



Min. B. 39.5

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

L'AZIONE DEL SUOLO

SUI

GERMI DEL CARBONCHIO

STUDIO CRITICO-SPERIMENTALE

DEL

Dott. F. ROLANDO

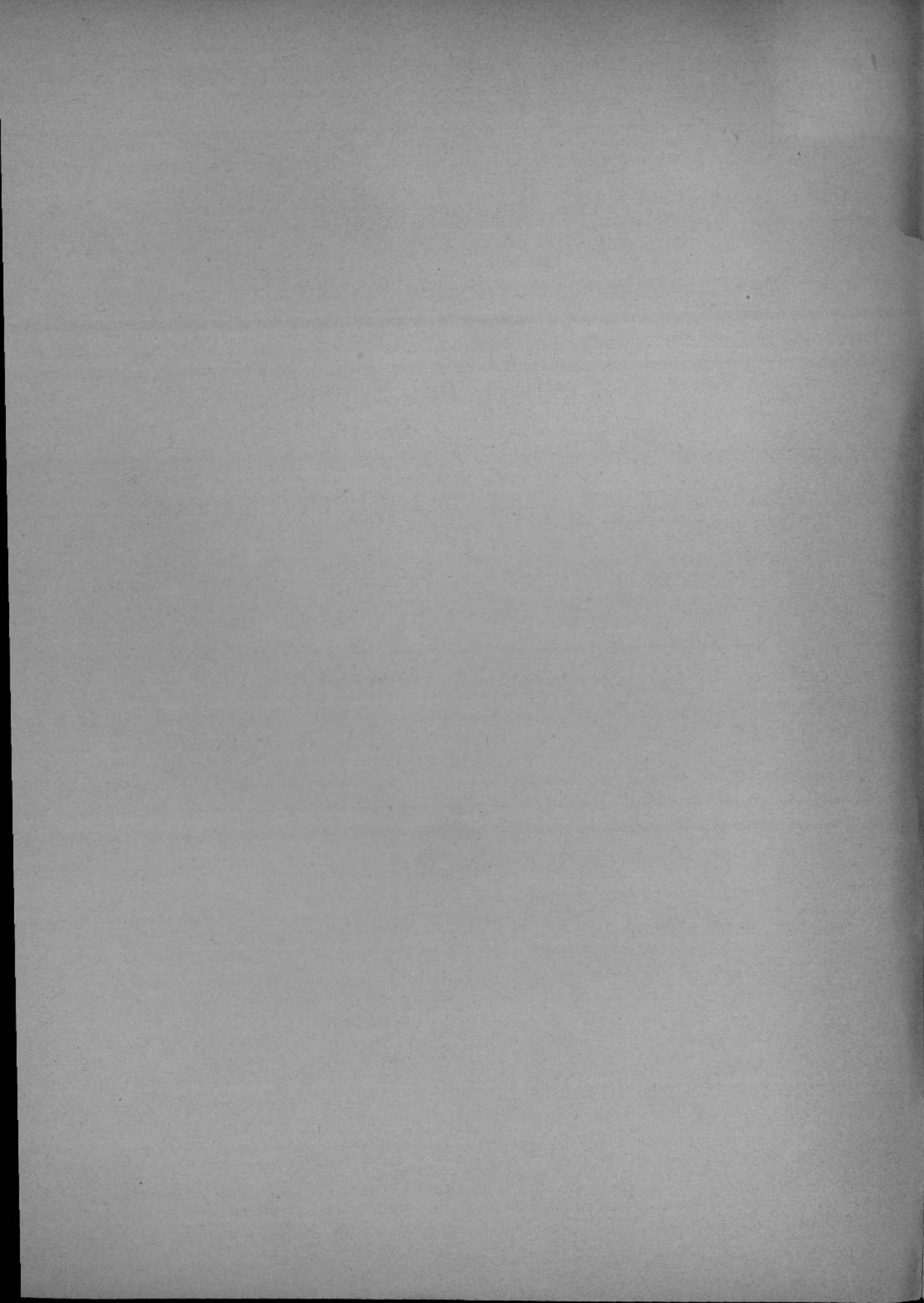
Assistente all'Istituto Vaccinogeno dello Stato



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1892



MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

L'AZIONE DEL SUOLO

SCI

GERMI DEL CARBONCHIO

STUDIO CRITICO-SPERIMENTALE

DEL

Dott. F. ROLANDO

Assistente all'Istituto Vaccinogeno dello Stato

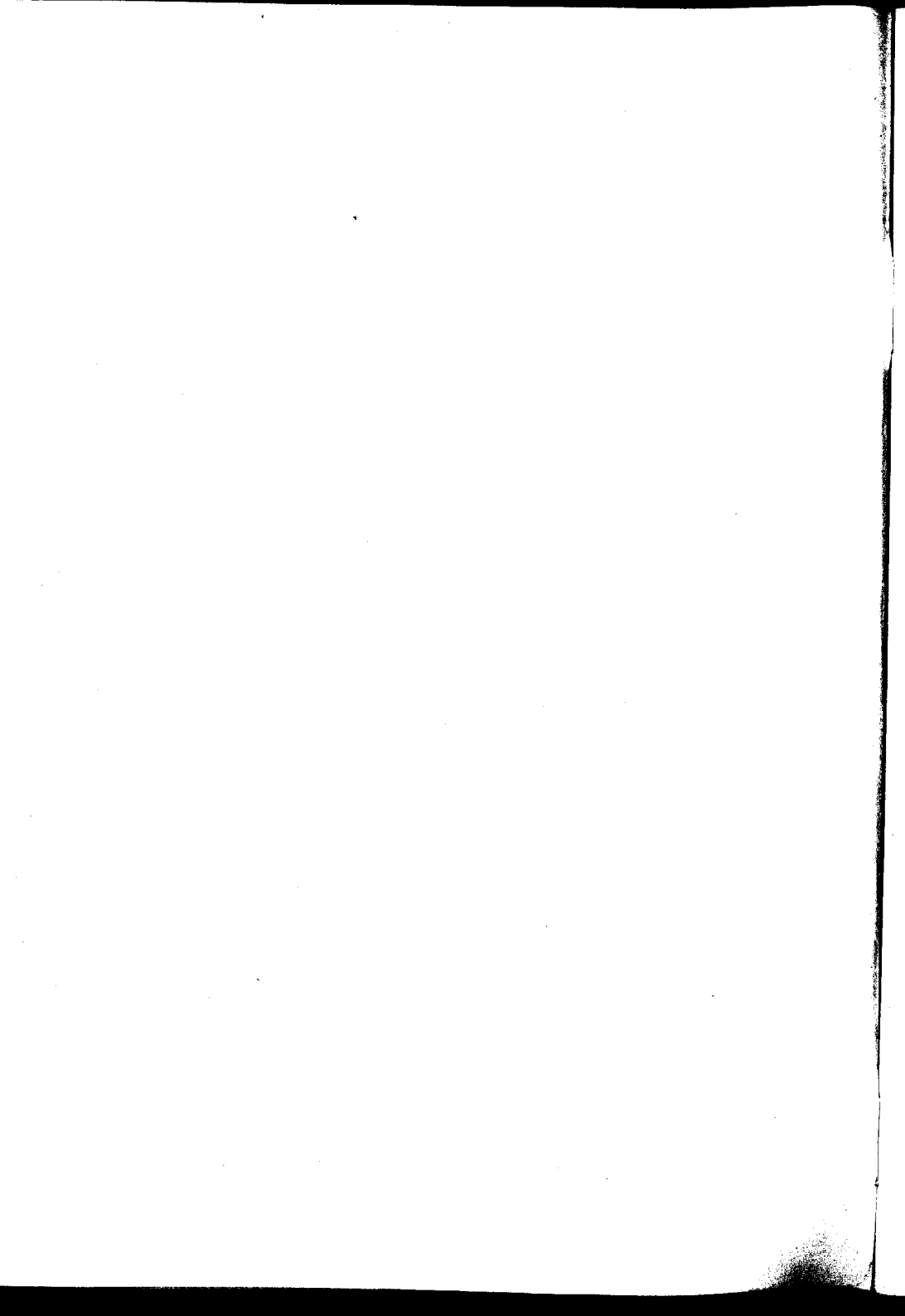


ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1892

11/11
11/11



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

L'azione del suolo sui germi del Carbonchio — Studio
critico-sperimentale del dott. F. ROLANDO, Assistente
all'Istituto vaccinogeno dello Stato.

Intorno alla azione del suolo sulla biologia del *Bacillus Anthracis* esistono ancora grandi dispareri. Dopo le ricerche iniziate da PASTEUR nel 1870 - e successivamente riprese, sia nella sua scuola, sia in altri centri di studi sperimentali - apparvero innumerevoli lavori originali su tale argomento, quali inneggianti, quali tendenti a demolire le opinioni dell'illustre Batteriologo francese.

Osservazioni ripetute da lunghi anni su le epizoozie di carbonchio ematico decorrenti in alcuni dipartimenti della Francia avevano attirata l'attenzione di PASTEUR su la spiegazione del fenomeno. Accadeva che greggi in condizioni pienamente fisiologiche, condotte al pascolo in alcune regioni ove da anni ricorrevano le epizoozie in parola, presto o tardi soggiacessero al morbo, sovente con perdite enormi di bestiame. Gli studi compiuti da PASTEUR su la contagiosità del carbonchio tra animali alimentati di trifoglio innaffiato di culture artificiali del germe, gli avevano fatto supporre per analogia che le perdite di bestiame nel dipartimento di Eure-et-Loir dipendessero appunto da inficiamento del materiale alimentare. Poiché, dunque, ogni altra sorgente d'infezione, ad un esame scrupoloso, non si poteva riconoscere; se ogni criterio scientifico ostava al concetto della generazione spontanea, bene a

FELTZ¹ riprese la questione impugnata da KOCH, per dimostrare quale fra le due scuole si fosse approssimata maggiormente al vero. Riproducendo gli esperimenti su vermi lasciati a lungo in un terreno bagnato da culture di carbonchio e sangue di animali carbonchiosi, constatò il contagio delle cavie inoculate col contenuto intestinale dei vermi. Confermò la possibilità di ricavare dalla stessa sorgente culture artificiali, nonchè l'esistenza di forme involutive del bacillo in parola con attenuazione della sua virulenza.

Un nuovo studio di PICTET e YUNG² intorno all'azione del freddo sui germi del carbonchio riuscì di piena conferma alle precitate osservazioni di FRISCH, e gettò nuovi dubbi sul comune convincimento di allora circa la deleteria influenza che su codesti germi doveva spiegare la temperatura bassa del suolo. Gli autori partendo dalla conoscenza della resistenza di parecchi germi ad una temperatura bassissima di -110° C. - ottenuta artificialmente mercè evaporazione di acido solforoso e protossido di azoto liquido per la durata di quattro ore continue, - vollero riprodurre gli esperimenti sul B. A. sporificato. Questo fu tenuto per la durata di 108 ore (quattro giorni e mezzo) ad un *minimum* di temperatura di -70° C. e poi per altre venti ore ad una temp. di -130° C. In seguito tali culture, rimesse all'autorevole revisione di ARLOING, mostravano di serbare pienissima virulenza senza aver subita alterazione morfologica di sorta.

