

Studi e ricerche sul giallume del Baco da seta

Introduzione

Se l'arte d'allevare il Filugello era nota ai popoli dell'Estremo Oriente sin dalla più remota antichità, e se il Baco da seta venne introdotto in Europa sin dal 533 sotto l'impero di Giustiniano, i trattati su quest'insetto comparvero abbastanza recentemente, ed infatti i più antichi risalgono soltanto ai tempi del Rinascimento. I primi studi sul Filugello fiorirono nel 1500, e com'era costume del tempo, vennero presentati sotto forma di poemi. In seguito gli scritti sul baco da seta si moltiplicarono, ma il primo trattato scientifico comprendente lo studio dell'anatomia e della fisiologia, fu lasciato da un genio italiano: MARCELLO MALPICHI, che nel 1686 scrisse la classica « *Dissertatio Epistolica de Bombyce* ».

Comunque, se gli autori di questi primi studi e di altri successivi ci lasciarono le norme da seguire negli allevamenti e le più elementari conoscenze anatomico-fisiologiche sul Filugello, ben poco ci dissero delle sue malattie. Ciò era pienamente giustificato dai limitati mezzi d'indagine di cui potevano disporre, ed anche dal fatto che le più gravi malattie del Filugello comparvero soltanto più tardi.

Però nella maggior parte degli antichi trattati troviamo descritta una malattia del Filugello, che aveva tutti i caratteri dell'attuale giallume, e benché nulla si sapesse sulla sua provenienza e circa l'epoca in cui avesse dato le sue prime manifestazioni, dobbiamo ammettere che questo morbo sia uno dei più antichi nella storia della Sericoltura.

Naturalmente i primi studiosi che s'occuparono della patologia di questo prezioso insetto, cercarono di spiegare le cause delle malattie seguendo le correnti scientifiche dell'epoca; e così

CAPITOLO I.

Le moderne teorie sulla natura del giallume

In questi ultimi anni gli studi sul giallume hanno formato un argomento di attualità, per cui molte delle teorie finora presentate perdono talora il carattere puramente scientifico e si dilungano in sottigliezze che hanno piuttosto un aspetto polemico, il più delle volte assai vivace.

Cercherò quindi di illustrare per sommi capi gli ultimi studi fatti su quest'argomento così controverso, senza entrare eccessivamente nello spirito di certi dettagli che sono piuttosto frutto di ragionamenti induttivi, che di vere osservazioni scientifiche.

Anzi, per comodità di esposizione, riunirò le diverse teorie che presentano tra di loro una certa affinità in gruppi nei quali sarà possibile mettere in evidenza le divergenze fondamentali esistenti fra i vari autori.

A) *Teorie che ammettono la natura batterica dell'agente etiologico del giallume.*

O. HOFMANN nel 1891 credette di dimostrare la natura parassitaria del giallume descrivendo un particolare batterio contenuto nell'emolinfa di larve di *Limantria monacha* affette da poliedria. Ma pur considerando esatta l'osservazione dell'HOFMANN, non si dovrebbe escludere la possibilità che nella *Limantria* il giallume si complichino con altre malattie, oppure che il batterio descritto vi si trovi accidentalmente, dato che con la rottura degli integumenti s'apre l'ingresso a tutte le spore dei batteri saprofiti che si trovano nell'aria.

Ancora nel 1891, un micrococco fu descritto dall'americano FORBES, che lo ritenne un parassita specifico determinante il giallume, e nel 1892 il tedesco V. TUBOEUF illustrò un batterio che secondo lui sarebbe stato l'agente del mal dei poliedri nella *Limantria monacha*, ricadendo così a sua volta nell'errore dell'HOFMANN.

Nel 1894 il tedesco ECKSTEIN ammise l'identità del *Bacillus B* di HOFMANN e del *Bacterium monachae* di TUBOEUF e nel 1896 il KRASSILSHNIK, attribuì la causa del giallume ad un batterio che chiamò *Micrococcus lardarius*.

Infine nel 1912 GLASER e CHAPMANN descrissero il *Cyrococcus flaccidifex*, e lo ritennero come agente etiologico della poliedria, e considerarono i granuli poliedrici come semplici reazioni nucleari. Ma questi autori americani, l'anno successivo, attribuirono la malattia ad un virus filtrabile, dando così la prova della poca attendibilità delle conclusioni basate sulla natura batterica della malattia, e dopo di essi nessun altro autore ammise mai l'esistenza di batteri specifici della poliedria.

B) *Teorie che considerano i granuli poliedrici come dei veri parassiti*

L'austriaco G. BOLLE in un primo tempo attribuì ai granuli poliedrici la composizione di sostanza albuminoide, ma ritrattò in seguito la sua ipotesi primitiva ed in ulteriori studi li considerò come esseri viventi capaci di produrre il mal del giallume. Nel 1894 a Tokio, in collaborazione col SASAKI, il BOLLE compì una serie di ricerche su di un dittero parassita del *Bombyx mori*, l'*Udjimia sericariae*, le cui uova vengono deposte sulla foglia di gelso e con questa vengono ingerite dal baco; giunte nell'apparato digerente si sviluppano e danno luogo a delle larve che perforano la parete dello stomaco e si distribuiscono in vari organi, a spese dei quali traggono il nutrimento, producendo così la morte del filugello.

Orbene, il BOLLE trovò che i bachi affetti da giallume e invasi dall'*Udjimia*, trasmettono la loro malattia al tachimide, che presenta tra il sarcolemma e le fibre muscolari un gran numero di granuli poliedrici. Da queste osservazioni il bacologo austriaco trasse la conclusione che i granuli poliedrici dovevano essere dei parassiti allo stato di spore, appartenenti alla classe degli Sporozoi, ed ai quali dette il nome di *Microsporidium polyedricum*.

Per avvalorare la natura protozoaria del parassita egli portò altre argomentazioni: a) la composizione chimica dei granuli era quasi uguale a quella delle spore di *Nosema bombycis*; b) la presenza di granuli accoppiati faceva supporre la loro facoltà

CAPITOLO I.

Le moderne teorie sulla natura del giallume

In questi ultimi anni gli studi sul giallume hanno formato un argomento di attualità, per cui molte delle teorie finora presentate perdono talora il carattere puramente scientifico e si dilungano in sottigliezze che hanno piuttosto un aspetto polemico, il più delle volte assai vivace.

Cercherò quindi di illustrare per sommi capi gli ultimi studi fatti su quest'argomento così controverso, senza entrare eccessivamente nello spirito di certi dettagli che sono piuttosto frutto di ragionamenti induttivi, che di vere osservazioni scientifiche.

Anzi, per comodità di esposizione, riurrò le diverse teorie che presentano tra di loro una certa affinità in gruppi nei quali sarà possibile mettere in evidenza le divergenze fondamentali esistenti fra i vari autori.

A) *Teorie che ammettono la natura batterica dell'agente etiologico del giallume.*

O. HOFMANN nel 1891 credette di dimostrare la natura parassitaria del giallume descrivendo un particolare batterio contenuto nell'emolinfa di larve di *Limantria monacha* affette da poliedria. Ma pur considerando esatta l'osservazione dell'HOFMANN, non si dovrebbe escludere la possibilità che nella *Limantria* il giallume si complichì con altre malattie, oppure che il batterio descritto vi si trovi accidentalmente, dato che con la rottura degli integumenti s'apre l'ingresso a tutte le spore dei batteri saprofiti che si trovano nell'aria.

Ancora nel 1891, un micrococco fu descritto dall'americano FORBES, che lo ritenne un parassita specifico determinante il giallume, e nel 1892 il tedesco V. TUBOEUF illustrò un batterio che secondo lui sarebbe stato l'agente del mal dei poliedrici nella *Limantria monacha*, ricadendo così a sua volta nell'errore dell'HOFMANN.

Nel 1894 il tedesco ECKSTEIN ammise l'identità del *Bacillus B* di HOFMANN e del *Bacterium monachae* di TUBOEUF e nel 1896 il KRASSILSHTSNIK, attribuì la causa del giallume ad un batterio che chiamò *Micrococcus lardarius*.

Infine nel 1912 GLASER e CHAPMANN descrissero il *Cytococcus flaccidifex*, e lo ritennero come agente etiologico della poliedria, e considerarono i granuli poliedrici come semplici reazioni nucleari. Ma questi autori americani, l'anno successivo, attribuirono la malattia ad un virus filtrabile, dando così la prova della poca attendibilità delle conclusioni basate sulla natura batterica della malattia, e (dopo di essi nessun altro autore ammise mai l'esistenza di batteri specifici della poliedria.

B) *Teorie che considerano i granuli poliedrici come dei veri parassiti.*

L'austriaco G. BOLLE in un primo tempo attribuì ai granuli poliedrici la composizione di sostanza albuminoide, ma ritrattò in seguito la sua ipotesi primitiva ed in ulteriori studi li considerò come essere viventi capaci di produrre il mal del giallume. Nel 1894 a Tokio, in collaborazione col SASAKI, il BOLLE compì una serie di ricerche su di un imenottero parassita del *Bombyx mori*, l'*Udjmia sericariae*, le cui uova vengono deposte sulla foglia di gelso e con questa vengono ingerite dal baco; giunte nell'apparato digerente si sviluppano e danno luogo a delle larve che perforano la parete dello stomaco e si distribuiscono in vari organi, a spese dei quali traggono il nutrimento, producendo così la morte del filugello.

Orbene, il BOLLE trovò che i bachi affetti da giallume e invasi dall'*Udjmia*, trasmettono la loro malattia all'imenottero, che presenta tra il sarcolemma e le fibre muscolari un gran numero di granuli poliedrici. Da queste osservazioni il bacologo austriaco trasse la conclusione che i granuli poliedrici dovevano essere dei parassiti allo stato di spore, appartenenti alla classe degli Sporozoi, ed ai quali dette il nome di *Microsporidium polyedricum*.

Per avvalorare la natura protozoaria del parassita egli portò altre argomentazioni: a) la composizione chimica dei granuli era quasi uguale a quella delle spore di *Nosema bombycis*; b) la presenza di granuli accoppiati faceva supporre la loro facoltà

di riprodursi per divisione; c) attorno ai granuli si notavano delle masse sarcoediche gelatinose, che facevano pensare ad una struttura sporulare.

Ma dopo gli studi del PANEBIANCO le argomentazioni del BOLLE non parvero sufficienti, giacché il PANEBIANCO dimostrò — e tutti i bacologi riconobbero — che i granuli poliedrici sono dei veri e propri cristalli (rombododecaedri).

Tuttavia le idee del BOLLE furono riprese nel 1909 dal MARZOCCHI, che volle trarre delle conclusioni troppo azzardate da osservazioni che pur sono eseguite con molta serietà, e che, pur essendo incomplete, ho potuto confermare nelle mie ricerche.

Il MARZOCCHI infatti, considerò alcune alterazioni nucleari, dovute alla contrazione della cromatina, come stadi intermedi di un parassita che assumendo poi un aspetto granulare con la porzione centrale di cromatina intensamente colorata si trasformerebbe in granulo poliedrico. A questo supposto parassita, il MARZOCCHI conservò il nome dato dal BOLLE di *Microsporidium polyedricum*, in cui la forma sporulare sarebbe appunto quella di un granulo poliedrico, e come in molti Sporozoi, darebbe luogo alla formazione di sporozoi.

A proposito di queste teorie, citerò gli studi fatti in Germania da ESCHERICH e MIYAJIMA, che volendo controllare le osservazioni di altri autori sui virus filtrabili, triturarono in un mortaio con soluzione fisiologica delle larve di *Limantria monacha* affette da poliedria. Della massa ottenuta, parte fu filtrata su carte e parte con candele di Chamberland e con filtri di Berkefeld. Ebbene il liquido filtrato era capace di trasmettere la malattia soltanto nel caso che contenesse i granuli poliedrici. Però questi autori non si pronunciarono nell'ammettere la natura parassitaria dei granuli, oppure nel considerarli come luoghi di adesione di virus filtrabili.

Alle medesime conclusioni giunsero i giapponesi HAYASHI e SAKO che impiegarono successivamente filtri di carta e candele di Chamberland, senza riuscire a trasmettere la malattia coi liquido filtrato, mentre le prove d'infezione artificiale riuscirono brillantemente impiegando il liquido contenente i poliedri.

