

Nuove ricerche sul giallume del baco da seta

TRATTAMENTI IMMUNIZZANTI

INTRODUZIONE

In questa breve memoria dedicata all'illustrazione di nuove ricerche sperimentali da me compiute sul giallume, e concernenti nuovi trattamenti immunizzanti contro la malattia, sarebbe fuor di luogo lo svolgimento completo della storia dei mezzi di lotta finora consigliati contro di essa. Tenendo presente che tutti gli accorgimenti suggeriti dagli autori antichi poco si scostano da quelli che ancor oggi si raccomandano per diminuire la mortalità provocata da questa e da qualche altra malattia del filugello, mi limiterò a parlare di lavori recenti che presentano un maggior interesse e di quegli studi attraverso i quali si è andato recentemente affermando un nuovo indirizzo nella lotta contro il giallume.

Recentemente alcuni autori consigliarono di combattere il giallume mediante la selezione microscopica condotta in modo analogo a quello usato per la pebrina, ma la proposta non trovò alcuna eco; e considerando che finora non è stata dimostrata l'ordinaria ereditarietà della malattia, e che ben raramente si possono trovare farfalle affette da poliedria, la selezione microscopica basata sul criterio della assenza o presenza dei granuli poliedrici, allo stato attuale delle nostre conoscenze, dev'essere assolutamente scartata quale mezzo di lotta contro il giallume.

Considerazione da parte dei semi merita invece il suggerimento concorde dei maestri della bachicoltura che raccomandano una sorveglianza accurata ed un controllo severo degli al-

levamenti da riproduzione, perchè, se non è dimostrata l'ereditarietà del giallume, sembra invece accettabile l'ipotesi della trasmissione di una predisposizione alla malattia.

Presso la R. Stazione Sperimentale di Bachicoltura di Ascoli Piceno sono stati iniziati e continuano tuttora da parte di ACQUA (1) e LOMBARDI (2) dei tentativi aventi per iscopo di ottenere, mediante selezioni ed incroci, delle nuove razze resistenti al giallume; è da augurare che gli sperimentatori possano raggiungere la meta prefissa; ma non bisogna dissimularsi che il problema è assai arduo e complesso, per la necessità di ottenere delle razze che uniscano ad una notevole resistenza alla malattia la possibilità di fornire dei prodotti che soddisfino alle esigenze economiche e commerciali degli allevatori.

Trascurando di ricordare altre recenti ricerche dirette alla lotta contro il giallume, che fallirono allo scopo, verrò a parlare di una coraggiosa innovazione alla tecnica bacologica consistente nel sottoporre i bachi a trattamenti immunizzanti. Questi trattamenti ideati da D. CARBONE su proposta di V. FIORUZZI, ebbero luogo presso l'Istituto Sieroterapico Milanese, dove furono sperimentate le vaccinazioni preventive dei bachi contro il giallume e la flaccidezza. Dopo aver tentato la vaccinazione per via cutanea, il CARBONE finì coll'adottare esclusivamente la vaccinazione per via orale consistente nella somministrazione di foglia che aveva subito per qualche minuto l'immersione in liquido vaccinale, e che in seguito veniva lasciata asciugare. Rimandando per maggiori notizie in proposito, alla lettura delle memorie originali (3, 4), riassumerò brevemente le conclusioni delle esperienze di vaccinazione contro il giallume eseguite nel 1928 e nel 1929 dal suddetto Autore. Da questi esperimenti risultò che le vaccinazioni contro il giallume determinavano una

(1) C. ACQUA. — *Ricerche sulla malattia della poliedria negli insetti.* — Bollettino della Stazione di Bachicoltura e Gelsicoltura di Ascoli Piceno. - Volume X, N. 5-6 - Dicembre 1931.

(2) L. LOMBARDI. — *È il Bagdad resistente al giallume?* - Bollettino della Stazione di Bachicoltura e Gelsicoltura di Ascoli Piceno. - Vol. IX, N. 1 - Febbraio 1930.

(3) D. CARBONE ed E. FORTUNA. — *La vaccinazione dei bachi da seta.* — Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese, Fasc. XI - Novembre 1928.