Come era naturale l'opinione di KOCH impose ed è forse per questo che FLÜGGE³ affermò - mi pare poco ponderatamente - essere completamente inverosimile tutta la spiegazione eziologica data da PASTEUR alle epizoozie carbonchiose, e ciò perchè le carogne carbonchiose interrate a notevole profondità si trovano ad una temperatura bassa alla quale certamente il bac. ant. non può sporificare e quindi muore presto senza passare ad una forma di sviluppo durevole, cioè di spora. Che codesto modo di vedere del FLÜGGE non sia perfettamente consono alla realtà dei fatti ce lo dimostrano da una parte, le osservazioni in contrario rilevate dagli stessi discepoli di KOCH, dall'altra, il vedere che lo stesso Au-

¹ FELTZ: *C. R. Académie*, 1882.

² PICTET et YUNG: *C. R. Acad.*, 1884.

³ FLÜGGE: *I microorganismi*, Ed. Ital., 1889, Napoli.

tore ¹, in epoca più recente, riconosce che dalle esperienze moderne sul terreno e dai frequente reperto di spore negli strati superficiali di esso si può dedurre che, date le condizioni favorevoli allo sviluppo e alla nutrizione del bac. ant. nel terreno, questo microrganismo vi si moltiplica sporificando con significativa facilità.

Ritornando ora all'ordine cronologico, è degno di memoria l'interessante contributo di PERROSCITO ², il quale fece anche rilevare che tra le ragioni di diffusione del contagio è da annoverare l'usanza di trascinare per terra gli animali morti fino alla fossa, di modo che il cospargimento di sangue e di brandelli di tessuto implica la diffusione del germe nel suolo, ove rimarrebbe allo stato di spora anche per lunghi anni.

A SCHIRAKAMP ³ spetta il merito di aver dimostrato ancora la possibilità di coltivare il bac. ant. nel terreno di giardino sterile inumidito e tenuto alla temperatura di 18° C. senza alcun detrimento delle proprietà del microrganismo.

MARPMANN ⁴, da uno studio sperimentale apposito, ricavò che il bac. ant. si sviluppa bene nel terreno di giardino, nella sabbia ecc., purché innaffiati con urina o con altri liquidi contenenti sostanze saline.

Per opera di FELTZ ⁵ si hanno altre osservazioni sull'argomento. Egli baguò con sangue di animali rapidamente morti di carbonchio una certa quantità di terreno vegetale tenuto in una cassetta. Lasciò l'insieme esposto per tre anni alle influenze atmosferiche in un giardino. Ogni sei mesi inoculò ad alcune cavie dell'acqua di lavaggio di tale terreno, riscontrando per due anni costantemente una forma mortale di carbonchio. Solo dopo tre anni l'attenuazione del germe erasi resa affatto evidente.

Appartengono all'ordine di idee di PASTEUR altri studi. SOVKA ha nei suoi studi sul suolo riconosciuto pienamente che il terreno in determinate condizioni di umidità, di aerazione e di temperatura non solo permette la sporificazione del bac. ant., ma l'accelera sensibilmente.

¹ FLUGGE: *Trattato di Igiene*. Ed. Ital., 1860.

² PERROSCITO: *Il Carbonchio*, Torino, 1855.

³ SCHIRAKAMP: *Arch. f. Hyg.*, 1881.

⁴ MARPMANN: *Arch. f. Hyg.*, 1881.

⁵ FELTZ: *C. R. Acad.*, 1886.

BÖLLINGER¹ studiando le influenze meteorologiche sull'andamento del carbonchio nel ventennio 1863-1883, rilevò che il fastigio delle infezioni rispondeva:

1° a condizioni determinate di umidità o di proprietà paludose del terreno;

2° ad infezione precedente del suolo dal virus;

3° alla coincidenza di un aumento di temperatura e di umidità del suolo.

KITASATO² rilevò che alla profondità di $\frac{1}{2}$ -1 m. nel suolo il bac. ant. sporifica normalmente durante il mese di luglio. Nello stesso tempo estivo sarebbe alquanto più lento il suo sviluppo a 2 m. di profondità e si arresterebbe a 3 m. Secondo l'A. lo sviluppo si inizierebbe a 14° C.

FAZIO³ ha eseguite su questo argomento più serie di ricerche. Per la novità dei fatti riscontrati credo utile riassumerle e discuterle un po' largamente.

In un primo gruppo di ricerche l'A. ha prescelto il terreno di selva, tenuto in recipienti di creta di 48-52 cm. di altezza per un diametro massimo di 50-53 cm.: vi erano piantate delle ortaglie sul fogliame delle quali mensilmente versava delle culture di carbonchio o di tifo. Benchè queste esperienze servissero ad altre ricerche, l'A. utilizzò questo terreno, ove suppose fossero caduti dei germi delle culture, sia accidentalmente, sia per successivo lavaggio delle foglie nell'irrorarle. Con le solite norme, smossi con un cucchiaino gli strati superficiali del terreno, mercè speciale pipetta metallica, egli prendeva saggi alla profondità di alcuni cm. Codesti saggi erano gettati in flacons di Erlenmayer, contenenti acqua sterile, e con l'agitamento ne otteneva una sospensione finissima. Lasciava *il tutto in riposo per tempo vario, tra $\frac{1}{2}$ - 1-2-3 ore*, dopo di che faceva *semine* — in gelatina nutritiva — dall'acqua di sospensione, in speciali fiale piatte. Da queste fiale praticava passaggi in altre simili. Dall'acqua stessa faceva *semine* in brodo cui *manteneva a 37° C. per ventiquattro a quarantotto ore*, e di qui faceva passaggi nella gelatina contenuta in fiale piatte. Contemporaneamente innestava con questo brodo 4 cavie e 3 conigli, alle

¹ BÖLLINGER: *Milzbrand Repert.*, 1888.

² KITASATO: *Zeitsch. f. Hyg.*, Bd. VIII, 1890.

³ FAZIO: *Rivista internaz. d'igiene*, II, 3, 4, 5, 6.

prime inoculando $\frac{1}{2}$ cmc. di cultura, ai secondi 2 cmc. (pag. 12). Al secondo giorno della semina, dentro le prime fiale, tutto il terreno nutritivo era già invaso da colonie e la gelatina *mandava odore di salamota*.

Gli animali si mantenevano sani. Nelle semine di secondo e terzo passaggio si trovavano delle colonie *dall'aspetto grossolano simile a muffe*. Ma più attentamente osservate, esse risultavano di ciuffetti aventi un nucleo od addensamento centrale, da cui si dipartivano numerosissime ramescenze a raggi serpeggianti, color giallettocenerino, che si terminavano in fiocchi nella gelatina, tali da dare alla colonia l'aspetto di teste arruffate di Medusa (pag. 14): osservati a piccoli ingrandimenti quei ciuffetti presentavano una organizzazione assai complicata. Vi si notava un tronco o grosso nodo centrale da cui si dipartivano a raggio dei rami primari, e da questi altri rami secondari e terziari, i quali, dicotomizzandosi all'infinito in ramescenze e trabecole sottilissime, finivano col formare una intricatissima rete avviluppante le anzidette ramificazioni, in modo da presentare all'occhio l'aspetto di un fitto e rigoglioso cespuglio, assai somigliante a quello che si nota in un periodo più avanzato delle colonie sviluppate di carbonchio virulento.

Al quinto giorno soltanto l'A. praticava i primi isolamenti (pag. 15) da queste colonie descritte, facendo semine in brodo e in *piastre* di gelatina, tenendo il primo a 37° C., la seconda a 20° C.

Contemporaneamente fece innesti di terreno in saccocchie sottocutanee di conigli e cavie, e innesti di *gelatina già liquefatta nelle fiale* su conigli, cavie e topi.

Due giorni dopo un coniglio degli ultimi citati morì senza mostrare bacilli nel sangue. Ripetendo innesti su topi ebbe delle morti che *per assenza di reperto positivo egli attribuì a setticemia*.

In un secondo gruppo di esperimenti, *condotti come per lo innanzi*, l'A. isola una forma di carbonchio sospetto le cui infiltrazioni in gelatina hanno barbe caratteristiche. Una volta ottenuto puro questo microrganismo, l'A. fece ripetute inoculazioni sulle solite specie di animali senza mai avere morti di carbonchio. Una cavia morì, ma offrendo tutto il reperto della tubercolosi zoogleica: altri animali sopravvissuti, *dopo 12 giorni da questa prima inocolazione furono sottoposti ad inocolazione di bac. ant. vi-*

rulentissimo, cui soccombettero con forma necroscopica caratteristica. Dunque - conclude l'A. - gli animali non erano vaccinati.

Il terzo gruppo di osservazioni comprende esami di controllo, e culture fatte in mezzi vari - quali l'alcool a 40° e l'alcool assoluto - in cui il suo microrganismo subiva uno sviluppo rachitico. Fu adoperato anche dell'agar - *in quattro tubi* - ove si svilupparono colonie superficiali lattescenti, *che non fondono l'agar* (lav. cit. pag. 19). Fatte delle culture nel vuoto l'A. trova che il microbo non vi si sviluppa, ma ha assoluto bisogno del ritorno dell'aria. Sull'influenza della temperatura l'A. dice che il carbonchio sospetto si sviluppa a preferenza tra 30° e 37° C. in 24-36 ore. Il suo sviluppo è lento tra 16° e 22° C., lentissimo o assente tra 10° e 12° C.

Eseguido esperimenti di controllo col carbonchio virulento nei comuni mezzi nutritivi, l'A. rileva piena analogia fra le due varietà microbiche, perfetta omogeneità di forma, salvo un maggior rigoglio e più rapido nel così detto carbonchio sospetto. La prima parte della monografia termina concludendo: che il carbonchio sospetto non è se non il virulento primitivo che ha subito, nel nuovo ambiente di vita, modificazioni di sviluppo e perdita della virulenza. Ritiene l'A. che questo suo carbonchio sia lo stesso di un microrganismo studiato da HÜPPE e WOOD nel terreno ¹, con la differenza che mentre questi ultimi trovarono nel loro bacillo proprietà vaccinali premuntorie contro il bac. ant. virulento, il Prof. Fazio non solo non ha constatato codesta proprietà, ma *ha infruttuosamente tentato di riattivare la virulenza del suo carbonchio*.