Dopo quindici anni di abbandono queste teorie sembravano ormai dimenticate quando apparve nello scorso anno una pubblicazione del DEL GUERCIO della Stazione Entomologica di Firenze che studiò molte forme di giallume che si manifestano

non solo nei bachi da seta, ma in molti insetti delle piante agrarie e forestali e nelle zanzare trasmettitrici della malaria umana.

Queste diverse forme di giallume sarebbero dovute a speciali esseri viventi non raggruppabili in alcuno dei tipi biologici esistenti e che essendo di natura tutt'affatto propria, vengono considerati dal loro scopritore in un gruppo indipendente che riceve il nome di *Entomococchi*.

Sono questi delle vegetazioni microscopiche a struttura talloide arborescente, provenienti da uno stroma. Questi talli presentano degli assi primari, secondari, terziari e dei carpidi aventi forma di prismi esagonali, di cubi o di sfere.

I carpidi poliedrici avrebbero soltanto la funzione della diffusione nello spazio, mentre quella della riproduzione sarebbe affidata a dei cocchi ovoidali contenuti nei carpidi stessi; da tali cocchi ovoidali nasce appunto il nome di Entomococchi.

Non è mio intendimento di riportare la divisione sistematica degli Entomococchi, ma voglio ricordare che il DEL GUERCIO ammettendo diverse forme di giallume, le attribuisce a specie diverse: *Entomococcus bombycinus*, produttore la forma più diffusa della malattia; *Entomococcus fusiformis*, caratteristico della maremma toscana; *Entomococcus micropoliedricus* diffuso in Sardegna; *Entomococcus cystiradiatus* del Trentino ed *Entomococcus cubicus*, proprio di una forma piuttosto rara di giallume.

Il DEL GUERCIO è riuscito a fare delle colture di Entomococchi, mediante le quali, afferma di aver potuto trasmettere la malattia, e contrariamente a quanto è sempre stato creduto dai vari autori sostiene che il giallume sia una malattia capace di manifestarsi in tutti gli stadi di vita dell'insetto, dalle prime forme larvali all'insetto perfetto; la farfalla femmina avrebbe, oltre agli altri visceri, le ovaie e le ghiandole annesse ripiene di germi infettivi, ed il maschio ne avrebbe tanti nell'apparato sessuale da infettare durante l'accoppiamento la femmina. Questo autore sostiene poi l'ereditarietà del giallume appoggiando la sua tesi con osservazioni pratiche, ma senza darne documentazione con studi microscopici su sezioni di uova e di embrioni.

Per quanto concerne l'epidemiologia, i veicoli d'infezione sarebbero gli insetti untori (le mosche ad esempio) e l'aria

atmosferica, a mezzo dei quali i carpidi cadrebbero sulle foglie del gelso, ed entrerebbero con questo nel tubo digerente del filugello, da cui passerebbero nell'emolinfa, dove si aprirebbero mettendo in libertà i cocchi ovoidali.

Assai strane appaiono le osservazioni del DEL GUERCIO sulla durata della vita dei germi. Avendo allestito nel 1924 delle colture con materiale proveniente da crisalidi e bozzoli di razza sarda raccolti nel 1874 dal fondatore della Stazione Entomologica di Firenze, il Prof. TARGIONI-TOZZETTI, otteneva la fluidificazione della gelatina al quarto giorno, e dopo un solo giorno poteva ottenere da queste delle nuove colture. Dunque in base a queste conclusioni, l'agente del giallume potrebbe rimanere in vita mezzo secolo!

Per quanto riguarda questa teoria, io ritengo possibile l'esistenza degli Entomococchi, ma non sono d'accordo col DEL GUERCIO circa la loro patogenicità; anzi credo che si tratti di saprofiti fino a ieri sconosciuti, e che in istato avanzato della malattia, o addirittura a morte avvenuta, possano determinare e accelerare l'ulteriore disfacimento della larva. Non sono neppure d'accordo nell'ammettere l'esistenza di carpidi di forma nettamente poliedrica, come quella dei rombododecaedri o dei cubi: o i carpidi hanno forme soltanto approssimativamente geometriche, oppure queste forme non vanno considerate come organi di questi saprofiti, ma solo come cristalli che si trovino incidentalmente assieme a questi esseri organizzati e provenienti dall'emolinfa e dai visceri disfatti dal giallume.

Del resto, per quanto io abbia ricercato su numerosissime sezioni dello spessore di 6 micron, fatte su di un grande numero di vacche nei vari stadi della malattia, non mi è stato possibile, nonostante tutta l'anima buona volontà, di rintracciare le forme di organizzazione descritte dal DEL GUERCIO, come pure non sono riuscito a rinvenire nell'interno dei poliedri nessun corpicciolo che potesse far pensare all'esistenza di cocchi ovoidali.

Concludendo: se facendo un atto di fede posso ammettere l'esistenza di questi Entomococchi, considerandoli semplicemente come dei saprofiti che in vario grado concorrono alla decomposizione dei bachi morti di giallume, in base ai risultati delle mie ricerche non posso assolutamente accettare l'ipotesi — finora del tutto infondata — che essi siano gli agenti patogeni specifici della malattia.

C) *Teorie basate sull'azione patogena di virus filtrabili.*

Chi per primo dimostrò l'esistenza di un virus filtrabile capace di trasmettere il giallume, fu il PROWAZEK, che nel 1907 compì degli importantissimi studi, che illustrerò più avanti parlando dell'ultimo gruppo di teorie.

Dopo l'insuccesso dei loro studi sul *Gyrococcus flaccidifex*, gli americani GLASER e CHAPMANN vollero le loro ricerche verso i virus filtrabili, e dopo avere avuto all'inizio qualche risultato negativo, riuscirono finalmente nel 1913 a trasmettere la malattia impiegando il liquido proveniente dall'emolinfata terata dal giallume, previamente diluito con 5 volumi di acqua distillata e filtrato con candele Berkefeld N. Attraverso questo filtro il virus passava assai difficilmente ed era addirittura arrestato dalla candela Chamberland F. Da questo fatto gli autori americani deducevano che le dimensioni del virus fossero comprese fra quelle dei pori delle candele Chamberland-Pasteur e dei filtri Berkefeld N.

Queste osservazioni furono confermate dagli sperimentatori successivi, ed è probabile che i risultati negativi ottenuti da HAYASHI e SAKO, siano dovuti ad una diluizione eccessiva alla quale furono sottoposti i liquidi virulenti prima della filtrazione.

Alla stessa conclusione di GLASER e CHAPMANN venne anche il Prof. ACQUA nel 1918, che ammise allora essere il giallume una malattia parassitaria ed infettiva dovuta ad un virus filtrabile.

Il Prof. ANDRÉ PAILLOT, direttore della Stazione Entomologica del Sud Est (Lione) si occupò particolarmente di questi studi che raccolse e completò in un'ultima pubblicazione sul giallume e sulla dissenteria. Questo scienziato compì particolarmente le sue ultime ricerche nell'Ardèche, dove in questi ultimi anni la malattia del giallume è stata oltremodo cruenta ed ha compromesso seriamente gli allevamenti.

Assai interessanti sono gli studi compiuti dal PAILLOT all'Istituto Pasteur, dove sperimentando con soluzioni di materiale virulento a diverse concentrazioni, trovò una percentuale di diluizione al di là della quale la malattia veniva trasmessa in forma oltremodo attenuata o non veniva trasmessa affatto, e che chiamò « diluizione limite ». Con soluzioni dal 10 al 15%

ebbe la comparsa delle macchie caratteristiche al 7.^o giorno dall'inoculazione, mentre i bachi trattati con soluzioni all'1/1000 presentavano i primi sintomi soltanto al 9.^o giorno ed in misura assai modesta. Al di là di questa diluizione i bachi resistevano alla malattia e tessevano normalmente il loro bozzolo. Però il PAILLOT non attribuisce un valore assoluto alla concentrazione di 1/1000, perché questo tasso-limite può variare nei diversi stadi di sviluppo della larva, o per una sua naturale resistenza all'infezione.

Per dimostrare che l'agente del giallume è un virus filtrabile, il PAILLOT cita diverse sue ricerche: I^o) Esperienze di filtrazione. Le prime furono condotte nel 1913 con candele di Chamberland L1, L2, L3, che erano progressivamente provviste di pori più grossi; ebbene col liquido ottenuto filtrando attraverso le candele L1 e L2 non gli fu possibile trasmettere la malattia, mentre con la candela L3 a pori più grossi, ottenne l'infezione normale. Nelle esperienze fatte con candele di Chamberland di nuovo tipo, in cui il numero più fine è l'LL7, ottenne la completa trasmissione con quelle di tipo L2, dopo un periodo d'incubazione di 7-8 giorni. — II^o) Esperienze di centrifugazione. Centrifugando per 15 minuti a 6000 giri al minuto, ottenne la separazione della parte torbida del liquido contenente i granuli poliedrici da quella limpida portante in sospensione il virus filtrabile. Ebbene, infettando con la parte limpida del liquido centrifugato, il processo morboso si manifestava in un modo assai più imponente che operando con la porzione torbida, quindi verosimilmente i poliedri avrebbero un potere infettivo assai limitato e dovuto probabilmente al virus stesso che può rimanere aderente ai cristalli. — III^o) Osservazioni ultramicroscopiche su fondo nero. Queste ricerche furono condotte con condensatore a fondo nero di Leitz ed oculari periplanatici N. 15 e N. 25. Nel campo si osserva così una parte chiara centrale in cui si trovano dei granelli brillanti dotati di movimenti browniani; ma oltre a questi vi sarebbero dei granuli piccolissimi debolmente colorati, privi di moto proprio e che mostrebbero soltanto un lento movimento vibratorio. Questi corpuscoli si troverebbero nel liquido filtrato con candele L2, mentre mancherebbero in quello filtrato attraverso le candele L5, per cui le loro dimensioni dovrebbero essere inferiori a 100 millesimi di micron.

In base alle sue osservazioni ultramicroscopiche, il PAILLOT così conclude: « De ces différentes observations, répétées un « assez grand nombre de fois, on peut conclure à l'existence, « dans les corps des vers à soie atteints de grasserie, d'un para- « site cytotrope ultramicroscopique, se multipliant principale- « ment dans les noyaux de certaines cellules de l'organisme et « capable d'y déclancher les processus morbides qui aboutissent « à l'élaboration, au dépens de la substance nucléaire, des cor- « puscules polyédriques ».

Il PAILLOT classifica questi presunti organismi in un gruppo intermedio fra i batteri e i protozoi, al quale dà il nome di *Borellina*, e di cui distingue tre specie diverse: *Borellia bombycis*, misurante meno di 100 millesimi di micron, e che produrrebbe il giallume del Filugello; *B. pieris*, parassita di alcune specie dell'omonima famiglia di Lepidotteri, e misurante una frazione di micron poco diversa da quella della *B. bombycis*; ed infine la *B. brassicae*, propria della Cavolaia, e misurante da 200 a 300 millesimi di micron.

Oltre a questi studi sull'etiologia, il PAILLOT ha condotto anche delle ricerche anatomo-patologiche, che sono assai più estese ed accurate di quelle condotte nel 1906 dal CONTE e LEVRAT, ma che sono incomplete limitandosi alle alterazioni nucleari iniziali e finali, senza trovare i termini di passaggio dalle prime alle seconde. La moltiplicazione del parassita ultramicroscopico avverrebbe nell'interno dei nuclei delle cellule recettive (che secondo l'Autore francese sarebbero soltanto le ipodermiche, le adipose e le peritracheali, mentre le ghiandolari e le serigene, oltre alle muscolari e alle nervose sarebbero refrattarie). Nelle cellule si avrebbero successivamente le seguenti alterazioni: distruzione precoce del condrioma, i cui condrioconti si frammentano e si trasformano in granuli di grossezza variabile; si avrebbe poi la frammentazione dei nuclei fucsinofili. La dispersione di questi frammenti e la scomparsa totale o parziale della sostanza nucleo-plasmica; per un complesso di alterazioni la cromatina nucleare perde la sua struttura e si condensa sotto forma di masse intensamente cromatofile: alla superficie di queste masse si ha la precipitazione della sostanza nucleo-plasmica sotto forma di granulazioni fucsinofile; infine si avrebbe direttamente, a spese della sostanza nucleare la formazione di corpuscoli rombododecaedrici, e per la distruzione

del nucleo ripieno di corpuscoli si arriverebbe alla messa in circolazione di questi nel sangue.