(4) D. CARBONE ed E. FORTUNA. — *La vaccinazione dei bachi da seta.* — Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese, Fasc. II - Febbraio 1931.

reale diminuzione della mortalità, e che i trattamenti stessi si mostravano più efficaci se eseguiti su bachi delle prime quattro età che non su quelli di quinta età. Apparve però che il vaccino antigiallume non determinava affatto una refrattarietà alla flaccidezza, anzi in qualche caso sembrò che ne favorisse lo sviluppo. Comunque i risultati degli allevamenti svolti nell'Istituto Sieroterapico e degli allevamenti condotti nella tenuta del Carditello presso S. Maria Capua Vetere (Napoli) erano veramente brillanti e incoraggianti. Purtroppo dopo il 1929 il CARBONE decise di abbandonare gli studi dei vaccini contro il giallume, ritenendo che questa malattia non avesse grande importanza in Lombardia, e si occupò soltanto degli studi sulla vaccinazione contro la flaccidezza.

Le esperienze ed i felici risultati ottenuti dal CARBONE mi stimolarono a continuare questi studi, e pur non conoscendo i metodi seguiti dall'illustre batteriologo per la produzione dei suoi vaccini, mi proposi di arrivare, sia pure con altri mezzi, alla realizzazione di trattamenti immunizzanti contro il giallume.

Nell'intraprendere questi studi mi basai su alcune importanti conclusioni che aveva formulato il PAILLOT (5) in seguito alle sue ricerche sul virus filtrabile causante il giallume.

Dagli studi dello scienziato francese emergono due fatti importanti: 1) la filtrazione di emolina proveniente da bachi malati di giallume attraverso candele di Chamberland a pori grossolani, attenua notevolmente la virulenza del liquido infettante; 2) l'aggiunta di notevole quantità di acqua al liquido virulento determina anch'essa una forte diminuzione della virulenza dell'emulsione ottenuta. Inoltre la diluizione dell'emolina a 1:1000, può essere considerata come la *diluizione limite*, al di là della quale il materiale diluito perde tutta la sua capacità di trasmettere la malattia.

Ebbene ammettendo l'esattezza dei risultati ottenuti dal PAILLOT, conclusi che sottoponendo il liquido virulento ad una filtrazione attraverso candele di Chamberland, ed associando questo trattamento ad una diluizione in acqua spinta alla *diluizione limite*, trattando dei bachi sani col liquido ottenuto, lo sviluppo di giallume sarebbe stato assai basso o addirittura nullo.

(5) A. PAILLOT. — *Les maladies du Ver à Soie - Grasserie et Dysenteries.* — Lyon, 1928.

Ed inoltre mi posi un'appassionante domanda: dopo aver subito questo trattamento senza aver contratto la malattia, non acquisterebbero i bachi la facoltà di resistere a gravi infezioni, come quelle che si verificano ordinariamente?

Questo problema era quanto mai seducente e fin dal giugno 1930 svolsi un primo tentativo d'immunizzazione su di un piccolo lotto di bachi ottenendo buoni risultati. Questo tentativo poteva avere un grande significato per me come spinta ad ulteriori esperimenti, ma i risultati ottenuti non potevano darmi sufficiente fondamento per una affermazione sicura, dato il numero esiguo di bachi trattati.

Decisi allora di riprendere e di sviluppare su vasta scala questi tentativi sopra allevamenti sperimentali abbastanza grandi, e grazie ad un generoso contributo della benemerita Cassa di Risparmio per le Provincie Lombarde, mi fu possibile avere i mezzi occorrenti per l'esecuzione delle ricerche.

Nella primavera del 1931 svolsi un allevamento sperimentale in campagna, che mi permise di formulare le prime importanti conclusioni sull'efficacia dei trattamenti immunizzanti; in un secondo allevamento sperimentale condotto nell'autunno del 1931 perfezionai i tentativi d'immunizzazione; ed inoltre svolsi una serie di nuove esperienze aventi lo scopo di portare nuovi contributi alla conoscenza dell'eziologia del giallume.