Nella seconda serie di ricerche (pag. 23 e seg.) gli esperimenti sono caduti sul terreno di tre anni innanzi. I risultati concordano con quelli riportati. Altre osservazioni sono relative a saggi di terreno della R. Scuola veterinaria di Napoli, presi da fosse destinate all'interro di carogne carbonchiose. L'A. anche da queste ricerche viene ad analoghe conclusioni, dopo *aver seguito il solito procedimento sperimentale* (pag. 23 e seg.). Altre osservazioni fatte su saggi di acqua dell'aquedotto di Serino presi alle sorgenti gli permisero di constatare anche in essa il suddetto carbonchio

¹ Hüppe e Wood: *Elln. Wochenschr.* 1859

sospetto. Sperimentò anche su terreno sterile ove sepelli carogne carbonchiose: il terreno ogni giorno veniva irrorato con acqua sterile. Dopo due mesi di questo trattamento l'A. raccolse dell'acqua di lavaggio di tale terreno e *colta solita tecnica* fece innesti e semine: queste ultime diedero la nota forma di carbonchio non virulento, gli innesti riuscirono negativi, salvo qualche cavia morta di tubercolosi zooglica. Di qui la deduzione dell'Autore che già due mesi di permanenza del bac. ant. nel terreno bastino a destituirlo d'ogni proprietà patogena.

Segue poi un gruppo di tentativi consistenti nell'alimentare i conigli con erbe *miste a cardi selvatici, frammenti solidi di vetro, aghi, spilli, ed altri mezzi pungenti o taglienti* dentro gabbie fermate sui vasi contenenti terreno carbonchioso: altri animali furono tenuti chiusi nella scatola in cui erano state interrate cavie morte di carbonchio L'A. ci apprende che nessuno degli animali così trattati ebbe a morire. Da queste ricerche L'A. conchiude (pag. 31) che il germe del carbonchio soggiornando per un tempo relativamente breve (due mesi) nel terreno, subisce fasi d'involutione *consistenti in modalità di sviluppo e perdita di virulenza*. Pertanto il tipo caratteristico del bacillo in tutte le fasi d'involutione resta immutato nella sua forma caratteristica, come provasi coi soliti metodi di colorazione; solo perde in *resistenza* dopo lungo soggiorno nel suolo, e *sporifica rapidamente*. Il fatto dunque stabilito da Pasteur, e riconosciuto dalla maggioranza degli sperimentatori, che i germi del carbonchio serbano per un periodo indeterminato - nella forma durevole - la virulenza in modo che, trovate le condizioni propizie di sviluppo (come nel corpo di certi animali da pascolo e da esperimento), sono pronti a svilupparsi ed atti a comunicare il carbonchio non solo dopo dei mesi di soggiorno nel suolo, ma dopo degli anni (2-3-12), non risulta dai ripetuti esperimenti di FAZIO, in base ai quali egli nega ogni influenza contagiosa ai germi del carbonchio antecedentemente capitati nel suolo riferendo le diffusioni epizootiche al trasporto diretto del virus da animali infermi tenuti fra il resto sano dei greggi. Dal suo punto di considerazione l'A. nega ogni pericolo alle regioni da pascolo ove s'interrarono carogne carbonchiose, e fonda ogni misura profilattica sulla vigilanza del bestiame vivo, con visita quotidiana (!) distruggendo col fuoco i cadaveri carbonchiosi.

Da quanto ho esposto fin qui si può rilevare come l'interpretazione data ai fatti da PASTEUR, dopo di avere incontrata ostile accoglienza, in Germania specialmente, abbia, in seguito, subita una fase nuova, in cui, per opera di alcuni ricercatori appartenenti anche alla scuola tedesca, si sono apportati risultati sperimentali tali da attenuare e per fino combattere la primitiva opposizione spiegata alla scuola francese, fino a che per le citate ricerche del Prof. E. FAZIO tutto il complesso di studi anteriori venne vigorosamente disfatto.

Mi sia pertanto concesso di porre in rilievo - secondo le mie impressioni - le mende del lavoro del Prof. E. FAZIO, affinché al tempo stesso risulti giustificato il metodo di investigazione da me seguito, e le conclusioni a cui fui condotto:

Il concetto generale derivante a parer mio dalla lettura della monografia di FAZIO si è che mentre PASTEUR parti - nei su i studi - da un fatto puramente naturale, da una condizione di cose così come si trovano in terreni ove vissero e poi furono sepolti animali carbonchiosi, in un suolo sottoposto ad una folla di fattori cosmici e meteorologici importantissimi, - L'A. si è invece creato un condizionamento sperimentale assolutamente diverso e troppo artificioso così che, date differenze così marcate tra l'uno e l'altro caso, sarebbero senz'altro giustificabili le divergenze, anche ammesso che L'A. si sia studiato per tutto l'accessorio di mettersi in condizioni analoghe a quelle di PASTEUR. Si aggiunga che mentre PASTEUR studiò germi venuti su dalla profondità del suolo, trasportati per vario meccanismo alla superficie e tenuti evidentemente, almeno per un certo tempo, fuori dell'influsso delle forze fisiche attenuatrici, quali la luce, il calorico raggiante ecc. - il FAZIO ha proceduto a rovescio, versando i germi in uno strato superficiale di terreno, ove essi non potevano sottrarsi alle suddette influenze; senza dire che essendo i vasi da lui adoperati coltivati ad ortaglie, in maniera non rapportabile al caso naturale dei terreni da pascolo vastissimi in confronto della vegetazione da essi alimentata, sorge altresì il sospetto che il terreno del nostro A. si per la spopolata aspirazione di liquidi, si per l'evaporazione di

essi, siasi trovato in condizioni di umidità, di temperatura ecc. anche più sfavorevoli ai germi disseminativi. Poniamo dunque che seguendo la via tenuta dall'A. si giunga precisamente alle sue conclusioni: ciò non autorizzerà (mi pare) ad infirmare le idee di Pasteur generate da uno sviluppo logico differente ma - tutto al più - ad affermare che il mutamento di terreno nutritivo valga ad esercitare sui germi modificazioni biologiche.

Fazio, dopo aver raccolto i saggi di terreno, li ha diluiti nell'acqua distillata entro flacons di Erlenmayer, e di qui ha fatto semine in gelatina nelle fiale piatte. È noto come il FRÄNCKEL abbia per primo criticato questo metodo di BEÜMER, e dopo di lui lo abbia fatto anche REIMERS ¹ ed il dott. MANFREDI (nota alla traduzione della Guida per le ricerche igieniche di Hemmerich e Trillich), dimostrando che piastre provenienti da una stessa sospensione di terreno diedero risultati non concordi, probabilmente per la rapida sedimentazione a cui vanno incontro i germi sospesi in liquidi frammezzo a particelle solide, o, forse, per la difficoltà presentata dai germi stessi a disgregarsi dai granuli di terreno a cui si trovano aderenti. L'A. avrebbe potuto - più rigorosamente - attenersi, in ricerche così delicate in cui si tratta di isolare un germe in mezzo a tanti altri, ai metodi più corretti indicati da Fränckel, Reimers o da Emmerich. Tuttavia, passi pure l'aver seguita la tecnica imperfetta di Beümer, ma certo vi è da rimaner sorpresi alla lettura della monografia in esame, quando si rileva che l'A., dopo aver agitato il terreno in acqua, lasciava il tutto in riposo per $1\frac{1}{2}$ - 1-2-3 ore, dopo di che faceva le semine del liquido inquinato. Il mio senso di meraviglia si origina da due cause. Innanzi tutto, se la scienza trova criticabile il metodo in sé perché già dopo alcuni minuti la sedimentazione dei germi diventa causa di errore, immaginarsi dopo un elasso così lungo quanto più sfavorevoli ne debbono essere le condizioni! D'altra parte l'A. ha lasciato per quel tempo che un numero di germi stragrande pullulasse, rendendo inevitabilmente più difficile l'isolamento della specie m'robica di cui si aveva interesse di studio. Che ciò sia necessariamente accaduto lo deduciamo, sia dalle generali cognizioni intorno alla sorprendente rapidità di sviluppo di forme elementari simili in analoghe

¹ REIMERS: *Zeitschr. f. Hyg.*, 1887-1889.

condizioni, sia anche da quel che ci dice lo stesso A., cioè, che malgrado numerose diluzioni delle prime semine si riscontrava sempre nelle fiale un numero grandissimo di colonie. L'A. si è servito delle fiale piatte per le colture in gelatina, dicendole assai preferibili alle comuni lastre di Koch e alle stesse camere di Petri. Lasciamo stare quella speciale simpatia che spesso può conquistarci, anche nell'uso di alcuni oggetti di tecnica, in paragone di altri: io faccio notare che le suddette fiale piatte sono ben lungi dal rappresentare quanto vi è di meglio nel genere. La loro costruzione essendo non facile (a quanto afferma lo stesso fabbricante Puteand di Napoli) succede ben di rado che le pareti siano convenientemente lisce e sottili; sovente nella loro spessezza restano incluse bolle d'aria, le quali disturbano sensibilmente l'osservazione delle colonie allorchè si osservano coi deboli ingrandimenti del microscopio. Si aggiunga che la pesca per l'isolamento riesce stentata, e l'isolamento stesso ben ardua cosa a chi, specialmente, si metta nelle condizioni dell'Autore, di aver da far cioè con delle semine — benchè molto frazionate — pullulanti tuttavia dei più svariati germi, e già dopo qualche giorno del loro sviluppo. Si rifletta ancora che nell'uso di codeste fiale, coi deboli ingrandimenti è mestieri rivolgere all'obbiettivo la parete ove trovasi distesa la gelatina, e attraverso di essa osservare le colonie. Ora, se per poco si tratti di colonie fondenti, la gelatina fusa, spandendosi, impedisce una esatta osservazione. Se poi lo strato nutritivo non è sottilissimo potrà accadere che più colonie — diverse tra loro — siansi sviluppati lungo la stessa linea perpendicolare all'occhio, ma in piani differenti, e quindi a differente distanza focale, in modo che procedendo all'isolamento, mentre l'occhio fissa una colonia perfettamente a foco, può benissimo accadere che l'ago di platino raccolga una colonia che non ha nulla da fare con la prima. E, secondo questa stessa ipotesi, può andar spiegata anche la possibilità che colonie così sovrapposte, e di differente estensione, siano giudicate come unica colonia avente un addensamento centrale di un aspetto, ed un irraggiamento periferico diverso. Laonde, senza aver la pretesa di annunciare una novità, mi pare giusto riconoscere coi più la grande superiorità delle piastre di Koch e delle camere di Petri.

A quale idea siasi informato l'A. allorquando dalle sospensioni

più volte citate del terreno, fece direttamente innesti in brodo, cui portò - e tenne per più giorni - a 37° C., io non saprei dire. Né saprei affermare che il germe carbonchioso si sia trovato in favorevoli condizioni di vita in mezzo agli altri infiniti germi durante *ventiquattro a quarantotto* ore. Che ciò abbia, se non altro, potuto avere una influenza debilitante si può argomentarlo sia dalle generali conoscenze sul proposito, sia, per analogia, degli studi di CHARRIN e GUIGNARD¹ i quali dimostrarono che il bac. ant. coltivato in presenza del bac. pyocianeus, finisce per subirne gravi alterazioni morfologiche involutive, con notevole attenuazione o completa perdita di virulenza.