Per quanto concerne l'epidemiologia, la trasmissione da individuo a individuo della malattia, avrebbe luogo per mezzo del nutrimento imbrattato dal sangue che scola dalle ferite dell'epidermide; la trasmissione della poliedria da una generazione all'altra avrebbe luogo con l'impiego di attrezzi da allevamento non disinfettati ed anche per via ereditaria, perchè il virus può passare dall'organismo della femmina infetta all'uovo.

Io credo che in complesso le ricerche del PAILLOT, per la serietà con cui vennero condotte, possano essere accettate nella sostanza, se non nelle interpretazioni. Questi studi, benché incompleti, rappresentand un nuovo passo avanti nelle nostre conoscenze sulla poliedria, perchè dimostrano che almeno in certi stadi della malattia esiste un virus capace di trasmetterla; inoltre le esperienze di centrifugazione costituiscono una forte argomentazione contro le teorie che danno un significato etiologico ai granuli poliedrici, perchè oltre a mettere in evidenza la virulenza della parte limpida del liquido, dimostrano quanto sia debole l'attività della porzione torbida, contenente i cristalli con una quantità residua di virus, al quale si dovrebbe appunto l'azione patogena.

Però considero troppo arrischiata l'opinione dello scienziato francese che vuol considerare le particelle intraviste al microscopio come dei veri parassiti; e trovo più arrischiato ancora — per non dire insostenibile — il voler dare dei nomi di generi e specie, ossia una vera nomenclatura lineana, a queste particelle brillantissime, delle quali non è ancora possibile dare una descrizione neppure sommaria dei caratteri propri e distintivi, e di cui non conosciamo con sufficiente approssimazione neppure le dimensioni!

Il RÉBOUILLON, Direttore della Stazione Sericola di Draguignan, ammise anch'egli che l'agente del giallume fosse un virus filtrabile, ed avendo trovato in farfalle di *Bombyx mori* affette da poliedria, dei granuli più piccoli dell'ordinario, ma presentanti la forma caratteristica di rombododecaedri, sostiene la trasmissibilità ereditaria della malattia; spiegò inoltre la piccolezza delle granulazioni e la minori dimensioni che presentano cellule e nuclei nella farfalla adulta. Propose quindi, allo scopo di combattere il giallume, un sistema di selezione analogo a quello impiegato per la pebrina. Ma la pubblicazione di questi

studi suscitò parecchie contestazioni da parte del PAILLOT, al quale il RÉBOUILLON replicò, affermando d'aver osservato ulteriormente la presenza in alcune farfalle di granuli poliedrici di dimensioni ordinarie.

Un grande rumore nel campo degli studiosi fu suscitato recentemente dal Prof. CAMILLO ACQUA, che dopo avere sostenuto in un primo tempo la natura parassitaria del giallume, espone delle idee tutt'affatto nuove sulla genesi di questa malattia.

I primi studi compiuti dall'attuale Direttore della Stazione di Bachicoltura di Ascoli Piceno avevano avuto per oggetto la determinazione della durata del virus, ed avevano accertato che questo era capace di manifestare la sua virulenza dopo un anno e mezzo ed eccezionalmente due anni dalla morte della larva. Questi risultati hanno grande importanza, perchè mettono in evidenza la possibilità del perpetuarsi dell'infezione, se non si abbia, prima dell'allevamento, l'avvertenza di compiere le opportune disinfezioni.

Anche prima di emettere la sua nuova teoria, l'ACQUA aveva sempre negato la trasmissibilità ereditaria della malattia, perchè la quasi totalità delle crisalidi infette morivano prima della schiusura dal bozzolo; si limitava ad ammettere soltanto la trasmissibilità di una predisposizione alla malattia, alla quale dava il valore di carattere mendeliano. Nel 1926 ebbe occasione di criticare gli studi del RÉBOUILLON e del TEODORO sulla trasmissibilità ereditaria della malattia, ed ammettendo nuovamente la predisposizione, affermò che solo determinate condizioni possono presiedere all'esplosione della malattia: così l'impiego di alcune razze particolarmente sensibili; un ambiente troppo umido, che come riuscì a dimostrare in allevamenti sperimentali, è particolarmente propizio all'esplosione d'infezioni violente di giallume; così alcune età larvali, delle quali i periodi della terza e della quarta muta sarebbero i meno resistenti all'attaccamento della malattia. Infine, per combattere l'ipotesi di una forma congenita del giallume, riuscì a dimostrare sperimentalmente (con la collaborazione del Dr. DELLA CORTE in allevamenti compiuti in Campania) che impiegando un medesimo seme proveniente da razze soggette al giallume, si possono ottenere degli allevamenti indenni dalla malattia nelle zone di collina, mentre la malattia infierisce negli allevamenti della pianura.

Fu nel 1926 che comparve la nuova teoria che suscitò grande scalpore e che valse al suo Autore una vivace polemica col PAILLOT. Il Prof. ACQUA riprese i recenti studi di CARREL e di ROUS sulla genesi dei carcinomi, dai quali risulterebbe che sotto l'azione di certi stimolanti (acido arsenioso, derivati del catrame ecc.) si verrebbero a produrre, in certi tessuti dei mammiferi, delle neoplasie capaci di produrre delle sostanze simili ai virus; questi virus agirebbero in modo specifico sopra un determinato genere di cellule e si riprodurrebbero indefinitamente in presenza di queste. Infatti iniettando il virus di ROUS è possibile produrre dei sarcomi, ed il CARREL sostiene che questo principio filtrante venga fabbricato dalle cellule stesse per un fenomeno di autocatalisi.

Orbene, anche il giallume sarebbe generato da un virus autocatalitico, che naturalmente non si verrebbe a formare sotto lo stimolo di eccitanti chimici, ma sotto l'influenza di particolari condizioni d'ambiente (località basse, umide, poco areate ecc.) che causerebbero uno squilibrio nel metabolismo cellulare e dal quale appunto prenderebbe origine la malattia. Con questa teoria si verrebbe a spiegare uno dei principali fatti epidemiologici, e cioè la comparsa improvvisa della malattia sopra un gran numero di bachi, senza che questa abbia uno sviluppo graduale nell'allevamento, come succede per la maggior parte delle epizootie. Questa sarebbe l'origine primaria della malattia, mentre la trasmissione da individuo a individuo non sarebbe che una genesi secondaria. Quindi, se il giallume non ha nulla a che vedere con i carcinomi di CARREL, è però lo stesso principio che spiega la genesi della malattia; e del resto questo principio è stato recentemente ammesso dal CENTANNI per spiegare la natura della peste aviaria, e dal BEJHNICK per *mal del mosaico* del tabacco.

L'ACQUA nega quindi l'esistenza del presunto parassita scoperto dal PAILLOT, e conclude che la propagazione della malattia si può spiegare non con l'infezione per opera di parassiti, ma con la trasmissione di quella speciale sostanza che poi nell'organismo sarebbe capace di riprodursi per autocatalisi.

Naturalmente questa teoria fu assai discussa dal PAILLOT, al quale l'Autore italiano replicò negando l'infezione come mezzo principale di propagazione della malattia: l'Autore vi sono plaghe infestate dal giallume, nonostante che vi venga im-

piegato ottimo seme proveniente da accurate selezioni. II^a) Vi sono zone asciutte e ventilate di collina in cui il giallume produce danni insensibili, senza che si abbiano tutte le precauzioni e le cure che si prodigano agli allevamenti nelle suddette regioni e di pianura. III^a) La comparsa della malattia è anche collegata a particolari condizioni, come le cure d'allevamento, l'ampiezza e l'esposizione dei locali ecc. IV^a) Il seme proveniente da allevamenti decimati dal giallume non ha nessuna influenza sul raccolto dei bozzoli, come è stato appunto dimostrato in alcuni allevamenti della Stazione Bacologica di Ascoli Piceno.

L'ACQUA, pur avendo constatato l'esistenza delle granulazioni ultramicroscopiche, nega l'esistenza di un parassita, perché il fatto che filtrando attraverso candele a pori più piccoli, si toglia la virulenza del liquido, non costituisce un argomento abbastanza solido contro la teoria dei virus autocatalitici; infatti gli enzimi elaborati da cellule sarebbero dei biocolloidi, e come tali si può ammettere per questi l'esistenza di sostanze contenute nel sangue, capaci di dare luogo in presenza di detti colloidi a dei composti di assorbimento; ed appunto per queste sostanze-tampone del sangue, il virus autocatalitico verrebbe trattenuto dalle candele a pori più sottili.

Se però il Prof. CAMILLO ACQUA riesce così a spiegare molti fenomeni oscuri della malattia, non appoggia d'altra parte le sue idee sui virus autocatalitici con dei fatti sperimentali; e quindi, allo stato attuale delle nostre conoscenze, la sua rimane ancora una brillante ed affascinante teoria, ma null'altro che una teoria.

D) *Teorie basate sull'azione di speciali esseri aventi il carattere di virus filtrabili, ma che presentano stadi di sviluppo visibili al microscopio.*

Il PROWAZEK, che nel 1907, aveva dimostrato l'esistenza di un virus filtrabile capace di trasmettere il giallume ai bachi sani, non si limitò a questi studi, ma compì delle importantissime osservazioni che illustrò estesamente nel 1912. Secondo questo Autore nelle cellule adipose di larve affette da giallume, vi sarebbero dei nuclei ipertrofici alla periferia dei quali si forma uno strato irregolare, non continuo di sostanza d'origine verosimilmente cromatica, d'aspetto granuloso e di grossezza variabile. Nella regione centrale si può notare una inclusione metacroma-

tica a forma di ferro di cavallo; in vicinanza di queste inclusioni si possono notare uno o due ammassi di granuli minutissimi, che si presentano sotto l'aspetto di zooglee. Questi granuli non sarebbero che forme intermedie di un parassita e passerebbero nel sangue dopo la distruzione delle cellule. Per mettere in evidenza questi granuli nel sangue bisogna allestire dei preparati per striscio, colorandoli col metodo Giemsa; si vedrebbero così delle formazioni chiare, al centro delle quali si troverebbe un corpuscolo violaceo simile ad un cocco che nel dividersi prenderebbe la forma di manubrio. Secondo il PROWAZEK, questi cocci non sarebbero che elementi di un nuovo protozoo, simili a quelli osservati nel decorso di certe malattie dei Vertebrati superiori (vaiolo, idrofobia, epitelioni degli uccelli ecc.) ed appartenenti al tipo dei Pseudoprotzoi ed alla classe dei Clamidozoi. Il parassita del giallume sarebbe appunto un protozoo di questo gruppo, ed il PROWAZEK gli dette il nome di *Chlamydozoon bombycis*. Il clamidozoo fu osservato dal PROWAZEK anche nel protoplasma delle cellule sanguigne, in cui fu messo in evidenza mediante il colorante di Loeffler, usato per la figlia dei batteri.

Questa teoria clamidozoaria fu sostenuta dagli autori tedeschi ed estesa ad alcune forme di giallume di altri insetti.

Così il BOHN, nel 1910 trovò nelle larve di *Pergesa elpenor* la presenza d'inclusioni simili a quelle osservate nel Baco da seta affetto da giallume, e le ritenne dovute ad un protozoo simile a quello del *Bombyx mori*.

In seguito MAX WOLF, considerò la « Wipfelkrankheit » della *Limantria monacha* e la « Raupenpest » del *Bupalus piniarius* e delle *Sphinx*, come delle clamidozoonosi complicate con infezioni batteriche.

Il KNOCHE, riprendendo nel 1912 gli studi sulla « Wipfelkrankheit », affermava d'aver trovato nel citoplasma cellulare dei corpuscoli assai rifrangenti, invadenti il nucleo e disposti a catenelle che si disgregano poi, e ricordanti il modo di moltiplicarsi dei microsporidi come il *Nosema bombycis*. I corpuscoli entrerebbero così in circolazione nel sangue, e per fagocitosi verrebbero inglobati nelle cellule sanguigne, dove la loro membrana, dopo un notevole rigonfiamento, scoppierebbe, mettendo in libertà dei corpuscoli infinitamente piccoli e capaci di riprodurre le alterazioni nucleari.