1° - I tentativi di immunizzazione contro il giallume compiuti nella primavera del 1931.

Prima di cominciare l'allevamento sperimentale in campagna, iniziai nei locali del Laboratorio di Zoologia Agraria e Baccicoltura in Milano un piccolo allevamento di bachi di razza Maiella che infettai con materiale virulento conservato dalla precedente campagna bacologica: c'essui tale infezione artificiale somministrando ai bachi la foglia imbrattata col suddetto materiale.

In seguito a quest'infezione si sviluppò nel piccolo allevamento una grave epizoozia di giallume che ebbe un'esplosione

piuttosto ritardata, e che rallentò considerevolmente lo sviluppo dei bachi; la salita al bosco si iniziò con un ritardo di oltre una settimana nei primi giorni di giugno, e continuò fino al giorno 5 di detto mese. La maggior parte dei bachi morirono di giallume, ma purtroppo il grosso della mortalità si ebbe nei giorni 3, 4, 5 giugno, e questo forte ritardo non mi permise di preparare in tempo utile, da questi bachi malati dell'allevamento più precoce, il materiale immunizzante per trattare con esso tutti i bachi del grande allevamento in campagna. A causa di tale ritardo dovetti limitarmi ad immunizzare soltanto un lotto di bachi del grande allevamento che aveva avuto una nascita ritardata, e ad eseguire i trattamenti immunizzanti quando i bachi iniziavano la 5^a età, mentre avrei voluto effettuare l'operazione durante la 3^a o almeno durante la 4^a età.

Per raccogliere il materiale infettante ebbi cura di prelevare le vacche man mano ch'esse presentavano i primi sintomi della malattia; le schiacciavo subito con un torchietto da laboratorio ottenendo un liquido assai denso che diluivo immediatamente a 1/10 aggiungendo acqua distillata; al liquido così diluito assegnai per comodità il nome di *emulsione madre*.

Durante i primi giorni di giugno potei preparare una quantità considerevole di *emulsione madre*, e di questo materiale una parte mi servì subito per compiere le mie esperienze sull'allevamento primaverile in campagna, e la parte rimanente, che venne conservata in frigorifero a temperatura oscillante fra + 4° e + 8° C., mi permise di continuare le esperienze sull'allevamento autunnale.

L'allevamento in grande, sul quale condussi le esperienze primaverili, venne svolto a Cascina Ronco, presso Cernusco sul Naviglio (Milano), in locali di proprietà del Conte Melzi che gentilmente offrì l'ospitalità. Vennero colà allevati tre lotti di bachi, tenendoli separati in tre locali diversi; due di questi lotti, di mezz'oncia ciascuno, erano di razza incrociata Chinese, mezz'oncia a femmina gialla e mezz'oncia a femmina Oro; il terzo lotto di 1/4 d'oncia era di razza Gialla Indigena. La schiusura del seme avvenne tra l'11 e il 14 maggio ed il ritardo nelle nascite si ebbe appunto per i gialli indigeni, e ciò mi permise, come ho detto, di compiere le esperienze sul lotto stesso, mentre non mi fu possibile servirmi degli altri due, perchè la ritardata esplo-

sione di giallume nel piccolo allevamento di laboratorio non mi consentì di raccogliere sufficiente materiale virulento.

Gli esperimenti vennero quindi svolti soltanto sui bachi provenienti dal quarto d'oncia di Giallo indigeno, e le prove riuscirono assai significative, perchè questa razza è particolarmente sensibile al giallume.

I bachi di razza Giallo Indigeno vennero suddivisi in 6 lotti, dei quali uno non subì alcun trattamento e costitui il lotto di controllo, mentre gli altri cinque subirono trattamenti diversi. Questi trattamenti consistevano nella somministrazione ai bachi di liquido infettante o immunizzante per mezzo della foglia. Il liquido virulento costituito dall'emulsione madre servì ad infettare la foglia immergendola per qualche minuto nel liquido stesso; questa foglia veniva poi fatta sgrondare su arelle, e quando'era sufficientemente asciutta, veniva somministrata ai bachi durante un sol pasto.