Il procedere, come l'A. ha fatto, praticando semine da queste culture impure di brodo, in gelatina - dopo 48 ore - nell'intento di eseguire isolamenti, è una maniera di tecnica dissenziente da ogni rigorosa norma batteriologica, poichè è noto, dai più comuni manuali la necessità di tentare gli isolamenti da terreni solidi, inquinati, quanto più direttamente è possibile dal materiale in esame.

I primi isolamenti fatti dall'Autore da fiale piatte di gelatina accaddero verso il *quinto* giorno dalla semina di cui è detto innanzi. L'Autore stesso nota che un numero straordinario di colonie erasi sviluppato, e la gelatina, già in parte fusa, tramandava disgustoso odore di salamoia.

Se si ricorda quel che abbiamo detto a proposito della difficoltà relativa di fare isolamenti dalle fiale; se si aggiungono le condizioni di diffuso sviluppo di svariati germi, nonchè lo stato di fusione e putrefazione della gelatina; se si tien conto che l'elasso di cinque giorni - dalla semina allo isolamento - è di gran lunga superiore al necessario per l'isolamento del comune bac. ant., si converrà che è assolutamente incomprensibile una così lunga attesa, mentre l'A. caratterizza il suo carbonchio sospetto come fornito di sviluppo assai più rapido del virulento. Né si potrà respingere il dubbio che l'isolamento del bac. ant. sia riuscito probabilmente illusorio. Nelle condizioni citate, affatto sfavorevoli, niente di più possibile che una ipotesi: cioè, che, tentando un isolamento da qualche colonia di aspetto caratteristico del carbonchio, la quale (essendo

¹ CHARRIN et GUIGNARD: *C. R. Acad.* 1899.

- ripeto - passati ben cinque giorni dalla semina) per mantenersi tale, è necessario siasi trovata negli strati più profondi della gelatina, ancor solida, e più prossima alla parete della fiala - niente di più possibile, dico, che, inavvedutamente, frammezzo a tanta scomposizione della gelatina, il filo di platino siasi inquinato di ben altro che di carbonchio.

La descrizione fatta dall'A. delle colonie del suo carbonchio, riportata già più innanzi, m'avvalora nel dubbio di codesto isolamento frainteso. Egli ci parla di un centro o nucleo della colonia, rassomigliante al convoluto carbonchioso, e di una periferia fatta di raggi e numerose ramificazioni dicotomiche. La descrizione e le tavole annesse depongono assolutamente per l'isolamento del radiceforme anzi che del carbonchio.

Mi è occorso, spesso, durante le mie esperienze di vedere in piastre di agar - di terreno inquinato - delle forme che avevano una lontana parvenza di colonie uniche di carbonchio, ma che, ad un più attento esame, risultavano di due colonie coincidenti, con sottile intermezzo di sostanza nutritiva, nelle quali ho riconosciuto il carbonchio al centro ed alla voluta periferia il bac. mycoide di Flügge, abbondantissimo sempre nelle piastre dal terreno.

Il sospetto che le colonie generatesi da codesti isolamenti del carbonchio siano rimaste inquinate, diviene ancor più insistente alla lettura che gli innesti ripetuti in animali dalla gelatina di nuovo passaggio furono seguiti alcune volte da morte per setticemia, specialmente dei topi.

L'assenza di bacilli in preparati dal sangue, fa sì che l'A. negli la morte da carbonchio. Dopo ciò che ho rilevato innanzi sul procedimento delle ricerche, io sono proclive ad ammettere che la morte non sia stata provocata dal bac. ant. Ma mi pare anche che non sia punto giusto accettare una diagnosi negativa fondata esclusivamente sul criterio dell'assenza di germi nel sangue.

Appartengono al comune còrredo di cognizioni mediche non pochi casi di carbonchio umano, ove il reperto batteriologico, spcialmente del sangue, risultò negativo in mani sperimentate alla ricerca. Ma, arrestandomi in un campo più sperimentale, ricordo che FOKKER¹ ebbe già a constatare l'assenza di bacilli in casi

¹ FOKKER: *Centr. für die Mediz. Wiss.*, 1881.

non dubbi di carbonchio, ed attribui il fatto ad un possibile precoce spezzettamento di essi.

Più tardi KARG¹ riferì di un caso di carbonchio in cui l'assenza completa di bacilli nel sangue contrastava con l'abbondanza di essi nei preparati istologici.

Da un recente ed interessante lavoro di PHYSALIX² si rileva, come si vedrà meglio più oltre, che esistono appunto forme di infezione carbonchiosa in cui il bacillo è costantemente assente dal sangue.

D'altra parte, poichè l'A. non fa allusione alcuna alla data della necropsopia, bisogna ricordare che, fin dalle sue classiche esperienze, PASTEUR³ aveva messo in guardia gli osservatori contro la negatività del reperto bacillare del sangue, dovuto appunto al lungo elasso del tempo trascorso dalla morte fino all'autopsia, nel qual tempo, coll'avanzarsi della putrefazione, numerosi germi dallo intestino e da altri organi, pervengono nel sangue e contrastano vivamente l'esistenza delle forme bacillari del carbonchio. Io non so perchè l'A. non abbia concentrata la propria attenzione alla milza, atrio ricettore dei virus, e di quello carbonchioso per eccellenza. A sostegno del significato attribuito al reperto splenico, vi è non solo una pleiade di osservazioni e di necropsopie, ma anche nuove indirette dimostrazioni sperimentali. È noto dagli studi di KURLOW⁴ e di BARDACH⁵ che negli animali smilzati, l'infezione carbonchiosa procede più rapidamente letale, appunto, a quanto pare, per la mancante influenza ricettrice della milza.

In assenza di ogni altro reperto positivo, l'A. avrebbe potuto ricavare qualche dato importante istituendo delle ricerche sui gangli linfatici più prossimi alla sede dell'inoculazione, dove, come sperimentalmente dimostrarono COLIN, RODET ed altri fino a PHYSALIX, i germi del carbonchio sogliono arrestarsi come in una prima stazione di arrivo.

Ad ogni modo, il fatto, che gli animali *morti o vivi* al momento della osservazione non mostravano traccia indiscutibile di carbonchio, non basta a far negare ogni proprietà virulenta al bac. ant. studiato. A parer mio in simile congiuntura bisogna porsi un

¹ KARG: *Fortschr. d. Mediz.* 1888.

² PHYSALIX: *Arch. de Medie. Exp.* 1897.

³ Op. cit. di CAMBERLAND.

⁴ KURLOW: *Arch. für Hyg.* 1889.

⁵ BARDACH: *Ann. Pasteur.* 1889.

duplice quesito: 1° se la morte di un gruppo di animali non sia dovuta - indipendentemente dalla conservata virulenza del carbonchio - ad un' altra infezione intercorrente con evoluzione più rapidamente letale della prima; 2° se la vita degli altri gruppi di animali inoculati non possa essere compatibile con l'esistenza di una infezione carbonchiosa, ancor latente, a decorso più lento o lentissimo, la quale raggiungerebbe il suo fastigio in un' epoca tardiva, in cui non si pensa nemmeno più agli animali giudicati sani fin da qualche giorno dopo l'inoculazione.

A base di questa maniera di vedere stanno le conoscenze odierne sulla patologia di alcune infezioni, nonchè studi sul carbonchio.

Fin dal 1878 COLIN ¹ studiando lo sviluppo successivo di focolai virulenti durante il periodo d' incubazione della malattia carbonchiosa, fece notare che questa infezione fa sosta nelle glandole prossimiori alla catena linfatica ove fu inoculato il virus; le quali glandole, ancorchè non si constati una infezione generale, mostrano sempre tutti i caratteri di focolaio d'infezione che va rendendosi sempre più virulento, e rappresenta il punto di partenza e di diffusione per l'organismo animale cui appartiene. Alcuni anni dopo DI MATTEI ² ci diede la descrizione di un caso di evoluzione carbonchiosa lenta in un topo femmina. Sottoposto all'inoculazione di bac. ant. virulento l'animale resistette per circa otto giorni ma in notevole grado di prostrazione; si riebbe e al quindicesimo giorno diede alla luce sei piccoli. Sembrava in pieno stato di guarigione quando morì rapidamente al 48° giorno. La necropsopia dimostrò ascessi multipli nel corpo, dai quali si ricavarono culture di *staphilococcus aureus*; mentre il fegato e la milza avevano noduli grigiastri, da cui, fatte semine in piastre nutritive, si ebbero caratteristiche colonie di bac. ant. Di qui successivamente facendo isolamenti, passaggi ed innesti in ratti, essi morirono di carbonchio a decorso normale. DI MATTEI attribuì il rallentamento dei primi effetti nell'incubazione del carbonchio, alla presenza accidentale dello *staphilococcus* ³. Rappresentano, inoltre, forte suggello a codeste conoscenze le ultime citate ricerche

¹ COLIN: *Bull. Acad. Med.*

² DI MATTEI: *Rif. Med.*, 1888.

³ Questa opinione è confermata sperimentalmente dagli studi di PAULOWSKY (V. Cornil e Babe: III. Ediz. pag. 215-217).

di *PHYSALIX*¹, il quale, appunto ha osservato che tra le forme virulenti del bac. ant. e quelle assolutamente innocue, esistono forme intermedie, il cui bacillo assume la proprietà d'indurre una malattia ad evoluzione lenta e tale che i caratteri morbosi della infezione si modificano profondamente. In tali casi il bacillo anzichè moltiplicarsi nel sangue e nei visceri, si sofferma nel ganglio più prossimo al punto di inocolazione e può rimanervi localizzato per la durata di *venti giorni a due mesi*, dopo di che improvvisamente l'animale muore, e mentre il bacillo manca nel sangue e nei visceri, lo si trova nel suddetto ganglio, dal quale sarà possibile ottenere culture nette di bac. ant. *PHYSALIX* ritiene che, nel lungo soggiorno nel ganglio, il bacillo riacquisti quel che aveva perduto della sua virulenza. E l'assenza di bacilli nel sangue sarebbe soltanto apparente e dovuta ad uno spezzettamento in forma di cocci. Insomma, ad intervallo di alcuni anni, noi vediamo qui riconfermata la spiegazione innanzi citata di *FÖKKER*.

Negata ogni virulenza del germe, *FAZIO* ha ricercato se questo germe avesse o pur no proprietà vaccinali, arrivando alla conclusione che in esso il potere vaccinale è nullo. Per arrivare a questo *Egli* ci dice che dodici giorni dopo l'inoculazione del suo carbonchio sospetto, ha sottoposti i medesimi animali ad inoculazioni di carbonchio virulento e questi ne sono morti.

PERRONCITO ha illustrato un caso interessante da lui osservato: Si tratta di un montone il quale dopo aver subito una sola infezione preventiva fu ripetutamente inoculato con culture pure e virulentissime di bacilli e spore di bac. ant. L'animale non ne soffrì punto: anzi, ucciso quattro giorni dopo l'ultima inoculazione, non presentò al più minuto esame alcuna traccia di microrganismi specifici negli organi; nè si poté con materiale fresco levato dal cadavere infettare i comuni animali reattivi del carbonchio.