A proposito di queste teorie voglio ricordare quella emessa

nel 1914 dall'italiano NELLO MORI, che studiando il farcino criptococcico del cavallo, emise l'ipotesi che i virus filtrabili non fossero che delle forme di evoluzione di certi blastomiceti. Estendendo questi studi al giallume riuscì ad isolare dal sangue di un baco affetto dalla poliedria, un ifomicete ed alcuni funghi del genere *Cryptococcus* e *Saccharomyces*, ma quest'ultimi sarebbero scarsamente patogeni e potrebbero essere considerati come microbi d'infezione secondaria. Questa teoria venne abbandonata, perchè non sostenuta da argomentazioni abbastanza solide; ma questi studi, che presentano alcune analogie con quelli del DEL GUERCIO, stanno a dimostrare come questi saprofiti occasionali possano effettivamente mostrarsi, senza che possano essere considerati come agenti patogeni.

La tesi del PROWAZEK fu sostenuta ancor recentemente da KOMAREK e BREINDL, che nel 1924 effettuarono nuovi studi sulla poliedria della *Limnoria monacha*, nelle cui larve trovarono le medesime alterazioni nucleari descritte da PROWAZEK. Riguardo ai poliedri, secondo questi autori, vi sono due modi d'originarsi: a) In un nucleo gonfio con inclusioni cromatofile la cromatina residua forma dei piccoli nuclei disposti a cerchio attorno all'inclusione. Questi nuclei secondari crescono lentamente e prendono a poco a poco la forma poliedrica. b) I poliedri possono però originarsi nell'inclusione centrale, dove si forma una sorta di vacuolo, nel quale si sviluppano i rombodecaedri.

KOMAREK e BREINDL, per sostenere la natura clamidozoaria del parassita citarono alcune esperienze, dalle quali risulta:

a) Che è possibile infettare dei bruchi sani impiegando corpuscoli non sterilizzati. b) L'infezione ha pure luogo impiegando un'emulsione di corpuscoli sterilizzati con sublimato corrosivo all'1/100. c) Filtrando attraverso candelette di BERKEFELD l'emolinfina di un bruco ammalato si ottiene un liquido capace di trasmettere la malattia.

Ma se gli studi accurati degli sperimentatori tedeschi portarono nuova luce sulla teoria clamidozoaria di alcune malattie dei Lepidotteri analoghe al giallume, non si estesero alla poliedria del Filigello, per la scarsa importanza che ha l'industria serica in Germania. E siccome le zooglee trovate dal PROWAZEK nelle cellule adipose e linfatiche, non furono confermate da nessuno dei ricercatori recenti, dobbiamo concludere che su questo punto le sue ricerche fossero difettose.

CAPITOLO II.

La teoria del Verson e le deduzioni che se ne possono trarre allo stato attuale delle nostre conoscenze sul giallume.

Il compianto Prof. ENRICO VERSON che fu fondatore e direttore della R. Stazione Bacologica di Padova, occupandosi del giallume, in un primo tempo non dette alcun particolare significato ai granuli poliedrici, e si limitò, come SASAKI e CONTE-LEVRAT, a considerarli come manifestazioni secondarie dell'infezione e di natura ancora ignota. Ma sin dai suoi primi studi il VERSON fu un sostenitore della natura cristallina dei granuli poliedrici. Raccogliendo e decantando numerose volte questi granuli in acqua distillata, egli riuscì a separare i granuli di dimensioni superiori alle normali: questi cristalli vennero conservati a secco per 8 anni, dopo i quali mostravano delle profonde alterazioni nella loro struttura cristallina, ed assumevano « una sembianza raggiata a guisa di sferocristalli composti di « aghi o di laminette convergenti verso un centro comune, e « molti di essi, aprendosi con una fenditura pressochè equatoriale, si sdoppiavano poi come in due bottoni o funghi riuniti « fra di loro da un breve gambo, rendendo così immagine di « veri e propri *dumbbells* ».

Il VERSON non escludeva però la probabilità che, nel cristallizzare, i granuli potessero rinchiudere delle impurità ed impregnarsi così, di un virus circolante che potesse conservarsi e trasmettersi per mezzo dei cristalli.

Nel 1902 questo Autore richiamava l'attenzione degli studiosi su speciali alterazioni della struttura cellulare nell'ipoderma e nelle pareti delle trachee. In queste cellule alterate, al posto del nucleo si vedeva: « ... una specie di vano mal definito e solo parzialmente occupato dal carioplasma ritirato ed « ispessito a corpicciuolo irregolare che smussa in seguito le « apparenti sue asprezze di superficie, sicchè il vano nucleare « alberga allora come un coagulo globoso e tingibile. In altre cellule vicine questo piccolo ammasso isolato sembrerebbe es-

« sersi diviso in due metà uguali dappima, e poi in quattro
« parti, in otto e così via. Sta il fatto ad ogni modo che le cel-
« lule ipodermiche, poco distanti una dall'altra, racchiudono
« nel proprio seno un numero variabile di corpiccioli vescico-
« lari perfettamente uguali tra di loro, entro allo stesso cario-
« plasma: ma tutti più grandi o più piccoli egualmente, a seconda
« del numero maggiore o minore di divisioni che sembrano
« aver già superate ». Il VERNON ebbe l'impressione che il nu-
« mero massimo di questi corpiccioli fosse di 16, ma non escluse
« la possibilità dell'esistenza di un numero maggiore. Ma prima di
« osservare la distruzione della cellula, l'Autore citato notò la pre-
« senza di un granellino brillante nei suddetti corpiccioli vesci-
« colari. « . . . A prima giunta, per verità l'impressione ricevuta
« di queste immagini, fa correre il pensiero alla presenza entro
« gli elementi ipodermici, di una forma parassitaria non ancora
« studiata ».

Però a 14 anni di distanza, in una serie di nuove ricer-
che condotte con la collaborazione del Dr. GRILLANDA, il VER-
SON ebbe la gradita sorpresa di poter confermare il reperto di
tanto tempo addietro, che « . . . nei bachi affetti da giallume ri-
« corre sempre, inammanabilmente, salvo che negli stadi più
« inoltrati del male, in cui i prodotti divisorii del parassita en-
« donucleare si mostrano tutti uguali e ridotti ormai all'ultima
« fase di cocci vescicolari, contenenti spesso un granellino
« brillante che a maggiore ingrandimento si rivela in forma di
« minutissimo cristallo poliedrico; mentre le fasi intermedie,
« onde il contenuto endonucleare si divide via via in 2, 4, 8, 16
« e forse anche più vesciclette sferiche, s'incontrano e si scorgo-
« no solo i primissimi inizi dell'infezione; inizi che all'infuori di
« un'accurata analisi microscopica, sfuggirebbero del resto anche
« al più consumato coltivatore di bachi ».

E per quanto concerne la natura dei granuli poliedrici, il
VERSON scrive: « . . . Allo stesso modo che nei bachi colpiti da
« calcino la Botrite bassiana inizia una produzione in massa di
« ossalato doppio di magnesio e di ammonio, tanto da convertire
« il cadavere della vittima in un agglomerato cristallino irto di
« punte e di spine variamente incrociate, allo stesso modo i cocci
« del giallume sembrano estrarre e preparare dai tessuti circo-
« stanti un prodotto di ricambio di cui oggi conosciamo la carat-
« teristica forma cristallina nel granulo poliedrico, ma di cui

« scopriremo senza dubbio presto o tardi anche la composizione
« chimica. Questo prodotto di ricambio elaborato entro ai sin-
« goli cocci del microbio, entro agli stessi cocci si consolida e si
« rapprende in un minimo granulo poliedrico (il punto brillan-
« te! . . .) il quale a sua volta ingrossa, come il cristallo di clo-
« ruro sodico in una soluzione concentrata dello stesso sale ac-
« quista dimensioni sempre maggiori senza alterare la sua tipica
« forma. Ingrossando, il granulo poliedrico viene colmando via
« via e rimpiazzando tutto il contenuto del cocco vescicolare di
« cui assottiglia, distende e sfonda probabilmente l'involucro
« esterno, fino a renderlo evanescente innanzi all'occhio dell'os-
« servatore; ovvero fino a lacerarlo e a disperderlo irremissi-
« bilmente. E' ovvio l'ammettere dunque che i granuli polie-
« drici, o disseminati fra i vari tessuti del baco colto da gial-
« lume, o sospesi e travolti dagli umori circolanti in esso, sono
« in gran parte già spogli del sacco vescicolare organizzato
« (cocco), che li aveva visti nascere nel proprio seno ».

« E questi grani sono naturalmente innocui, come lo sono
« del resto i residui della loro triturazione in mortaio di agata,
« efficace egualmente a frangere i poliedri cristallini, ovvero a
« squarciare e a distruggere i cocci vescicolari che li albergano,
« innocui come lo diventano del pari le poltiglie torbide dei
« bachi colpiti da giallume, in seguito a filtrazione attraverso
« candele di caolino poroso, ovvero per effetto del riscalda-
« mento a 90° C. La virulenza posseduta da cadesti fluidi allo
« stato nativo, risiede evidentemente nei singoli cocci che cin-
« dono ed involuppano, ciascuno per proprio conto, quel gra-
« nulo poliedrico che covano ed incrementano in loro stessi,
« fino a restarne completamente ingombri e soffocati. Il gial-
« lume è dunque senza dubbio, anch'esso, un'affezione paras-
« sitaria, siccome tale debb'essere ritenuta la macilenza ed il
« calcino ».

Nonostante che queste ricerche fossero condotte in tempo
assai recente (nel 1917) gli studiosi del giallume non si occupa-
rono affatto di controllare queste osservazioni, e preferirono
invece emettere delle nuove ipotesi, talora trascendentali,
mentre non sarebbe stato difficile riprendere gli studi del
VERSON, e vedere fino a qual punto essi fossero veraci.

Questo appunto è stato l'oggetto delle mie ricerche, con le
quali ho potuto confermare l'esistenza dei cocci vescicolari, la

cui presenza ho potuto constatare non solo nei tessuti epidermico, peritracale e adiposo, ma anche in altri tessuti che da molti autori erano stati considerati refrattari al giallume. Di queste mie ricerche parlerò estesamente nel capitolo seguente, ma voglio fin d'ora far notare che nei cocchi vescicolari non ho mai trovato i puntini brillanti descritti dal VÉRON, e che non sarebbero, secondo lui, che la prima fase di formazione dei granuli poliedrici. Con questo però non vengo a negare l'ipotesi del VÉRON, perchè verosimilmente il granulo poliedrico deve avere uno sviluppo assai rapido, e dev'essere quindi piuttosto rara la fortuna di trovare questa fase iniziale.

Se però le osservazioni del VÉRON collimano con le mie, e se ebbi la ventura di ampliarle alquanto — sul terreno morfologico — le osservazioni dell'illustre Maestro di Padova, tuttavia allo stato attuale delle nostre conoscenze, per quanto riguarda la sicura esistenza di una forma filtrabile del microrganismo della malattia, non è possibile ritenere completa la spiegazione e l'interpretazione data dal VÉRON per quanto concerne l'epidemiologia del giallume.

L'esistenza dei cocchi vescicolari non contrasta affatto gli studi recenti sui virus filtrabili, bensì, come giustamente osserva il GRANDORI «... nessuna contraddizione esiste fra i due fatti, «perchè è ammissibilissimo che nel cocco vescicolare debbasi ravvisare una forma matura fra i vari stadi di sviluppo di «un supposto microrganismo, e che altri stadi vi siano, tanto «più piccoli dei cocchi ordinari, da poter passare attraverso i «pori delle candele e capaci di riprodurre l'infezione». Così si esprimeva il mio Maestro nel 1924, riferendosi agli studi di PROWAZEK e della sua scuola; ma delle conclusioni analoghe si possono formulare ancor oggi di fronte agli studi di ACQUA e di PAILLOT.

Tenendo conto della sperimentazione moderna e dei risultati relativi, nonché delle conclusioni personali dei singoli autori, l'etiologia del giallume può essere spiegata in tre modi diversi:

1°) Che l'agente del giallume sia un Clamidozoo, in cui la forma di propagazione sarebbe filtrabile attraverso le candele di Chamberland e di Berkefeld, e le cui dimensioni sarebbero appunto quelle determinate in modo approssimato dal PAILLOT. I cocchi vescicolari non sarebbero che una forma intermedia che

si verrebbe a formare in presenza dello speciale substrato nutritivo offerto dalla cromatina nucleare. Questi cocchi vescicolari produrrebbero dei nuovi esseri filtrabili, ma in questo processo di riproduzione muterebbero profondamente la loro composizione chimica, perchè si avrebbe la perdita di alcuni elementi costituenti la sostanza nucleo-proteica, come il fosforo, il solfo e buona parte del calcio e dell'azoto, ecc., a beneficio dei suddetti esseri filtrabili. Rimarrebbe così soltanto un composto azotato, che mancando di alcuni elementi necessari alla vita, sarebbe incapace di continuare le funzioni vitali del cocco vescicolare e ne determinerebbe così la morte, mentre la sostanza residua assumerebbe la ben nota struttura di granuli poliedrici. I cristalli non sarebbero che le vestigia di queste forme effimere del parassita, che rappresentano però una fase necessaria per il loro perpetuamento. Infatti durante il periodo in cui è più intenso il processo di nutrizione, i corpuscoli filtrabili darebbero origine ai cocchi vescicolari, in seno ai quali si verrebbero a produrre nuovi virus. I corpuscoli filtrabili non sarebbero dunque che il mezzo di diffusione nello spazio, mentre il cocco sarebbe la forma capace di assicurare al parassita la perpetuazione nel tempo.