Per meglio studiare i trattamenti profilattici, preparai due diversi liquidi immunizzanti. Il primo che chiamerò *liquido A*, venne preparato filtrando l'emulsione madre attraverso filtri di carta Schleicher e Schüll n. 595, utilizzando la depressione ottenuta con un comune aspiratore ad acqua, ed il liquido filtrato venne poi ulteriormente diluito a 1:100; tenendo conto che l'emulsione madre era già stata diluita a 1:10, arrivavo così alla diluizione di 1:1000, cioè alla *diluizione limite*.

Il secondo liquido, che chiamerò *liquido B*, venne preparato in modo analogo, filtrando però l'emulsione madre con candela di Chamberland L2, e portando poi il liquido alla *diluizione limite*.

La somministrazione dei liquidi immunizzanti venne eseguita col medesimo procedimento descritto per l'esecuzione dell'infezione artificiale, e costitui il primo trattamento compiuto sull'allevamento; questa immunizzazione venne eseguita il giorno 5 giugno alle ore 15 con la somministrazione del 1° pasto, quando tutti i bachi si erano levati da alcune ore dalla 4^a muta.

Dei 6 lotti solamente 4 subirono trattamenti immunizzanti e precisamente ai lotti n. 2 e n. 3 venne somministrato il *liquido A*, mentre i lotti n. 4 e n. 5 ricevettero il *liquido B*. Ai lotti n. 1 e n. 6 venne invece somministrato un pasto normale.

Allo scopo di poter meglio valutare l'efficacia dei trattamenti immunizzanti infettai artificialmente di giallume un lotto

per ciascuna coppia di lotti che erano stati immunizzati col medesimo liquido; per paragonare i risultati ottenuti sui bachi così trattati con bachi non immunizzati, infettai artificialmente uno dei due lotti che non subirono alcun trattamento; tale infezione artificiale ebbe luogo il giorno 8 giugno alle ore 16, sui lotti n. 1, n. 2 e n. 4, ritardando di ben 4 ore la somministrazione del pasto, ed impiegando l'emulsione madre ulteriormente diluita a 1:4.

Riassumendo dunque le esperienze sui diversi lotti vennero eseguite nel seguente modo:

Lotto n. 1. — Non subì alcun trattamento immunizzante; il giorno 8 giugno venne infettato artificialmente.

Lotto n. 2. — Venne immunizzato con *liquido A* il giorno 5 giugno e subì l'infezione artificiale l'8 giugno.

Lotto n. 3. — Immunizzato con *liquido A* il giorno 5 giugno; non venne infettato.

Lotto n. 4. — Venne immunizzato con *liquido B* il giorno 5 giugno, e venne artificialmente infettato l'8 giugno.

Lotto n. 5. — Immunizzato con *liquido B* il 5 giugno; non subì alcun trattamento infettante.

Lotto n. 6. — Costitui il controllo senza alcun trattamento.

L'allevamento procedette normalmente fino al 10 giugno in cui cominciò a svilupparsi una forte epizoozia di giallume e di flaccidezza che raggiunse la massima intensità nei giorni 12 e 13 giugno, cioè immediatamente prima della salita al bosco.

Purtroppo il forte sviluppo della flaccidezza mascherò parzialmente i risultati dei trattamenti immunizzanti; ma nel complesso i tentativi compiuti fornirono importanti ammaestramenti, come appare dalla tabella 1^a in cui sono riportati i risultati delle esperienze. In questa tabella vi è una colonna dei morti per causa dubbia, e questo si è dovuto fare per evitare errori nella raccolta giornaliera dei dati.

Innanzitutto da queste esperienze appare ben chiaro che i lotti immunizzati e poi infettati hanno subito una mortalità per giallume fortemente inferiore a quella del lotto n. 1 infettato e non immunizzato; in quest'ultimo vi è stata una mortalità per giallume del 28,12 %, mentre nel lotto n. 2, la mortalità per la

TABELLA I.