Ma non si può in alcun modo - per analogia ai fatti testè citati - giustificare l'opinione del prof. *FAZIO* che una sola infezione di una cultura da lui riconosciuta attenuatissima potesse dimostrare il potere vaccinale della cultura stessa. Infatti, il caso osservato da *PERRONCITO* è così raro, è così inesplicabile come mai tante spore e tanti bacilli siano stati eliminati o distrutti, che non si può ele-

¹ *PHYSALIX*: *Arch. de Med. Exp.* 1891.

vare a dogma un evento altrettanto raro quanto felice. Sono noti a tutti gli insuccessi che minacciavano di far naufragare in sul nascere la geniale scoperta di Pasteur malgrado le sue indicazioni di incominciare le vaccinazioni col vaccino debole, e di rinforzarle dopo parecchi giorni col vaccino più forte. Accadeva sovente che la immunità non si otteneva malgrado la più fedele esecuzione delle indicazioni di Pasteur (BASSI: *Le vaccinazioni carbonchiose*. Conferenza tenuta all'Istituto veterinario di Torino), e gli animali, malgrado la vaccinazione, morivano come prima di carbonchio spontaneo o di carbonchio sperimentale. Pasteur, attribuendo tali insuccessi al fatto che due inoculazioni non fossero sufficienti, diramò una circolare agli agricoltori, nella quale li invitava - appena si manifestasse tra gli animali vaccinati qualche morte di carbonchio spontaneo - a rivaccinare con un nuovo liquido che sarebbe fornito gratuitamente. E Pasteur stesso scriveva al prof. PERRONCITO di non limitarsi a due inoculazioni, ma di praticarne tre, la terza con un liquido più forte: il che avendo eseguito il Perroncito, ne ebbe un pieno successo. Come dunque poteva ottenere Fazio risultato positivo da una sola inoculazione (se - molte volte - riuscivano infruttuose due eseguite con liquidi gradualmente più forti) e per di più sperimentando le proprietà vaccinale del suo germe su alcuni animali così poco appropriati a tale scopo, come cavie e topi, nei quali ¹ la vaccinazione carbonchiosa è estremamente difficile - anche con liquidi rigorosamente attenuati e studiati - e nei quali la vaccinazione può bensì indurre un ritardo nell'infezione carbonchiosa, ma non preservarli da essa?

Inoltre, l'immunità contro il carbonchio - artificialmente raggiunta secondo i precetti di Pasteur - richiede un procedimento per gradi inoculando successivamente virus d'attività crescente, imperocchè, è un fatto noto anche ai profani che, se al primo vaccino attenuatissimo si fa seguire l'iniezione del germe virulentissimo, l'animale soccomberà certamente.

Si adattano al caso le parole di KOCH ²: *L'inoculazione preventiva s'imballe in due scogli: se il vaccino è troppo forte, può di per sé stesso generare un carbonchio mortale: se il vaccino è troppo debole riesce inutile.*

¹ CORNIL BASSI: *Les Bacteries*. 3^a Ediz., pag. 210-218.

² KOCH: *Risposta al discorso di Pasteur a Ginevra*, 1883.

Vi è poi un'altra considerazione cui l'A. non pone mente. Egli ci afferma un elevamento di temperatura in quasi tutti gli animali inoculati del suo carbonchio sospetto. Senza entrare nella complessa questione della patologia della temperatura organica, poichè l'innalzamento della temperatura seguiva alle iniezioni, mi viene spontaneo un dilemma: o le iniezioni erano di culture inquinato ed allora ogni discussione cade, o erano di carbonchio puro ed allora il fenomeno della febbre, per quanto lieve, è l'indizio migliore di una esistente capacità vaccinate di codesto germe attenuato. Un osservatore noto quale è GAMALEIA¹ ci ha appreso sperimentalmente, che la vaccinazione carbonchiosa essendo effetto della vita e della riproduzione del germe attenuato nell'organismo animale, - e la riproduzione stessa essendo necessariamente legata ad elaborazione di principii tossici, - probabilmente alcaloidi specifici (HOFFA²) - ne segue che l'effetto più manifesto del trattamento è la elevazione della temperatura.

Del resto, un risultato sperimentale di tal genere, mi pare avrebbe potuto bastare - di per sè solo, nella supposta assenza di ogni altro elemento discernitivo - a fare dubitare forte che il germe in esame non fosse già il bac. ant. - germe patogeno convertitosi in saprofito - ma bensì un saprofito rimasto tale in tutte le fasi della sua biologia.

CHAUVEAU³, il quale si occupò a determinare appunto se la perdita di virulenza del bac. ant. basti a fargli perdere il diritto di domicilio tra i batteri patogeni, aggregandolo invece alla vasta categoria dei saprofiti, con metodi che qui non è il luogo di riferire, ottenne generazioni di bac. ant. assolutamente prive di virulenza, le quali tuttavia non avevano perduta la facoltà di ricuperare la propria funzione patogena, né avevano perduta la efficacia preservativa contro il carbonchio. Laonde il bac. ant. privo di virulenza non è una semplice saprofito, esso - contrariamente a quanto osservò Fazio - ha conservato gli attributi più preziosi delineanti la sua qualità di microrganismo patogeno.

A quale criterio siasi ispirato l'A. quando tentò coltivare il germe in alcool assoluto ed in alcool a 40° non è abbastanza chiaro,

¹ GAMALEIA: *Ann. Pasteur*, 1888.

² HOFFA: *Die Natur der Musbrand Gifts*, 1886.

³ CHAUVEAU: *C. R. Acc.*, 4890.

mancando dati dai quali risulti l'interesse di tale trattamento. Ebbe egli forse l'intendimento di dimostrare la resistenza del germe ad una sostanza che, finora, non si ritiene come molto favorevole terreno nutritivo? Non era da aspettarsi che, in alcool anidro, le culture subissero gravi alterazioni biologiche?

Dai risultati delle ricerche su vari terreni e con differenti metodi, l'A. afferma che il suo germe è perfettamente aerobio. L'affermazione, così come è derivata da esperimenti estremi, mi pare debba essere accettata con molta riserva, mancando tentativi di vita in condizioni intermedie, secondo fu fatto da altri, il che, se l'A. avesse ripetuto, gliene sarebbe derivata una serie di conoscenze di massimo valore intorno alla possibilità di ridonare artificialmente al germe la virulenza. Su ciò, del resto, ritornerò più tardi.

Secondo FAZIO il carbonchio attenuato nel terreno — per quel che spetta alla morfologia — differirebbe dal virulento, soltanto per una maggiore facilità e rapidità nello sviluppo e nella sporificazione. Ma se è vera tale maggiore rapidità di sviluppo, rimane assolutamente contraddittoria la pratica dell'A. di attendere cinque giorni per l'isolamento del bacillo. Nè riesco a spiegarmi come una più facile e più rapida sporificazione si possa attribuire ad uno stato di debolezza del germe. Si sa dalla biologia dei germi che la sporificazione accade talvolta in una fase di debolezza di essi, ma è del pari noto che il fatto è inerente all'esaurimento nutritivo del terreno in cui essi si sviluppano, non già un processo ciclico speciale del microorganismo. Gli studi sul proposito dimostrano invece che la sporificazione, considerata in sé, rappresenta la fase più saliente del ciclo evolutivo, e va coincidendo con la pienezza dei poteri fisiologici. Passando dal campo generale a quello speciale del carbonchio, ricordo una serie di esperienze di BÜCHNER¹, il quale dimostrò che la sporificazione del bac. ant. segna l'apogeo della sua attività fisiologica e del suo consumo di materiale nutritivo.

Fazio afferma categoricamente che il carbonchio modificato dal terreno è divenuto affatto incapace di riacquistare la propria virulenza.

Egli però non parla dei tentativi fatti, nè, a quanto pare, ha utilizzato le altrui osservazioni sul proposito, tentando di rinforzare il virus attraverso organismi refrattari.

¹ BÜCHNER: *Münch. Med. Wochenschr.*, 1890.

Già STRAUSS¹ aveva dimostrato che, mentre il cane adulto è molto refrattario alle inoculazioni di carbonchio, viceversa quello nato di recente ne è estremamente recettivo.

Più tardi MALM² ha dimostrato che il bac. ant. lungi dall'attenuarsi passando attraverso animali refrattari, si rinforza in una maniera soventi volte straordinaria. Tale esaltazione si fa tanto nell'edema prodotto dall'inoculazione sottocutanea, quanto nel sangue e nella milza. L'Autore inoltre non ha tenuto conto delle ricerche sperimentali preziosissime dello CHAUVEAU³ il quale ci ha indicato come, in maniera rigorosa ed elegante, il bac. ant. affatto destituito di sua virulenza possa — attraverso culture adizionate di sangue di una determinata specie e quasi anaerobiche — riacquistare progressivamente il massimo della virulenza per gli animali della identica specie.

A proposito degli studi compiuti dall'Autore su terreno della R. Scuola veterinaria di Napoli, preso su fosse ove si interravano carogne di animali morti di carbonchio, una sola cosa mi meraviglia, cioè: come mai in un Istituto veterinario seppelliscano animali carbonchiosi senza le dovute misure antisettiche prescritte, credo, dalla legge!

Ciò che spetta alle ricerche istituite dall'A. sul terreno ove aveva seppellito carogne carbonchiose, non si sottrae agli attacchi della critica.

L'Autore si è servito di una cassetta di legno per raccogliervi il terreno, dopo averla largamente lavata con una soluzione di sublimato corrosivo al millesimo, allo scopo di sterilizzarla.

Prima d'ogni altra cosa io non comprendo perchè, egli abbia proscelto un recipiente di legno, in secondo luogo perchè abbia ricorso alla sterilizzazione con il sublimato.

Il terreno di cui ci occupiamo fu tenuto liberamente esposto su di una terrazza, innaffiato tutti i giorni con acqua di Serino sterilizzata. Così facendo, mi pare che l'Autore si sia spostato da quanto accade nel caso naturale dei terreni da pascolo. Indubbiamente, un microrganismo così trattato trovasi in condizioni poco opportune, perchè il terreno viene in tal modo esposto ad un grado di

¹ STRAUSS: *Archives de Médecine expérimentale*, 1890.

² MALM: *Annal. Pasteur*, 1890.

³ CHAUVEAU: *Arch. méd. exp.*, 1890.

eccessiva saturazione, acquosa, e, per legge di sostituzione dei corpi, la soverchia quantità di acqua nei pori del terreno implica un insufficiente afflusso di ossigeno così necessario al bac. ant. Si aggiunga un'altra considerazione cui l'A. non pone mente, cioè che nel caso naturale di PASTEUR la presenza di numerosi greggi in quei pascoli importava il versamento di notevoli quantità di urina quotidianamente, costituendo così un intervento naturale dei più preziosi alla vitalità e allo sviluppo del bac. ant., certo assai più che la semplice acqua sterile. Così che, riguardo a questo ultimo gruppo di esperienze, non so dividere l'opinione dell'Autore, secondo il quale esse dovrebbero avere il valore di *experimentum crucis*.