La mancanza di nuclei colorabili con mezzi tecnici ordinari non costituisce un argomento contro l'ipotesi della loro vitalità, perchè in queste forme viventi possiamo ammettere una struttura diversa da quella degli esseri finora conosciuti, come del resto per altri clamidozoi tale struttura atipica non è più considerata argomento sufficiente ad infirmare la dottrina che li ritiene microrganismi animali unicellulari patogeni specifici. Potrebbero esistere in questo clamidozoo delle granulazioni o filamenti mitocondriali, ma di dimensioni così piccole da non essere visibili al microscopio con i più forti ingrandimenti.

Questo parassita sarebbe dunque un clamidozoo, ma è da escludere che si tratti di quello descritto da PROWAZEK, perchè non presenta mai la formazione di zooglee. Piuttosto si potrebbe pensare ad un parassita assai vicino a quello descritto nel 1924 da KOMAREK e BRENDL per la *Limantria monacha*, che, come quello da me osservato, avrebbe le forme visibili al microscopio disposte a cerchio alla periferia del nucleo delle cellule parassitizzate; ed a parte l'ipotesi dei citati autori tedeschi, che la forma poliedrica possa venire assunta in seguito allo sviluppo

dei « nucleoli », si potrebbe ammettere per il parassita della *Limantria* una struttura assai vicina a quella del parassita del *Bombyx mori*.

II*) La malattia del giallume potrebbe essere dovuta ad un parassita ultramicroscopico che determinerebbe delle alterazioni nucleari manifestantisi sotto forma di cocci vescicolari, la cui sostanza, aumentando di concentrazione per un fenomeno osmotico, assumerebbe la struttura cristallina. Con questa spiegazione si verrebbe ad ammettere per intero la teoria del PAILLOT, inserendovi l'ipotesi suddetta sulla natura dei corpuscoli poliedrici.

III*) Ammettendo infine i fondamenti della teoria di ACQUA, i cocci vescicolari potrebbero essere considerati come delle formazioni conseguenti ad un alterato metabolismo delle cellule, e sarebbero forse essi la sede dove si produrrebbero i virus autocatalitici, che allontanandosi dalle formazioni originarie, ne lascerebbero alterata la composizione chimica, da cui conseguirebbe la cristallizzazione della sostanza residua.

Di queste interpretazioni, la più seducente, e che è oggetto della mia personale convinzione, è quella del clamidozoo, la quale mi appare la più logica, perchè è la sola che sia basata su un fatto reale: la presenza di corpiccioli endonucleari nelle cellule di alcuni tessuti del baco ammalato; ed è anche la più verosimile perchè offre una spiegazione del giallume, analoga a quella ammessa per altre malattie ed anche perchè non poggia su troppe argomentazioni astratte ed arbitrarie.

Ma d'altra parte questa spiegazione, allo stato attuale delle nostre conoscenze, non può essere accettata con piena sicurezza, perchè manca ancora di solide argomentazioni di fatto e di una dimostrazione incontrovertibile, specialmente per quanto concerne la trasmissione del clamidozoo e il nesso che può esistere fra questo e la formazione dei granuli poliedrici.

Quindi, ligio al principio di non concludere troppo precipitosamente, preferisco prospettare le conclusioni che s'affacciano più spontanee, e mi astengo dal sostenere in modo definitivo ed assoluto alcuna di esse, in attesa che ulteriori ricerche possano portare piena luce sull'etiologia del giallume.

CAPITOLO III.

Ricerche personali.

Nelle mie ricerche mi sono servito di materiale raccolto nelle diverse annate, e conservato in alcool o in formalina. Non è il caso di discutere la cura con la quale furono raccolti *vacche e lustrini*; basti dire che il materiale mi fu fornito dal Prof. GRANDORI, che ne aveva curato la raccolta e la conservazione da alcuni allevamenti del 1928; egli mi fornì anche alcuni *lustrini* conservati personalmente dal compianto Prof. VERNON fin dal 1914, materiale che il GRANDORI aveva per lunghi anni conservato come prezioso cimelio del Maestro di Padova.

Per quanto concerne l'allestimento dei preparati, dirò innanzi tutto che ho dovuto scartare gran parte delle *vacche* conservate in formalina, perchè con tale metodo di fissazione i corpi conservati restano assai fragili e non permettono l'esecuzione di intere sezioni di anelli addominali, tant'è vero che col poco materiale che ho potuto utilizzare, ho dovuto limitarmi a compiere delle sezioni di soli pleopodi. Ottimi risultati ho avuto invece impiegando le larve fissate con acido cromo-acetico, che indurisce i tessuti senza privarli di quell'elasticità che è tanto necessaria durante il taglio al microtomo.

Vacche e lustrini già fissati con acido cromoacetico furono portati, attraverso successivi passaggi in alcool a diverse concentrazioni, nell'alcool assoluto; da questo alla miscela di alcool e benzolo, indi in benzolo puro; infine, attraverso la miscela benzolo-paraffina, furono portati in paraffina pura, dove rimanevano per circa 2 ore alla temperatura di 60° C.

Come mezzo d'inclusione ho ottenuto i migliori risultati con paraffina fusibile a 52° - 54° C., perchè quella fondente a temperatura superiore, riuscendo più fragile, non mi consentiva di preparare delle buone sezioni, e produceva continue interruzioni nei nastri, mentre la paraffina fusibile a bassa temperatura produceva nelle sezioni la formazione di molte pieghe che non si potevano poi più distendere.

Riguardo all'uso del microtomo, ho ottenuto i migliori risultati con sezioni di 6 micron, mentre con spessori minori riesce troppo difficile avere dei nastri completi. Oltre ai piccoli microtomi a mano, mi ha servito il grande microtomo Sartorius a biella e manovella e a guida d'acciaio, col quale oltre a intere sezioni di anelli addominali nel senso trasversale, ho potuto compiere sezioni sagittali di più segmenti, e addirittura di interi bachi.

Nella colorazione dei preparati ho avuto i migliori risultati impiegando l'Ematossilina Carazzi come colorante nucleare, mentre per le colorazioni plasmatiche ho usato il Rosso Congo, e l'Orange G, usando anche simultaneamente questi due colori plasmatici su uno stesso preparato. Ciò mi è riuscito assai utile, perchè il Rosso Congo, oltre a conferire una tinta di fondo al protoplasma cellulare, colora intensamente la cuticola chitinoso dell'epidermide, la massa del secreto serico, ed il sottile strato chitinoso che tappezza la parete interna delle trachee. L'Orange G, invece conferisce una tinta spiccata al protoplasma delle cellule di alcuni organi, come ad es. le gonadi e le ghiandole della seta, oltre a dare una tinta uniforme alle fibre muscolari.

Ho pure sperimentato l'Ematossilina di Heidenhein, ed a proposito di questo metodo di colorazione dirò che mi sembrano assai strane le conclusioni tratte dagli autori che se ne sono serviti come principale mezzo d'indagine. Così il PAILLOT afferma che i granuli poliedrici si colorano in nero; effettivamente tale colorazione è raggiunta soltanto quando l'intensità della tinta è tale da non lasciare distinguere nessuna traccia dell'organizzazione istologica; invece, decolorando ad un punto tale da poter differenziare completamente la struttura cellulare, i cristalli appaiono trasparenti e soltanto leggermente ingialliti dal colorante. Se l'Ematossilina di Heidenhein è considerata come il re dei coloranti ed il suo uso si presta per la colorazione di preparati che debbono essere microfotografati, per le nostre indagini essa non ha notevole importanza, specialmente perchè non mette in rilievo le alterazioni nucleari, che finora non vennero mai illustrate completamente da nessun autore, e che io stesso ho potuto mettere in rilievo solamente mediante l'impiego dell'Ematossilina Carazzi.

Per dare alle colorazioni impiegate l'intensità più acconcia,

usando i coloranti nelle ordinarie concentrazioni, ho dato ai bagni nei singoli coloranti la durata di 15 minuti, facendoveli passare nel seguente ordine: Ematossilina Carazzi, Rosso Congo ed Orange, lavando naturalmente fra un bagno e l'altro in acqua di fonte e in acqua distillata.

Dopo avere così brevemente descritto i procedimenti seguiti nell'allestimento dei preparati microscopici, passerò ad illustrare le alterazioni cellulari che ho osservato in tessuti ed organi diversi.

a) *Le alterazioni del tessuto epidermico.*

Questo tessuto è uno dei primi a presentare le alterazioni dei nuclei, ma prima ancora di manifestarle, mostra un fenomeno precursore delle alterazioni stesse. Infatti la cuticola chitinoso, si stacca dallo strato cellulare, e si viene così a formare una specie di manicotto vuoto, che più tardi, in uno stadio avanzato della malattia, per alcune rotture che si presentano nello strato cellulare, viene a riempirsi del liquido sanguigno nel quale sono natanti i ben noti cristalli.

Dopo questo distacco della cuticola si manifesta un ingrossamento dei nuclei, che tosto riducono la loro cromatina ad un sottile strato periferico e ad un coagulo centrale, e nella zona libera che rimane fra queste formazioni cromatiche, compare rapidamente uno strato continuo di cocchi vescicolari disposti a corona e che si presentano debolmente ed uniformemente colorati dall'Ematossilina Carazzi (fig. I, a). In brevissimo tempo, internamente a questa corona di cocchi, si formano degli altri elementi vescicolari, mentre il coagulo di cromatina si riduce ancora (fig. I, b), finchè scompare completamente; allora il nucleo appare ancor più rigonfio e completamente ripieno di corpuscoli sferici (fig. I, c), dei quali però non è possibile stabilire il numero in ciascun nucleo, perchè nella sezione microscopica si può osservare solamente uno strato di 6 micron di spessore, mentre il nucleo così dilatato può raggiungere il diametro di 20 e più micron, e cioè parecchi strati di cocchi. Si può però calcolare approssimativamente che il numero massimo di 32 cocchi, ritenuto dal Verson, sia facilmente raddoppiabile a 64, ma non è possibile che questo numero sia di gran lunga

superato, per il limite imposto dai nuclei ipertrofizzati, che non possono dilatarsi al di là di un certo diametro senza sfasciarsi.

Dalle misurazioni compiute mi risultano per i cocci, dei diametri variabili da 2 a 2.5 e a 3 micron, ma credo che queste differenze siano ancor meno sensibili, perchè non tutti i cocci differenze siano ancor meno sensibili, perchè non tutti i cocci sono sezionati secondo un circolo massimo, ma molti sono tagliati soltanto secondo una calotta, e così si spiegherebbero appunto le differenze viste, per cui possiamo ammettere che normalmente il diametro, si aggiri sui 3 micron.

Non mi è stato ancor possibile di trovare degli stadi di passaggio dai cocci vescicolari ai granuli poliedrici; probabilmente la cristallizzazione dev'essere rapidissima, perchè a fianco dei nuclei ancor pieni di cocci vescicolari, si vedono frequentemente dei nuclei già pieni di cristalli che si presentano ancor circondati dall'involucro del cocco, ma che sono assai ben distinguibili da questi per la loro accentuata rifrangibilità, che si manifesta con rapidi lampeggiamenti, muovendo lievissimamente la vite micrometrica; cambiando invece rapidamente la messa a fuoco sopra un preparato mostrante dei cocci vescicolari, il suddetto fenomeno non si verifica affatto. A questo proposito dirò anche che non mi è stato possibile controllare la presenza del granellino brillante nei cocci. Soltanto una volta vidi qualche cosa di simile; però il fatto di non aver più potuto ripetere tale osservazione mi fa presumere che si trattasse di un'impurità; in ogni modo bisogna ammettere che il punto brillante debba assumere le dimensioni ordinarie in tempo brevissimo, per cui riuscirebbe assai difficile sorprendere la presenza del granellino iniziale; e non sarebbe neppure da escludere la possibilità che durante i trattamenti a cui si sottopongono le larve per la fissazione, i cocci contenenti il granellino assumano la definitiva struttura cristallina, ed il liquido fissativo per la sua differente concentrazione determini dei fenomeni osmotici, aiutando così la stabilizzazione dei cristalli. Del resto il VERNON ordinariamente usava l'acido picro-solforico come fissativo, e può darsi che tale sostanza determini la precipitazione della sostanza cristallizzabile.

