e accurata Giurisprudenza riguardante l'esercizio professionale.

Pubblica in una parte speciale tutte le notizie che possono interessare il ceto medico: Promozioni, Nomine, Concorsi, Esami, Condotte vacanti, ecc.

Tiene corrispondenza con tutti quegli abbonati che si rivolgeranno al *Policlinico* per questioni d'interesse scientifico, pratico e professionale.

A questo scopo dedica una rubrica speciale e fornisce tutte quelle informazioni e notizie che gli verranno richieste.

IL POLICLINICO contiene ogni volta accurate recensioni bibliografiche, e un indice di bibliografia medica, col titolo dei libri editi recentemente in Italia e fuori, e delle monografie contenute nei Bollettini delle Accademie e nei più accreditati periodici italiani ed esteri.

A questo proposito si invitano gli autori a mandare copia delle opere e delle monografie da loro pubblicate.

LE TRE SEZIONI DEL POLICLINICO adunque, per gli importanti lavori originali, numerose rubriche d'interesse pratico e professionale, sono i giornali di medicina e chirurgia più completi possibili e che meglio rispondono alle esigenze dei tempi moderni.

ABBONAMENTI ANNUI:

	Italia	Unione postale
1. Alla sezione medica e alla sezione pratica . . .	L. 15	20
2. Alla sezione chirurgica e alla sezione pratica »	15	20
3. Alle tre sezioni insieme	> 20	27
4. Alla sola sezione pratica	> 10	12.50

Un num. separato della sezione medica o chirurgica Lire UNA

Un num. separato della sezione pratica cent. 50.



Gli abbonamenti cominciano a decorrere dal primo di gennaio di ogni anno.

Il *Policlinico* si pubblica sei volte al mese.

La sezione medica e la sezione chirurgica si pubblicano ciascuna in fascicoli illustrati di 48 pagine, che in fine di anno formeranno due distinti volumi.

La sezione pratica si pubblica una volta la settimana in fascicoli di 32 pagine.