Nella monografia dell'A. non vi è cenno di ricerca istologica su gli organi degli animali. Se tale trascuranza sia dovuta a quel senso di non cale in cui oggi la moda vuole che il batteriologo tenga l'investigazione istologica, io non saprei dirlo. Lo rilevo nel suo valore per scrupolosità di critico accurato. E per la stessa ragione registro nella sua integrità che il Bacillo dell'A. non fonde l'agar!

Viene ora l'esperimento finale fatto dall'A. *a titolo di semplice curiosità* (pag. 30), consistente nell'alimentare conigli con erbe miste a frammenti di vetro, aghi, spilli ed altre sostanze puntute e taglienti, tenendoli chiuse in gabbie sul terreno carbonchioso. Giacchè l'A. qualifica da sè l'esperimento con quelle espressioni io non posso che far eco alle sue parole. Dopo aver citata tutta la letteratura a proposito dell'influenza ostile dei succhi intestinali sul bac. ant., a proposito della difficoltà di infezione per questa via e a proposito della inutilità di lesioni boccali per l'infezione, che cosa si proponeva di dimostrare l'A.? Perchè non ebbe anche la curiosità di ammazzare uno di codesti animali per constatare se di quel materiale traumatizzante alcunchè penetrasse nelle prime vie intestinali? Forse quegli animali dotati dell'istintivo buon senso necessario a ripudiare tutto quanto può nuocere loro, ebbero l'acume di sottrarsi ad un genere di esperimenti abbastanza semplice quanto curioso!

Così, passo passo seguendo l'A. siamo giunti alle sue conclusioni. Alle poche considerazioni esposte sul valore di codesta monografia sterminatrice delle idee di PASTEUR faccio seguire le seguenti ricerche sperimentali da me eseguite.

Accingendomi al lavoro, mi parve che il problema dovesse essere considerato da vari lati. Di qui una serie di quesiti cui mi proposi di rispondere. Essi sono:

1° Studiare le proprietà del bac. ant. nel terreno, mettendomi in condizioni sperimentali più possibilmente affini alle naturali;

2° Determinare se conservi o pur no la propria virulenza ed - in caso di attenuazione - se questa dipenda dal terreno come tale, o da influenze estranee, o non si tratti di falsa interpretazione;

3° Determinare quanto e quale influsso possa esercitare l'indirizzo tecnico sulle deduzioni, e se la differenza di condizionamento sperimentale possa giustificare le conclusioni del prof. Fazio, così diverse da quelle di Pasteur;

4° Determinare - in caso di attenuazione - se questo germe attenuato possa avere proprietà premuntorie;

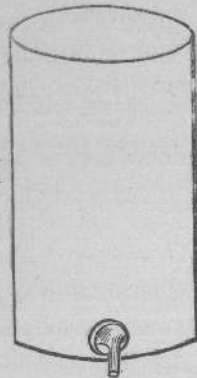
5° In caso di attenuazione, studiare la possibilità e la maniera di restituire al germe la perdita virulenza.

Invece degli appunti quotidiani di laboratorio, mi sia concesso - per amor di chiarezza - un ordinato riassunto degli esperimenti.

I.

Fin dal marzo 1891 avevo seppellite parecchie cavia e conigli, fatti morire di carbonchio virulentissimo, in grandi vasi cilindrici di argilla verniciata, alti 1 metro e larghi 0 60 cm., fatti costruire appositamente e riempiti di terreno di prato. Questi vasi portavano all'estremo inferiore un tubo ricurvo, capace di dare uscita volendo ad acqua di lavaggio versata sul terreno: il lume di questo condotto era chiuso da un finissimo reticello metallico allo scopo di impedire il trasporto di masse di terreno insieme coll'acqua. Gli animali erano seppelliti a circa 0.75 cm. di profondità.

Nulla di artificiale volli creare al terreno, e però lo tenni esposto all'aria libera e, quanto alla vegetazione, mi accontentai di quella naturale; non esagerate irrorazioni di acqua; di tratto in tratto qualche irrorazione con urina



Ad intervalli raccolti dell'acqua di lavaggio, con la quale inoculai delle cavie, producendo sempre la morte, ma con risultato sempre dubbio riguardo al carbonchio.

Questi erano saggi preliminari cui non attribuisco alcuna importanza.

Vasi e terreno rimasero abbandonati per diversi mesi finchè nel marzo 1892, dopo un inverno abbastanza rigoroso, ripresi le mie ricerche.

Il giorno *tre marzo* cioè di già un anno dopo il seppellimento delle cavie e dei conigli, rimossi con un cucchiaino a lungo manico gli strati superficiali, raccolti, con le dovute norme, tre saggi di terreno, a diverse profondità. per ogni recipiente, servendomi direttamente di questo terreno per le semine in tubi di gelatina ed agar. Di questi tubi, dopo aver fatto il migliore rimescolamento possibile, alcuni adibii, secondo usa ESMARCK, per arrotolamento del materiale sulle pareti. Da alcuni altri passai il materiale in camere di Petri. Credetti una buona precauzione lasciare questo materiale all'ambiente del laboratorio, a $+18^{\circ}\text{C}$ in inverno, affinché i germi non fossero da un momento all'altro sbalzati a gran divario di temperatura. Fin dal secondo giorno la gelatina e l'agar dimostravano copioso sviluppo di differenti germi, la cui singolare descrizione ometto perchè mi devierebbe dallo scopo prefissomi. Fra tutte però nessuna che attirasse la mia attenzione per una forma più o meno simile a quella del carbonchio.

Tentai di riuscire nell'intento operando su forti quantità di terreno, moltiplicando le diluizioni, e distendendo il materiale in larghe camere umide, ma senza ottenere miglior risultato.

Evidentemente, di fronte agli altri aerobi del terreno, il carbonchio doveva trovarsi in tale minoranza da essere impossibile isolarlo.

Non ebbi miglior risultato - come, del resto non era da sperare - da inoculazioni, sottocute, in cavie, di terreno o di acqua di lavaggio dei vasi, uccidendole poi (dopo dieci, dodici ore, prima che morissero di altra infezione) per esaminare batteriologicamente i gangli prossimiori.

Preferii in seguito i conigli, perchè meno ricettivi per l'edema maligno, ma senza risultato soddisfacente.

Provai, allora, a smilzare degli animali, ma l'operazione per

quanto non difficile è così delicata che dopo parecchi tentativi decisi di abbandonare questa via.

Arrivai finalmente allo scopo seguendo, a un di presso, la tecnica di Pasteur, ma anche qui dopo parecchi insuccessi.

Raccolsi con tutte le precauzioni dei campioni di terreno che esposi a un calor secco di 90° per dieci minuti. Inoculai, con questo terreno, cavie e conigli; ad altre cavie e conigli inoculai parecchi c.m.c. di acqua distillata e sterile, dopo averla agitata per bene col terreno stesso. I risultati furono dubbii.

Riuscii invece ad isolare il carbonchio modificando la tecnica in questo modo: in un Erlenmayer contenente 50 gr. di gelatina 8 $\frac{1}{10}$ fusa, introdussi 20 gr. circa di terreno; agitai bene, immersi la bevuta munita di termometro in un bagno maria rigorosamente regolato a 90°, e ve lo lasciai per dieci minuti dal momento in cui il termometro dell'Erlenmayer segnò 90°. Lasciai quindi sedimentare la parte più grossolana e distribuii la gelatina in dieci camere di Petri sterilizzate.

Dopo due giorni vi si scorgevano parecchie colonie, tra le quali alcune ondulose, flessuose, o come un convoluto di riccioi. Gli annessi fotogrammi mi sembrano più eloquenti di qualunque descrizione. Essi sono ritratti dalle piastre in 3ª giornata (fotogr. 1-2).

Dopo cinque giorni possedeva questo microrganismo isolato e coltivato sui principali terreni artificiali di cultura. I tubi di gelatina furono conservati nell'ambiente del laboratorio: quelli di brodo e di agar portati nel termostato. Il microrganismo così isolato presentava i seguenti caratteri: nelle infissioni in gelatina lungo il percorso dell'ago cominciavano a svilupparsi colonie dalla superficie alla profondità, emettendo progressivamente barbe ragianti in ogni senso dal centro, ondulose; la colonia aveva così l'aspetto di un *écouillon*. Lo sviluppo in gelatina raggiungeva il suo massimo al 3º giorno (fotogr. 3) quando già negli strati più superficiali si iniziava la fusione, che verso il quinto giorno convertiva la zona superiore di gelatina in un cono fluido e torbido. Nell'agar la disposizione lungo la infissione era certamente analoga, ma in principio meno decisa. Il fotogramma 4 fu eseguito da coltura in agar cinque giorni dopo l'infissione.

Nel brodo quà e là lungo le pareti del tubo si osservavano deposizioni come di finissime nubecole o cencetti di cui dopo tre

giorni si aveva un largo deposito al fondo del tubo, mentre il liquido soprastante si era reso limpido. Con lo scuotimento, lungo la colonna di brodo si elevava dal fondo un intorbidamento spirroidale.

Adunque dal modo di comportarsi verso i terreni nutritivi in parola, il nostro microrganismo ritraeva i caratteri propri del bac. ant. Ma ciò sarebbe stato certamente poco per una classifica. Lo studio microscopico di esso, fin dalle prime gocce pendenti, eseguite ricavandone il materiale dalle prime semine mi aveva fatto notare, in mezzo alle altre forme microbiche, il chiaro predominio di un batterio filiforme segmentato in tanti bacilli separati tra loro da brevissimo distacco, aventi estremi tronchi, privi affatto di movimento proprio e talvolta con dei punti rifrangenti simili a spore. Isolai accuratamente questo microrganismo di cui il fotogramma 5° dà l'immagine in goccia pendente. Esso presentava molta affinità per i comuni colori di anilina e conservava la colorazione trattato col metodo di Gram. (fotogr. 6); sporificava dopo alcuni giorni in brodo ed agar. (fotogr. 7). Senza dilungarmi in ulteriori descrizioni io rimando alla osservazione dei fotogrammi qui uniti (5, 6, 7): essi ed i caratteri di sviluppo esposti, credo mi diano il diritto di pensare che questo microrganismo corrispondesse alle note morfologiche del carbonchio. Ma per giungere alla completa identificazione di esso con un microrganismo patogeno, bisognava studiarne le proprietà biologiche. Pertanto innestai sottocute quattro conigli e quattro cavie. Gli animali furono quotidianamente seguiti ed osservati nel generale e sul punto dell'inoculazione, ma nei giorni consecutivi non mi fu dato di rilevare che una depressione profonda nella vivacità, un certo elevamento di temperatura e uno stato di tumefazione sugli orli di innesto. Tutto ciò andò poi dileguando e vi successe un relativo benessere, che dopo qualche settimana perdurava ancora. Ciò deponava per la mancanza di virulenza del microrganismo in esame, ma non mi toglieva la possibilità di affermare lo stesso la sua identità col bacillo del carbonchio salvo ad ammetterne l'attenuazione.