Infine, dalle osservazioni fatte debbo anche concludere che le alterazioni iniziali del tessuto epidermico, siano di brevissima durata, perchè non mi è stato possibile di sorprendere, mentre la cosa riesce facile pel tessuto adiposo.

b) *Le alterazioni nel tessuto adiposo.*

E' questo senza dubbio il tessuto più fortemente alterato dalla malattia, e se il sangue rappresenta il mezzo di diffusione dei germi nei vari organi, il tessuto adiposo può essere considerato come il tessuto che sostiene l'infezione, perchè negli stadi avanzati della malattia presenta quasi tutti i nuclei rigonfi ed infarciti di cristalli. Si deve anche ammettere che i nuclei di questo tessuto siano più facilmente degli altri attaccati dal parassita, del quale sarebbero probabilmente un terreno d'elezione.

All'inizio della malattia i nuclei perdono la loro caratteristica forma sferoidale e mostrano una tendenza a coartarsi; in seguito si formano nel nucleo, degli ammassi o zolle di cromatina, che assumono delle forme diverse e sono in numero molto variabile. Di solito da un primo coagulo centrale si hanno delle formazioni a manubrio, che poi danno luogo ad un certo numero di coaguli più piccoli, mentre attorno a questi si viene formando uno spazio libero da sostanza cromatica (figg. 2, 3, 5; a), che verrà poi occupato dai corpuscoli sferici. Non sempre però si hanno queste suddivisioni della cromatina, che molte volte rimane unita in un solo ammasso, attorno al quale si formerà una corona di cocci d'aspetto elegante (figg. 3 e 5 b).

Quando gli spazi vuoti che circondavano gli ammassi di cromatina, appaiono completamente occupati dai cocci vescicolari, i coaguli si contraggono ancora, e lasciano nuovi spazi vuoti che ben tosto vengono riempiti di nuovi cocci, ed in questo modo la cromatina continua a ridursi, finchè tutto il nucleo appare rigonfio e completamente invaso dai cocci sferici (figg. 3 e 4. c). Anche quest'ultimo aspetto del nucleo ha poca durata, perchè in breve volger di tempo, al posto dei cocci vescicolari si vede una massa di granuli rifrangenti, ed infine l'ultimo residuo della cromatina nucleare che si era ridotta ad uno strato sottile della zona periferica, non potendo più resistere alla pressione esercitata dai cristalli, si spacca e mette in libertà i rombodecaedri. In seguito questi cristalli esercitano probabilmente un'azione meccanica sulla restante sostanza cellulare producendovi un complesso di lesioni che ne determinano lo sfacelo completo.

In molti casi ho potuto constatare che i cocchi si trovavano oltre che nel nucleo, nel territorio citoplasmatico di moltissime cellule adipose, prima che nei nuclei comparissero i corpi cristallini (fig. 3, d.). Dunque, a differenza di quanto credeva il VERNON, il parassita non è soltanto endonucleare, ma si può trovare anche in tutto il protoplasma cellulare.

Nello stadio finale dell'infezione, il tessuto adiposo appare profondamente alterato in ogni sua struttura e si presenta come un ammasso irregolare di frammenti protoplasmatici, frammezzo ai quali si vede qualche zolla violacea, che rappresenta gli ultimi frammenti della cromatina nucleare; i residui del tessuto adiposo si confondono coi resti informi di altri organi, mentre qua e là si può ancor riconoscere qualche anello chitinoso delle trachee che conserva la sua struttura originaria, e tutta la massa appare tempestata di un grandissimo numero di granuli poliedrici (fig. 6).

Per quanto concerne le dimensioni dei cocchi vescicolari nelle cellule adipose, i loro diametri sono superiori a quelli che si riscontrano nei cocchi delle cellule ipodermiche; mentre nei corpuscoli sferici ho misurato dei diametri di 3 e 4 micron, ho potuto osservare dei cristalli che misuravano 6 e persino 8 micron, il che starebbe a dimostrare come il tessuto adiposo sia realmente un substrato di elezione per il parassita.

e) Alterazioni tracheali.

Anche le trachee vengono attaccate dal parassita, ma soltanto negli stadi più avanzati della malattia, ed in misura assai meno imponente dei tessuti dianzi descritti. Infatti ho potuto osservare delle trachee nel cui lume, in seguito a lesioni e conseguente lacerazione delle pareti, era penetrata emolinfa alterata dal giallume, contenente cioè i granuli poliedrici, mentre i nuclei delle cellule della matrice tracheale apparivano perfettamente normali (fig. 8).

Quando la malattia comincia a prendere delle proporzioni notevoli, non risparmia neppure le cellule della parete tracheale che presenta per l'appunto i nuclei con le caratteristiche del nucleo di cocchi (fig. 9); questi cocchi riempiono e dilatano il nucleo, mentre le trachee presentano degli ingrossamenti caratteristici, dovuti a queste ipertrofie nucleari (fig. 7); anzi io

credo che dei vari tessuti attaccati, queste cellule presentano dei rigonfiamenti in misura assai più notevole di quelle degli altri tessuti rispetto alle dimensioni normali.

Verosimilmente la trasformazione dei cocchi in cristalli avviene quando l'animale è vicino a morire, perchè a questo punto le trachee non possono più compiere la funzione capace di mantenere l'ultimo barlume di vita.

d) Le alterazioni nelle ghiandole della seta.

Le ghiandole della seta sono sempre state considerate dagli autori contemporanei come refrattarie al giallume, nonostante che 70 anni or sono il CORNALIA, il MAESTRI, ed altri avessero affermato che nel liquido sanguigno di vacche morte si trovava la gomma serica e che le ghiandole serigene apparivano disfatte dalla malattia. Mentre gli autori citati appoggiavano le loro argomentazioni con accurate osservazioni sui cadaveri delle larve (senza però compiere delle ricerche istologiche) molti altri autori di quell'epoca, ammettevano la cosa in base ad un semplice indizio, e cioè, perchè il liquido abbandonato dai bachi ammalati era di color giallo nelle razze a bozzolo giallo, mentre era biancastro in quelle a seta bianca; ma quest'ultima argomentazione era grossolanamente sbagliata, perchè com'è noto il colore del sangue è in relazione con il pigmento della seta.

La mancata osservazione delle alterazioni nelle ghiandole serigene da parte degli autori contemporanei è però ben comprensibile, perchè nei primi stadi della malattia le ghiandole della seta appaiono perfettamente normali, e soltanto nelle vacche morenti è possibile vedere nella zona seccente, qualche breve tratto con i nuclei intaccati dalla malattia.

Che si tratti della zona seccente delle ghiandole è provato dalla loro posizione e struttura anatomica, nonché dal fatto che le loro sezioni hanno un diametro minore; inoltre nell'interno della ghiandola è possibile vedere un ammasso centrale di secreto serico colorato assai debolmente dall'Ematosilina Carazzi, e attorno a questo ammasso si può notare uno strato colorato più intensamente; ciò fa pensare che la zona centrale sia costituita da seta proveniente dalle parti più lontane della ghiandola, mentre la zona periferica sarebbe costituita da seta appena secreta: questo fatto non è mai stato descritto, ma po-

trebbe costituire un aiuto per chi volesse occuparsi di questi studi.

Dopo le prime alterazioni nucleari, che hanno in queste cellule una durata assai minore di quella di altri tessuti, compaiono i coechi vescicolari che occupano rapidamente lo spazio lasciato libero dalla cromatina che si va coartando, e che vengono tosto sostituiti dai cristalli. Sembra però che questo tessuto sia poco gradito al parassita, perchè, oltre a determinarvi delle lesioni limitate, presenta una durata assai breve della forma di coechi vescicolari.

In uno stadio più avanzato delle lesioni, i nuclei appaiono infarciti di cristalli rombododecaedrici, ma a fianco di nuclei presentanti queste forme cristalline, se ne presentano altri che appaiono ripieni di cristallini di forma perfettamente cubica (figg. 10 e 11). La presenza di questi cristalli cubici ho potuto determinarla soltanto nelle cellule delle ghiandole serigene, e ciò potrebbe far pensare ad una differente composizione chimica dei cristalli stessi, cosa probabile, perchè questi nuclei che stanno elaborando la sostanza serica rappresentano un substrato di composizione notevolmente diversa da quella dei nuclei degli altri tessuti. D'altra parte non è possibile escludere con sicurezza che i cristalli cubici abbiano la medesima composizione chimica di quelli normali; ed in questo caso, sia il rombododecaedro che il cubo, appartenendo alla classe della fluorite (sistema monometrico), potrebbero non essere le sole forme possibili di questi cristalli, ed allora non sarebbero errate le osservazioni di SÉCRETAIN che affermava d'aver trovato in bachi ammalati di giallume dei cristalli ottaedrici, ed ancora si potrebbe ammettere che in determinate condizioni si possano formare dei cristalli esacottaedrici, triacottaedrici, od aventi un qualsiasi abito cristallino di questa classe di simmetria. Ho voluto aprire questa parentesi cristallografica, perchè le critiche mosse dall'ACQUA al SÉCRETAIN per queste sue osservazioni, non sono a mio avviso, sufficientemente solide, essendo ben noto che una medesima sostanza può assumere diversi abiti cristallini, purché appartengano questi alla medesima classe.

Le dimensioni dei cristalli cubici sono alquanto inferiori a quelle dei rombododecaedri, perchè oscillano fra 2 e 2,5 micron e solo eccezionalmente raggiungono i 3 micron.

Benchè le lesioni alle ghiandole della seta abbiano uno sviluppo abbastanza limitato, sono però sufficienti a determinare la rottura delle ghiandole stesse ed il conseguente spandimento della secrezione serica, come infatti ho potuto constatare in vacche morenti che presentavano il parenchima adiposo con i propri elementi immersi nella secrezione serica fuoruscita dalla sua sede.

e) *Le alterazioni nelle gonadi*

Anche in questi organi il parassita del giallume trova modo di svilupparsi; però contrariamente a quanto potrebbe sembrare a prima vista, non sono le cellule germinali maschili o femminili, nelle diverse fasi di maturazione, che vengono intaccate, ma solamente la membrana connettivale che avvolge in un sacco completamente chiuso le gonadi larvali.

Così, osservando delle sezioni di vacche di sesso maschile nel 5° anello addominale, è facile ritrovare i testicoli che presentano in prossimità dell'epitelio germinativo delle camere testicolari gli ammassi di spermatoцитi e spermatidi in via di maturazione, mentre più lontano si vedono le budella spermatofores con gli spermatozoi maturi nella loro forma definitiva. Orbene, tutti questi spermatozoi, anche negli stadi più avanzati della malattia, appaiono perfettamente sani, mentre la membrana connettivale che racchiude il testicolo, presenta i suoi piccoli nuclei ripieni di coechi vescicolari prima, e di cristalli rombododecaedrici poi. Però questi nuclei non appaiono molto rigonfi come negli altri tessuti, (forse per la loro forma sottile e allungata) e contengono un numero assai limitato di coechi, che appaiono il più delle volte in serie di tre o quattro, disposti in un solo strato (fig. 12) e che misurano 3 micron di diametro.

Osservando invece la sezione di un ovario, si vedono le anse dei quattro tubuli ovarici contenenti le ovocellule nelle diverse fasi di maturazione. Però sia le ovocellule, che i nuclei dell'epitelio germinativo non presentano alterazioni di sorta.

Invece la membrana racchiudente i tubuli ovarici ed i tre legamenti connettivi sospensori dell'ovario larvale, appaiono tempestati di un gran numero di sacculi, rigonfi di minutissimi corpiccioli assai ben distinti: tali sacculi non sono altro che nuclei del connettivo ripieni di coechi vescicolari di dimensioni mi-

norì delle ovariche che raggiungono appena i 2 micron di diametro (fig. 13).