Fin qui, intanto, nelle inoculazioni si aveva qualche cosa di attivo; un insieme indicante la lotta combattuta tra i generatori di una infezione e l'organismo che metteva in opera la somma de' suoi poteri organici riuscendo vincitore.

Uccisi alcuni degli animali inoculati, allo scopo di sorprendere il bac. ant. in qualche organo ricettore, ma riuscì negativo lo esame del sangue, della milza, dei gangli prossimiori ecc., come anche negative le culture tentate dal sangue. Essendo sprovvisto, in quei giorni, di cavie piccole su cui provare il germe isolato, ricominciai da capo, modificando nuovamente la tecnica, per tentare di stabilire se il terreno o la tecnica da me usati erano causa dell'attenuazione constatata. Intanto il lavoro compiuto mi permetteva di fare le seguenti deduzioni:

1° Che nel terreno da me studiato esisteva dopo un anno dal seppellimento di animali carbonchiosi un bacillo per tutti i caratteri morfologici simile al bac. ant. comune.

2° Che malgrado i rigori straordinari della stagione i germi di questo microrganismo nulla avevano perduto delle loro proprietà riproduttive.

3° Che questo microrganismo non producendo l'infezione carbonchiosa, si aveva diritto, per le ragioni anzidette, di crederlo il bac. ant. attenuato da influenze che bisognava determinare.

4° Che la reazione osservata dopo l'inoculazione di questo microrganismo lasciava scospettare una certa azione non definibile.

II.

Data la serie di trattamenti necessari ad ottenere un germe puro e nelle condizioni opportune a farne l'uso voluto, era ben naturale che il microrganismo in esame avesse dovuto attraversare tanti momenti capaci di squilibrarne i poteri biologici, da potersi dare il caso che io stesso, anzi che il suolo, ne avessi indotta tale attenuazione.

Raccolti pertanto nuovi ed abbondanti campioni di terreno alla profondità di 75 cm. circa, onde avere possibilmente delle spore che non fossero state ancora esposte direttamente all'azione modificatrice della luce, del sole ecc., li distribuì in camere di Tyndall (200 grammi circa di terreno per ciascuna di esse) e vi aggiunsi 500 cm.c. di brodo peptonizzato leggermente alcalino. Agitai diligentemente e le mantenni per due ore nel termostato regolato a 42°. A questa temperatura le spore carbonchiose non si sviluppano, mentre si sviluppano, invece, la maggior parte degli

altri germi. Dopo due ore portai le camere di Tyndall per $\frac{1}{2}$ d'ora a 75°, temperatura che distrugge le forme vegetative senza ostacolare la vitalità delle spore del carbonchio. Lasciai sedimentare rapidamente e, da un lato inoculai degli animali (conigli) nel sottocutaneo addominale, alcuni col terreno sedimentato, altri col liquido soprastante. Da altra parte in camere di Petri, in cui avevo previamente disteso dell'agar, versai parecchie gocce della sospensione, agitata, procurando di distribuirle uniformemente sulla superficie dell'agar. Riuscii così ad isolare nuovamente il germe, avente tutti i caratteri già descritti.

Ma il punto saliente di questa nuova serie di ricerche era rappresentato dagli effetti delle inoculazioni. I dati morfologici essendo identici, come ho detto, non mi restava che constatare se, nel caso presente, si conservasse l'attenuazione riconosciuta nelle precedenti esperienze. Al secondo giorno dagli innesti i conigli godevano d'un relativo benessere; si mostravano un po' meno vivaci: localmente nulla. Soltanto al quarto giorno gli arti, ove erasi fatta l'iniezione o la deposizione del terreno, erano notevolmente gonfi, vi si notava una significante durezza, accompagnata da pastosità edematosa; nel generale uno stato di grande prostrazione. Al quinto giorno trovai morte due delle cavie innestate col terreno; una di quelle che avevano subito iniezione di brodo di lavaggio era moribonda. La uccisi per sezionarla in più favorevoli condizioni. La necropsopia di tutte tre diede lo stesso reperto; egual grado di edema gelatinoso sottocutaneo estesissimo, milza fortemente ingrossata, nera e spapolabile, fegato iperemico, sangue fluido, nero; all'esame microscopico numerosi bacilli immobili, in filamenti discretamente lunghi, sia nell'edema gelatinoso, sia nel sangue dei seni cardiaci, sia nel succo splenico. Con il sangue e con il succo splenico feci piastre d'agar per procedere secondo la solita tecnica agli isolamenti. Deposì anche piccoli pezzetti di milza spapolati in saccoccie sottocutanee di due piccole cavie. Nei giorni successivi morirono gli altri tre conigli inoculati, nonchè le due piccole cavie ineculate con pezzetti di milza, presentando sempre alla sezione le note anatomo-patologiche del carbonchio.

Così, dunque, essendomi messo in condizioni più opportune, avevo dimostrata in esso la proprietà di svolgere manifestamente la propria virulenza. Se per tutto ciò qualcuno volesse addebitarmi la

pecca di artificiosità io gli risponderei che, per lo meno, i fenomeni naturali a cui il carbonchio va sottoposto nel terreno da pascolo, sono, come in genere ogni altro svolgersi della vita fisica, così complessi, così collegati in un nesso intimo di cause ed effetti, da sfuggire alla nostra percezione, e da rappresentare, di fronte alla nostra affaticata artificiosità, qualcosa di molto più elevato e potente. Se, astrazione fatta da tanti di codesti fattori fisici, noi vogliamo considerare le influenze più appariscenti, quali la temperatura, l'umidità e la sopravvenienza di un materiale organico capace di favorire lo sviluppo di tante vite latenti nel suolo, troviamo del pari, che quello ch'io ottenevo coi miei mezzi di laboratorio era simulacro pallido di ciò che avviene nel suolo nell'epoca dei pascoli; quando, cioè, viene sottoposto ad un grado termico più elevato, ad una maggiore umidità, ed all'aggiunta accidentale di non spregevoli quantità di urina del gregge stesso che vi pascola.

Fin qui le mie esperienze mi permettevano di argomentare le seguenti cose:

1° che nel terreno da me studiato esisteva (dopo circa quindici mesi del seppellimento) un bacillo morfologicamente da ritenersi come B. A., dotato di pieno potere di sviluppo.

2° che il suddetto bacillo non produceva l'infezione a rapidissimo decorso, ma tuttavia letale;

3° che dall'esame comparativo dei risultati negativi della prima serie di ricerche con quelli positivi della seconda serie, risultava fondato il mio sospetto che una delle influenze principali, se non la precipua od unica di codesto affralimento, risiedesse non già nel suolo, ma nei trattamenti cui veniva sottoposto il microrganismo per l'isolamento.

Rimaneva ora a risolvere il quesito riguardante il potere pre-munitorio del bacillo isolato e riconosciuto attenuato. Non potendo studiare questo argomento su conigli, cavie o topi, acquistai per tale bisogna quattro piccoli agnelli. Io possedevo quattro serie di culture pure del microrganismo in esame:

a) carbonchio isolato direttamente dal terreno (reazione febbrile negli animali inoculati; malessere ecc.);

b) ¹ carbonchio isolato dal terreno sottoposto a speciale trattamento (letale in alcuni animali, in altri sospetto);

c) carbonchio isolato dal sangue di animali inoculati col terreno sottoposto a speciale trattamento (letale in un periodo di 6 - 10 giorni);

d) carbonchio isolato dal sangue di animali innestati con pezzi di milza delle cavie da cui si era ricavata la serie C.

Dei quattro animali tentai vaccinarne tre; uno lo tenni per testimonia. Il trattamento lo feci consistere: in una prima iniezione del carb. a (2 emc.), seguito dopo otto giorni dall'iniezione del carb. b, dopo altri otto giorni dall'iniezione del carb. c, dopo altri otto giorni dall'iniezione del carb. d, e, finalmente dall'iniezione di 1 emc. di carbonchio tipico virulento. Dei tre animali due riuscirono perfettamente vaccinati; il terzo morì d'infezione carbonchiosa quattro giorni dopo la inoculazione del carb. c. Il testimonia morì rapidamente per l'inoculazione di carb. tipico virulento. Avendo per ragioni di economia operato su così piccolo numero di animali non si può dare gran peso all'insuccesso dell'aguello morto malgrado i tentativi di vaccinazione; tanto più che è noto come anche coi metodi rigorosi classici si abbiano pure alcune perdite tra gli animali vaccinati.

Non mi pare dunque illogico dedurre che il bac. ant. dopo un'anno di vita nel terreno, per quanto attenuato, riteneva sempre la preziosa caratteristica del potere premunitorio, cosa che io avevo sospettata fin da quando osservai la reazione che spiegavano gli animali alla iniezione di esso.

III.

Altro dei quesiti propostimi era: studiare, in caso di attenuazione del germe, il modo di ridonargli la virulenza (Quesito 5^o).

Ricordando gli studi, citati più sopra, di Strauss e di Malm, avuta l'opportunità di procurarmi dei cani in discreto numero, alcuni neonati, altri di circa quindici giorni, ne destina i due nati

¹ Con questo carbonchio - b - innestai 5 cavie, delle quali due morirono per carbonchio, una morì senza causa apparente più d'un mese dopo.

il giorno prima a subire iniezioni dalle culture della serie *a* ed altri due - fra quelli più attempati - ad iniezioni colle culture *b*. Questi ultimi dopo trenta ore o poco più erano già morti con le note più salienti del carbonchio, edema gelatinoso, milza enorme, chiazze congestive nel fegato, numerosi bacilli caratteristici nel sangue del cuore, nel succo della milza ecc. Dal sangue feci piastre di agar e successivi isolamenti; innestai anche grumi di sangue - tolti dai seni - entro tasche sottocutanee di caviette di due mesi circa. Morirono in due giorni circa con tutti i segni anatomo-batteriologici dell'infezione carbonchiosa.

Frattanto degli altri due cani inoculati colle culture *a*, uno moriva in breve tempo di carbonchio, l'altro rimaneva in vita dopo avere superato un non breve periodo di vivo malessere. Questo parziale successo non mi permetteva certamente di considerare come veramente attivo il carbonchio di provenienza *a*, non potendo escludere - pel cane soccombuto - una condizione di minima resistenza organica, data la tenerissima età di esso.

Il fatto che le colture *b* avevano agito sul cane in modo assai più rapido del solito, dimostrava che realmente i cani giovanissimi costituiscono un reattivo sensibilissimo per il carbonchio. Tuttavia per arrivare alla tipica virulenza, volli ripetere le esperienze di CHAUVEAU: la coltivazione cioè del bac. ant. affievolito, in cultura quasi anaerobica, coll'aggiunta di sangue della specie su cui si intende fare inoculazioni. Per le ragioni esposte più sopra, preferii i cani.

Legato un cane adulto, coi comuni precetti antisettici posi a nudo la femorale, e da essa - mediante una grossa siringa Tursini sterile, fortemente raffreddata con vive polverizzazioni di etere per liberarmi in parte degli impieci della facile coagulazione - aspirai parecchi cmc. di sangue, che versai rapidamente in un tubo sterile zaffato con cotone, ed agitai quindi prolungamente il tubo. E poichè dal lavoro di CHAUVEAU non potei ricavare i dettagli dell'esecuzione sperimentale, condizionai le mie esperienze a questo modo: Feci liquefare a bagno-maria quattro tubi di gelatina - in cui poche ore innanzi avevo fatto infissioni di materiale di cultura della categoria *a*. Vi feci giungere cautamente 1 cmc. di sangue liquido per ciascun tubo, e resi la cultura quasi anaerobica nel modo seguente: agitando con certa prestezza, la com-



penetrazione della gelatina e del sangue riuscì uniforme, formandosi al livello del liquido una fitta spuma alta 1 cm. circa. Portati allora i quattro tubi a raffreddarsi sotto un zampillo di acqua, la gelatina solidificò perfettamente. Fuso - d'altra parte l'agar sterile contenuto in due tubi, e lasciatolo un po' raffreddare fino a raggiungere quasi il limite di solidificazione, ne versai 2 cmc. circa al disopra della gelatina solidificata. L'agar in contatto con le pareti dei tubi freddi, contenenti la gelatina, si raffreddava e giungeva sulla superficie della schiuma pressochè solidificato. Dileguata - dopo qualche ora - la schiuma, il mezzo di cultura era sottratto al libero accesso dell'aria dal turacciolo di agar. ed insieme la cultura non era assolutamente anaerobica, poichè tra gelatina ed agar era interposto uno strato di aria di quasi 1 cm. Portati quindi i quattro tubi di aria nel termostato a 37° l'agar si conservò solido, mentre la gelatina si convertì in un terreno di cultura liquido. Ve li lasciai per 48 ore, dopo di che passai alle inoculazioni su animali. A potermi servire della gelatina così trattata si opponeva l'ostacolo della rimozione dello zaffo di agar, ch'io superai facendo colla lima un intacco sul tubo un po' al di sotto del livello inferiore dell'agar, completando poi la frattura circolare con carbone di Berzelius: la parte inferiore del tubo contenente la cultura del microorganismo fu mantenuta in un bagno-maria a 37°, perchè - conservandosi fluida la gelatina - la si potesse aspirare colla siringa Tursini. Con un cmc. di questo liquido feci un'iniezione sottocutanea a due cagnolini di otto giorni di età, ed in mancanza di altri animali di questa specie - per puro esperimento - tentai l'iniezione della stessa quantità dello stesso liquido in due cavie.

Coll'osservazione accurata del liquido iniettato a gocce pendenti ed in preparati colorati potei persuadermi della purezza della cultura. I due cagnolini morirono in 24 ore circa a breve intervallo l'uno dall'altro. Le autopsie eseguite subito dopo la morte diedero le più ampie dimostrazioni della infezione carbonchiosa. Dal succo splenico e dal sangue feci piastre in agar, quindi isolamenti in brodo, gelatina ecc., eseguendo anche preparati colorati affatto simili a quelli già fotografati.

Avevo così ottenuta una quinta categoria di carbonchio rappresentata dalla categoria *a* rinforzata in modo sensibilissimo mediante il trattamento indicato da CHAUVEAU. Ero - per tal modo - in grado di affermare che il bac. ant. attenuato per differenti cause - principalmente artificiali - è suscettibile di riacquistare in breve tempo la propria virulenza enunciato ben altro che nuovo¹, ma impugnato - pel carbonchio da lui studiato - dal prof. FAZIO. Tanto più significante si manifestava l'influenza rattivatrice della cultura quasi anaerobica in presenza di sangue, in quanto che le cavie inoculate soccombettero del pari all'infezione. Quest'ultimo successo fu confermato da altri posteriori. Io seguí con molta cura la coltivazione di questa ultima categoria di carbonchio virulentissimo, col quale inoculai sotto-cute un altro gruppo di dieci animali. I risultati vanno disposti come segue:

Due conigli adulti. morti al terzo giorno compiuto.

Due conigli piccoli id. tra secondo e terzo giorno.

Due cavie adulte id. tra 65-72 ore.

Due cavie di pochi giorni: id. tra 24-30 ore.

Due topi id. uno in meno di 12 ore, l'altro dopo 32 ore.

Di questi animali, meno il topo morto rapidamente ed una delle piccole cavie, tutti gli altri presentarono criteri sicuri per la diagnosi della avvenuta infezione carbonchiosa. Inoculato il carbonchio della serie *a* nello spazio sottodurale, col metodo di MARTINOTTI e TEDESCHI², subì ugualmente un notevolissimo esaltamento.

Ed ora non mi resta che venire alle seguenti

CONCLUSIONI:

1.º Il bac. ant. pervenuto nel terreno da animali carbonchiosi sepolti vi resta nello stato di forma durevole, conservando le sue proprietà di sviluppo inmodificate.

2.º Durante il soggiorno nel suolo, esposto a una serie di fattori meteorologici, il germe vi si adatta; modifica la tipica virulenza, ma è ben lungi dal mutarsi in comune saprofito.

¹ CHAUVEAU: *Comptes-rendus*, 18 febr. 1889.

² MARTINOTTI e TEDESCHI: *Gazz. medica di Torino*, luglio 1891.

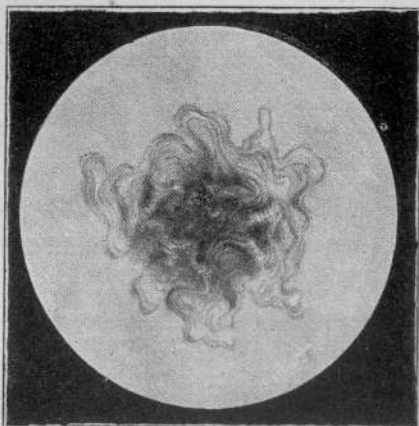
3.° Codesta modificazione naturale consiste in un grado di attenuazione che si rende esagerato a chi voglia studiarlo senza criterii tecnici e scientifici razionali.

4.° L'attenuazione naturale consiste nella incapacità di determinare la forma rapida dell'infezione, limitandosi a produrre una forma infettiva a decorso lungo, ma pure letale.

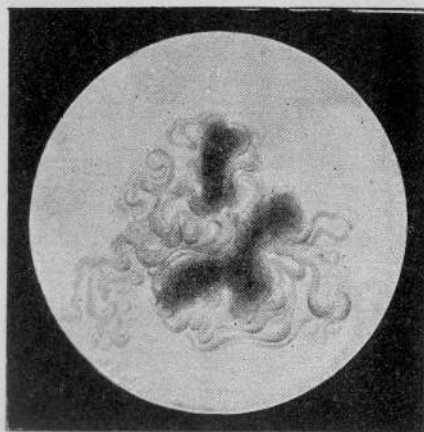
5.° Che non sia trasformato in saprofita lo dimostra la persistenza delle proprietà vaccinali.

6.° Comunque attenuato il bac. ant. ricavato dal terreno può riacquistare la massima virulenza coltivato opportunamente e con metodi speciali in *vitro* od in organismi viventi, nonché per determinate condizioni favorevoli generali; questo è un'altro argomento che sta contro la trasformazione in saprofita.

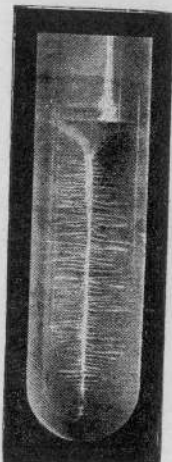
7.° Finalmente, resta sempre più vero e dimostrato che la sorgente principale, grave, pericolosissima delle epizozie di carbonchio è rappresentata dai terreni ove gli animali caddero morti, perdettero sangue, furono scuoiati ed interrati. Comunque giunti nel terreno - ma specialmente col seppellimento delle carogne - i germi del carbonchio vi rappresentano una minaccia latente e grave alla vita degli animali, e solamente la rigorosa osservanza di energiche misure igieniche può prevenire il pericolo.



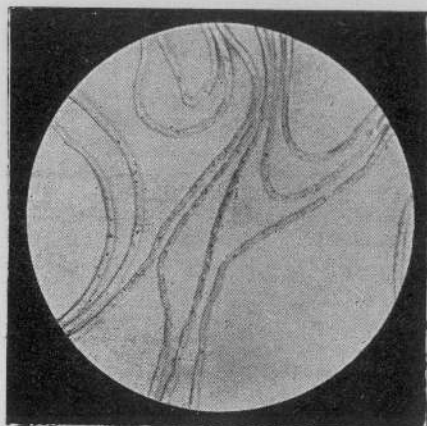
FOT. 1^a — ZEISS, OBB. AA.
OC. 2 PROJ. (dist. 36 cm.) INGRAND. 40.



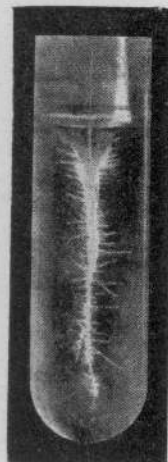
FOT. 2^a — ZEISS, OBB. AA.
OC. 2 PROJ. (dist. 36 cm.) INGRAND. 40.



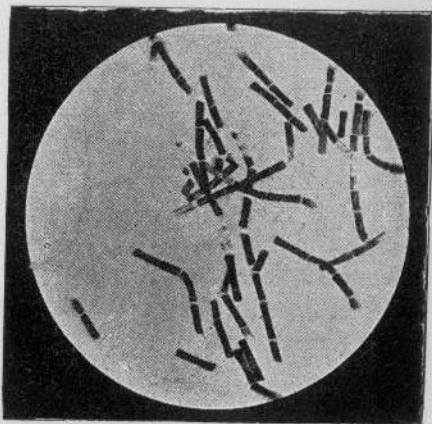
FOT. 3^a.



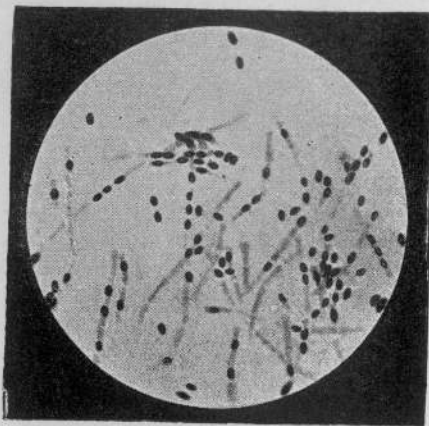
FOT. 5^a — ZEISS, OBB. APOCR. 1, 5.
OC. 4 PROJ. (dist. 37 cm.) INGRAND. 1000.



FOT. 4^a.



FOT. 6^a — ZEISS OBB. APOCR. 1, 5.
OC. 4 PROJ. (dist. 37 cm.) INGRAND. 1000.



FOT. 7^a — ZEISS, OBB. APOCR. 1, 5.
OC. 4 PROJ. (dist. 37 cm.) INGRAND. 1000.