Da quanto ho esposto parlando delle alterazioni dei vari tessuti appare evidente l'azione disgregante sui vari organi, esercitata dalla malattia del giallume nel corso di pochi giorni (8 al massimo); e tale rapidità condurrebbe ad escludere a priori la possibilità di una trasmissione ereditaria. Ma tale possibilità dev'essere esclusa anche per altri motivi: innanzi tutto, perchè le gonadi vengono attaccate dal parassita soltanto quando esso ha ormai inevitabilmente compromesso la vita dell'insetto, ed in secondo luogo perchè le alterazioni degli organi sessuali riguardano le membrane che li avvolgono; per cui, ammettendo l'ipotesi paradossale che dei bachi ammalati, raggiunto lo stadio di farfalla (la qual cosa è soltanto molto eccezionale), possano arrivare a compiere l'atto riproduttivo e giungere alla deposizione delle uova, queste dovrebbero essere considerate indenni dal virus, perchè se vi fosse presente, determinerebbe in seno alle cellule embrionali la formazione dei cocchi.

E sembra quasi che la natura, ad evitare che si perpetui il terribile flagello, voglia mettere nelle gonadi delle larve ormai inesorabilmente condannate, un ostacolo capace di trattenere nella loro parte più esterna il terribile virus, per salvaguardare così la prole, che in eccezionalissimo caso potesse essere generata in un disperato tentativo di procreazione.

Però i risultati delle mie ricerche sono in contrasto con quelli ottenuti da altri ricercatori.

Infatti il TEODORO, osservando le cellule di strie embrionali durante la diapausa, credette di trovare nei loro nuclei dei granuli tondeggianti o di forma nettamente poliedrica. Da ciò trasse la conclusione che il giallume dev'essere una malattia ereditaria. Benchè io non abbia potuto confermare il reperto del TEODORO, non voglio negare in modo assoluto la possibilità di una forma congenita della malattia, chè offenderei l'aforisma fondamentale che in biologia val più un fatto positivo di cento negativi. Tuttavia credo che la trasmissione ereditaria costituisca — se pure esiste di fatto — una rara eccezione, che si manifesterebbe in qualche stirpe particolarmente indebolita e appartenente a razze spiccatamente soggette a giallume.

Nè maggior appoggio all'ipotesi di un'ordinaria trasmissibilità ereditaria del giallume, credo sia portato dai recenti studi di

M. TIRELLI e WONG LUI KIN, la cui pubblicazione apparve finertre mi accingevo a licenziare il presente lavoro. Questi Autori descrivono delle alterazioni alle membrane connettivali dei testicoli e degli ovari, caratterizzate dalla presenza di cristalli poliedrici; benchè gli autori suddetti non abbiano descritto la presenza di nuclei ipertrofizzati contenenti i cocchi vescicolari, e non abbiano riscontrato alterazioni di sorta nei nuclei piccoli e allungati del tessuto connettivale, le loro osservazioni collimerebbero con le mie per quanto concerne la presenza dei granuli poliedrici nelle membrane che avvolgono i testicoli o gli ovari. Ma le osservazioni del TIRELLI¹ e del suo collaboratore non si accordano con le mie per quanto concerne alcune presunte lesioni degli spermatozoni; nei miei preparati, sia gli spermatozoni, che le ovocelle nelle diverse fasi di maturazione appaiono perfettamente normali. Invece gli Autori citati descrivono delle alterazioni della cromatina nucleare degli spermatozoni, per cui essa si presenta sotto forma di grumi irregolari; ma l'interpretazione che attribuisce al giallume tali alterazioni mi sembra discutibile per le seguenti ragioni: 1.^o perchè non è stata messa in evidenza, negli spermatozoni alterati, la presenza di granuli poliedrici, o di corpiccoli che facciano pensare ai cocchi vescicolari; 2.^o perchè gli spermatozoni presentano ammassi irregolari di cromatina soltanto mediante colorazione con ematosilina ferrica; or bene, è proprio all'uso di questa colorazione che io attribuisco le apparenti anomalie, pel fatto che assai difficilmente i preparati vengono uniformemente scolorati dall'allume ferrico dopo il lungo soggiorno nel bagno colorante.

Del resto io credo che il colpo di grazia contro l'ipotesi dell'ordinaria trasmissibilità ereditaria della malattia del giallume sia stato dato da ACQUA con le sue recenti esperienze, condotte su allevamenti di bachi provenienti da seme deposto da rarissime farfalle affette da poliedria. Ebbene il Direttore della Stazione Bacologica di Ascoli Piceno potè accertare che in nessuna delle uova non schiuse vi era presenza di granuli poliedrici, e negli allevamenti dei bachi sospetti non ebbe che una mortalità minima per il giallume, oscillante dal 2% al 3%.

Conclusioni

Da quanto risulta dalle mie ricerche appare ormai completamente dimostrata l'esistenza dei cocchi vescicolari, dei quali il VERNON aveva dato delle notizie incerte. Intorno a queste forme le presenti ricerche hanno fornito notizie assai più estese e sicure di quelle che risultavano dagli studi del VERNON; e cioè:

a) Per quanto riguarda le loro sedi, posso affermare ch'essi non sono soltanto dei parassiti endonucleari, ma, come avviene frequentemente nel tessuto adiposo, essi possono occupare tutto il territorio del protoplasma cellulare. I cocchi vescicolari, non si trovano soltanto nei nuclei di cellule adipose, epidermiche e peritracheali — come risultava dagli studi del VERNON, — ma penetrano altresì nei tessuti di altri importantissimi organi, come le ghiandole della seta e le gonadi.

b) Per quanto riguarda la loro colorazione, i cocchi vescicolari assumono una pallida tinta violacea, impiegando come colorante l'Ematosilina CARAZZI.

c) Per le loro dimensioni, debbo far rilevare che nel tessuto adiposo esse sono maggiori, raggiungendo il diametro di 4 micron, mentre nel tessuto epidermico, nella capsula connettivale dei testicoli, e nelle cellule delle ghiandole serigene non superano i 3 micron, ed infine nei connettivi ovarici i cocchi vescicolari hanno diametri di 2 micron soltanto.

d) Per quanto concerne il loro numero entro ciascun nucleo di cellule abitate dai cocchi vescicolari, rimane assodato che possono raggiungere il numero di 32 e di 64; appare probabile che quest'ultima cifra non venga sorpassata.

e) E' raggiunta una documentazione delle enormi ipertrofie che i cocchi vescicolari possono determinare nei nuclei, i quali, quando sono rigonfi, raggiungono diametri di 20-21 micron.

f) Le profonde alterazioni nucleari che accompagnano la penetrazione dei cocchi vescicolari nei nuclei cellulari, la

disposizione a corona che essi assumono nell'interno della massa nucleare, di pari passo con un disfacimento della cromatina, sono altrettanti argomenti che attestano una spiccata capacità di cromatofagia da parte dei famosi cocchi vescicolari, e che perciò avvalorano l'ipotesi della loro natura parassitaria.

Dalle osservazioni compiute sulle ghiandole serigene, appare evidente che nonostante l'opinione contraria dei moderni ricercatori, esse siano soggette a speciali alterazioni. Particolarmente interessante è la presenza nei nuclei alterati — oltre che degli ordinari granuli rombododecaedrici — di cristallini di forma cubica, che essendo stati intravisti da altri autori soltanto nel liquido proveniente dai corpi di vacche disfatte dal gallume, e per essere stati da me riscontrati soltanto nei nuclei cellulari delle ghiandole serigene, debbono con ogni probabilità considerarsi come formazioni caratteristiche esclusivamente di questi organi.

Per quanto concerne i rapporti esistenti fra cocchi e cristalli, non posso confermare le deduzioni del VERNON e cioè che essi abbiano origine nell'interno dei cocchi in seguito ad un graduale, progressivo processo di cristallizzazione, perchè questo fenomeno non è osservabile al microscopio, ed anche dal lavoro del VERNON appare puramente ipotetico.

Appare invece particolarmente avvalorata l'ipotesi della natura clamidozoaria di questi cocchi, per cui le esperienze incontrovertibili di PAILLOT e di altri autori, dimostranti l'esistenza di un virus filtrabile, trovano una piena corrispondenza con la dimostrata esistenza dei cocchi. Ed appunto con questa teoria clamidozoaria è possibile spiegare i rapporti esistenti fra cocchi e cristalli, considerando questi ultimi come le vestigia di cocchi che abbiano profondamente alterato la loro struttura bio-chimica nel dar luogo alla formazione di nuovi virus.

Infine le mie osservazioni non depongono in favore della trasmissibilità ereditaria del gallume, ma anzi la contrastano, perchè le alterazioni delle gonadi si limitano ai loro involucri connettivali, mentre le cellule germinali, nelle diverse fasi di maturazione, non presentano mai lesioni od alterazioni che facciano pensare ad una qualsiasi azione patogena esercitata su di esse.

Non si può escludere però che alterazioni non visibili con gli ordinari mezzi della tecnica microscopica possano interessare

anche le cellule germinali — e con ciò trasmettere alla prole una predisposizione — anche se i presunti agenti patogeni restino relegati nei tessuti connettivali avvolgenti le gonadi. Comunque, gli individui che, avendo contratto molto tardivamente la malattia, possono sopravvivere ed avere una prole, sono tanto eccezionali che in pratica la questione perde ogni valore.

BIBLIOGRAFIA

- ACQUA (C.) — Ricerche sulla malattia del giallume nel baco da seta. Rendiconti dell'Istituto bacologico di Portici, Vol. III, 1918-19.
- — La durata della virulenza dell'agente patogeno del giallume. Boll. R. Staz. Sper. di Gels. e Bachicoltura, di Ascoli Piceno, Anno I, N. 2, 1922.
- — Il giallume. Idem. Anno I, N. 4, 1922.
- — Il problema del giallume. Idem. Anno III, N. 4, 1924.
- — Su alcune osservazioni compiute intorno alla malattia del giallume. Idem. Anno IV, N. 3, 1925.
- — Nuove ricerche sulla malattia del giallume nel baco da seta. Idem. Anno IV, N. 5, 1925.
- — Sull'ereditarietà della malattia del giallume. Idem. Anno V, N. 2, 1926.
- — Il virus della malattia del giallume nel baco da seta in rapporto con le moderne teorie sul virus filtrabile. Idem. Anno V, N. 5, 1926.
- — Sull'ereditarietà del giallume. Idem. Vol. V, N. 5, 1926.
- — « Les Maladies du Ver à Soie » per A. Paillot e i nostri studi sul medesimo argomento. Idem. Anno VIII, N. 2, 1929.
- — L'eventualità della trasmissione ereditaria della malattia della poliedria. Idem. Anno IX, N. 2-3, 1930.
- ACQUA (C.) e DELLA CORTE (M.) — Ancora sulla malattia del giallume. Boll. R. Staz. di Gels. - Bach. di Ascoli Piceno. Anno V, N. 3, 1926.
- AOKI (K.) u. CHIGASAKI (Y.) — Immunisatorische Studien bei Gelbsucht von Seidenfaupen. centralbl. f. Bakter. Parasitenk. u. Infektionskrankheit. Bd. 86, 1921.
- BANFI — Note sul giallume. Giornale Italiano di bachic. 10 giugno 1860.
- BERTI-PICHAT. — Educazione dei bachi da seta, Napoli 1855.
- BOLLE (G.) — Il giallume o mal grasso. Ann. Ist. Bac. Gorizia 1873.
- — Il giallume del baco da seta. Atti e memorie dell'I. R. Soc. Agr. Gorizia 1894.
- — Il giallume o mal del grasso del baco da seta è una malattia parassitaria. Idem. Anno XXXVIII, 1898.

- — Studien über das Mikrosporidium polyedricum der Gelbsucht. Bericht über die Tätigkeit der K. K. Land. Chem. Versuchsst. in Goerz, 1902.
- — Studien über die Gelbsucht der Seidenraupen. Idem 1907.
- — Verschiedene Berichte über die Polyederkrankheit der Raupen. Idem, 1908.
- BÖHM. (L. K.) — Über die Polyederkrankheit der Spingiden. Zool. anz. T. 35, 1910.
- BOISSIER DU SAUVAGES. — Memoires sur l'éducation du ver à soie. Nimes. 1763.
- CARBONE (D.) e FORTUNA (E.) — La vaccinazione dei bachi da seta. Boll. dell'Ist. Sieroterapico Milanese. Nov. 1928.
- CHAPMAN (J. W.) a. GLASER (R. W.) — A preliminary list of insects which have Wilt, with a comparative study of their polyhedra. Jl. of. Econ. Ent. Vol. VIII, 1915.
- — Further studies on Wilt of Moth caterpillars. Idem. Vol. IX, 1915.
- CICCONE (A.) — Trattato sulle malattie del baco da seta. Napoli 1868.
- CONTE (A.) ET LEVRAT (D.) — Sur la grasserie du ver à soie. Assoc. française pour l'avancement des Sciences. 2. parte, 1906.
- CORNALIA (E.) — Monografia del bomiche del gelso. Milano 1856.
- DANDOLO (V.) — L'arte di allevare i bachi da seta. Milano 1818.
- DELLA CORTE (M.) — Il giallume nella Campania. Boll. R. Staz. Sper. di Gels. Bach. Ascoli Piceno. Anno I, N. 4, 1922.
- — Le esperienze per fronteggiare il giallume in Campania nel presente anno. Boll. Staz. di Gels. e Bach. Ascoli Piceno. Anno VIII, N. 4-5, 1928.
- DEL GUERCO (G.) — Il mal del giallume (o dei microbi poliedrici) negli allevamenti dei filugelli, negli insetti delle piante forestali ed agrarie e nelle zanzare della malaria. « Redia » Firenze, 1929.
- DELONCA (E.) — A propos de la grasserie; l'hérédité pathologique chez les Vers à Soie. Moniteur des soie, N. 2682, 1914.
- ESCHERICK (K.) — Neues über Polyederkrankheit. Naturwissensch. Zeitsch. f. Forst. u. Landwirtsch. II Jahrg. 1913.
- ESCHERICK (K.) u. MIYAJIMA (M.) — Studien über die Wipfelkrankheit der Nonne. Biolog. Centralbl. Bd. XXXII 1912.
- — Studien über Wipfelkrankheit der Nonne. Naturwissensch. Zeitsch. f. Forst. u. Landwirtsch. 9 Jahrg. 1911.
- FOÀ (A.) — Le nostre conoscenze e le nostre incertezze sulle malattie del baco da seta. Ente Naz. Serico. Milano 1930.
- GLASER (R. W.) — Wilt of Gipsy - Moth caterpillars. Jl. of. Agric. research. Vol. IV, 1915.

- — The Polyedric virus of insects with a theoretical consideration of filterable viruses generally. Science. Vol. XLVIII, 1918.
- GLASER (R. W.) a. CHAPMAN (J. W.) — The wilt disease of Gipsy Moth caterpillars. Jl. of. econ. Ent. Vol. 6, 1913.
- GRANDORI (R.) Il filugello e le industrie bacologiche. Milano 1924.
- GUÉRIN - MÉNÉVILLE (A.) — Études sur les maladies des Vers à Soie. Paris. 1856.
- HAYASHI (D.) — Experiences sur la grasserie des Vers à Soie. Boll. Ass. Ser. Jap. An. I, N. II, 1914.
- HAYASHI (D.) ET SAKO — Recherches sur la grasserie des Vers à Soie. Moniteur des soies. N. 2637-2650, 1913.
- HOFMANN (O.) — Die Schilffsucht die Nonne. Insektentödtende Pilze mit besonderer Berücksichtigung der Nonne. Frankfurt - a - M. 1891.
- KNOCHE (E.) — Nonnenstudien. Forstwrsch. Centralbl. 1912.
- — Über den Erreger der Wipfelkrankheit der Nonne und seine Entwicklung. Fahreshefte des Vereins f. Vaterländische Naturfreunde in Würtemberg. 68 Jahrg. 1912.
- KOMAREK (J.) La lutte contre la Nonne (Liparis Monacha) XI, Congrès Inf. d'Agric. Paris, 1923.
- KOMAREK (J.) u. BREINDL (V.) — Die Wipfelkrankheit der Nonne und der Erreges derselben. Zeitschr. f. angewandte Entomologie. Bd. X, 1924.
- KRASSILSHTSNIK. (I.) — Sur les parasites des Vers a Soie sains et malades. Mémoires Soc. Zoolog. de France. T. IX, I, par. 1896.
- LAMBRUSCHINI (R.) — Intorno al modo di custodire i bachi da seta. Firenze 1858.
- LOMBARDI (L.) — E' il Bagdad resistente al giallume? Boll. R. Staz. Sper. di Bach. e Gels. di Ascoli Piceno. Vol. IX, N. 1, 1930.
- MALPIGHI (M.) — Dissertatio Epistolica de Bombyce (1086) - Pubblicato da MAILLOT (E.) in « Leçons sur les vers à soie du murier », Montpellier 1891.
- MAESTRI (A.) — Frammenti anatomici, fisiologici, patologici sul Baco da seta. Pavia. 1858.
- MOZZIGNACCI (A.) — Contagion de la grasserie. Moniteur des soies. N. 2677, 1914.
- NELLO MORI — Di alcuni miceti isolati da larve di *Bombyx mori* affette da poliedria. Inform. seriche. Anno XII, 1925.
- NYSTEN (P. H.) — Recherches sur les maladies du ver à soie et des moyens de les prevenir. Paris 1808.
- OMORI (J.) — Über die Aetiologie der Gelbsucht usw. - Jl. of. Silk Industry. Tokio 1905.

- PAILOT (A.) — Rapport sur les maladies à polyedres. - Caisse des recherches scientifiques, 1914.
- — Sur l'étiologie et l'épidémiologie de la grasserie du ver à soie. C. R. Ac. Scient. 1924, T. 179.
- — Sur une nouvelle maladie des chenilles de *Pieris Brassicae* etc. C. R. Ac. Sc. T. 179, 1924.
- — Sur les alterations cytoplasmatiques et nucléaires au cours de l'évolution de la grasserie du Ver à soie. C. R. Ac. Sc. T. 180, 1925.
- — Sur les alterations cytologiques ecc. C. R. Sc. Soc. T. 180, 1925.
- — Sur la grasserie du ver à soie, C. R. Ac. Soc. T. 181 1925.
- — Existence de la grasserie chez les papillons de Ver à Soie. C. R. Ac. Agric. T. XII, 1926.
- — Sur une nouvelle maladies des noyaux ou grasserie des chenille de P. brassicae, C. R. Ac. Sc. T. 182, 1926.
- — Un nouveau groupe de parasites ultramicrobiens: Les Borrellina. Annales Inst. Pasteur, T. XL, 1926.
- — Sur l'anatomo-patologie de la grasserie. C. R. Soc. de Biologie. T. XCVI, 1927.
- — Les maladies du ver à soie. Grasserie et Dysenteries, Lyon, 1928.
- PANEBIANCO (R.) — Osservazioni sui granuli del giallume. Boll. mens. di Bachiolt., 1895.
- PROWAZEK (S.) — Chlamidozoa I. Zusammenfassende Übersicht. - Chlamidozoa II Gelbsucht der Seidenraupen. Arch. f. Protistenkunde, Bd. 10, 1907.
- — Untersuchung über die Gelbsucht der Seidenraupen. Centralbl. f. Bakt., Paras. u. Infektionsk. Bd. LXXVII, 1912.
- RÉBOUILLON (A.) — Sur la selection macroscopique et microscopique des papillons de Vers à soie du mûrier atteints de la grasserie. C. R. Ac. Agric. T. XI, 1925.
- — A propos de l'existence de la grasserie chez les papillons de Vers à Soie. C. R. Ac. Agr. T. XII, 1926.
- SASAKI (C.) — On the Pathology of the Jaundice of the Silkworm. Jl. of the Silkworm. Jl. of the College of Agriculture, Vol. II, 1910.
- SECRÉTAIN (Ch.) — Notes Séricicoles. Ann. Ecole Nat. Agric. de Montpellier. Vol. XVII, 1922.
- TAMURA (K.) — Etude sur la grasserie. Bull. Ass. Séric. du Japon N. 178. A, 1909.
- TEODORO (G.) — E' giallume una malattia ereditaria? Boll. di Sericoltura. Anno XXXII, 1925.
- — Ricerche sul giallume del *Bombyx mori*. Boll. di Seric. Anno XXXIII, 1926.

- — Ancora sull'ereditarietà del giallume. Boll. di Seric. Anno XXXIII, 1926.
- TINELLI (M.) e WONG LUI KIN. — Alterazioni istologiche nei testicoli di larve di *Bombyx mori* malate di giallume. Annali della Sperimentazione Agraria. Vol. II, 1930.
- TUBEUF (V.) — Zur Geschichte der Nonnenkrankheit. Zeitsch. f. Forst- u. Landw. 1911.
- VERSON (E.) — Sulla evoluzione postembrionale degli arti toracali e cefalici del filugello. Ann. Staz. Bac. Padova, Vol. XXXI, 1902.
- VERSON (E.) e GHIRLANDA (C.) — Sul microbio specifico del giallume bombicino. Ann. R. Staz. Bac. Padova, Vol. XLII, 1917.
- WACHTL U. KORNATH. — Beitrage zur Kenntnis der Morphologie, Biologie und Pathologie der Nonne. Mitteil. a. d. Forstl. Versucheswesen Osterreichs. 10 Hefr, 1893.
- WAHL (Br.) — Über die Polyederkrankheit der Nonne (*Limantria monacha*). Centralbl. f. das gesamte Forstw. 35, 36, 37, 38 Jahrg. 1909-10-11-12.
- WALKER (Ph.) — The grasserie of the silk-worm. Insect life. Periodical Bulletin, N. II - Year 12, Washington, 1911.
- WOLFF (MAX) — Über eine neue Krankheit der Raupe von *Bupalus piniarius*. Mitteil. des Kaiser Wilhelm-Institut. f. Landw. in Bromberg. Bd. III, 1910.

Spiegazione delle Tavole

TAVOLA I.

Fig. 1. — Tessuto epidermico con nuclei invasi dai cocchi del giallume (900 ingr.). — a) Corona di cocchi vescicolari. — b) Nuovi elementi vescicolari formati internamente allo strato primitivo. — c) Nucleo in cui tutta la cromatina nucleare è stata sostituita dai cocchi sferici.

Fig. 2. — Tessuto adiposo di vacca incipiente mostrante le prime alterazioni (800 ingr.). — a) Coaguli di cromatina attorno ai quali si vanno formando degli anelli scolorati.

TAVOLA II.

Fig. 3. — Cocchi vescicolari che infarciscono nuclei e territori citoplasmatici nelle cellule adipose di vacca (800 ingr.). — a) Coaguli di cromatina. — b) Nucleo mostrante uno strato regolare di cocchi attorno al coagulo cromatico. — c) I cocchi sferici che riempiono i nuclei nei quali sono scomparsi i coaguli cromatici. — d) Cocchi di forma poco regolare che occupano l'intero territorio citoplasmatico della cellula adiposa.

Fig. 4. — Diverse fasi delle alterazioni delle cellule adipose (800 ingr.). — c) I cocchi vescicolari nei nuclei.

TAVOLA III.

Fig. 5. — Tessuto adiposo in cui i cocchi vescicolari appaiono soltanto nei nuclei (800 ingr.). — a) Coagulo cromatico a forma di manubrio, attorno al quale si vede lo strato libero, in cui si dovranno sviluppare i cocchi vescicolari. — b) Coagulo centrale di cromatina già circondato dai cocchi e in via di ulteriore riduzione.

Fig. 6. — Come si presentano i tessuti disfatti (adipe e trachee) nelle vacche morenti (675 ingr.).

Fig. 7. — Minutissima trachea in cui i nuclei delle cellule peritracheali appaiono enormemente dilatati dai cocchi vescicolari (1200 ingr.).

TAVOLA IV.

Fig. 8. — Trachea ancor sana nel cui lume è penetrata emolinfa alternata in seguito a soluzione di continuo avvenuta in altro punto lontano dal piano della sezione. (450 ingr.).

Fig. 9. — Grosse trachee con nuclei invasi dai cocchi vescicolari (480 ingr.).

TAVOLA V.

Fig. 10. — Ghiandola della seta alterata con cristalli cubici endonucleari (400 ingr.).

Fig. 11. — Nuclei di ghiandole serigene invasi dai cristalli cubici (900 ingr.).

TAVOLA VI.

Fig. 12. — Porzione di testicolo di vacca che presenta i nuclei del tessuto connettivo invaso da cocchi vescicolari, ma con gli spermatogoni normali (675 ingr.).

Fig. 13. — Porzione di un ovario di vacca mostrante la membrana connettivale tempestate di nuclei rigonfi vescicolari (450 ingr.).