	Lotto N. 1 (Non immunizzato e infettato)	Lotto N. 2 (Immunizzato con <i>liquido A</i> e poi infettato)	Lotto N. 3 (Immunizzato con <i>liquido A</i> e non infettato)	Lotto N. 4 (Immunizzato con <i>liquido B</i> e poi infettato)	Lotto N. 5 (Immunizzato con <i>liquido B</i> e non infettato)	Lotto N. 6 (Controllo, senza nessun trattamento)
Numero dei bachi di ciascun lotto	1.643	1.560	1.409	1.443	1.468	2.122
Numero dei morti per Giallume	462	296	224	143	208	359
Percentuale	28,12 %	18,97 %	15,90 %	9,91 %	14,17 %	16,92 %
Numero dei morti per Flaccidezza	429	515	445	526	487	627
Percentuale	26,11 %	33,01 %	31,58 %	36,45 %	33,17 %	29,55 %
Numero dei morti per Macilienza	32	68	63	25	39	38
Percentuale	1,95 %	4,36 %	4,47 %	1,73 %	2,66 %	1,79 %
Numero dei morti per causa dubbia	139	162	150	137	117	173
Percentuale	8,46 %	10,39 %	10,64 %	9,50 %	7,99 %	8,15 %
Numero dei Bozzoli	851	519	527	612	617	925
Percentuale	35,36 %	33,27 %	37,41 %	42,41 %	42,03 %	43,59 %

stessa malattia fu del 18,97 %, e nel lotto n. 4 fu soltanto del 9,91 %.

Risulta così evidente l'azione favorevole dei trattamenti immunizzanti e si può anche osservare una maggiore efficacia esercitata dal liquido filtrato attraverso le candele di Chamberland L2, rispetto a quello semplicemente filtrato attraverso i filtri Schleicher e Schüll n. 595.

Confrontando i risultati dei due lotti immunizzati con il liquido A, si nota subito che il lotto n. 2 (che venne successivamente infettato), presentò una percentuale di giallume superiore a quella del lotto n. 3 (non infettato); invece nei due lotti trattati con liquido B, vi è un'apparente anomalia, perchè il lotto n. 4 subì una mortalità per giallume del 9,91 % pur essendo stato artificialmente infettato, mentre nel lotto n. 5 non infettato si ebbe una percentuale del 14,17 %. Effettivamente bisogna considerare che nel lotto n. 4 (meno colpito dal giallume) si ebbe una mortalità per flaccidezza maggiore ed una maggior percentuale di morti per causa dubbia rispetto al lotto n. 5; si può quindi ammettere che probabilmente il maggior sviluppo di flaccidezza abbia causato l'apparente anomalia.

Infine, paragonando i risultati ottenuti nel lotto di controllo con quelli ottenuti negli altri lotti appare: che lo sviluppo del giallume nel lotto n. 1 fu assai più elevato che nel lotto n. 6; che la percentuale di mortalità per giallume del lotto n. 2 superò leggermente quella del lotto n. 6, mentre tale percentuale nei lotti n. 3 e n. 5 fu di poco inferiore a quella del controllo. Questo fatto sta a significare che il trattamento immunizzante effettuato nella 5^a età era stato eseguito troppo tardi, cioè quando la malattia doveva già essere in istato di avanzata incubazione, e quindi le immunizzazioni potevano soltanto difendere i bachi da un'ulteriore infezione. Dal medesimo confronto risulta inoltre che il trattamento col liquido B oltre a determinare una maggior refrattarietà al giallume, consente un buon comportamento degli allevamenti rispetto alle altre malattie, tant'è vero che nel lotto n. 5 si verificò una egual percentuale di bozzoli a quella del lotto di controllo, mentre nel lotto n. 4 s'ebbe un prodotto di bozzoli inferiore soltanto dell'1 %.

Concludendo, da queste prime esperienze d'orientamento risultano già tre fatti importanti: 1) che i trattamenti immunizzanti sperimentati esercitano un'efficace azione preventiva contro il giallume; 2) che aumentando la finezza dei pori del mezzo filtrante aumenta l'efficacia immunizzante del liquido ottenuto; 3) che i trattamenti profilattici devono essere eseguiti prima della 5^a età, perchè altrimenti la malattia può diffondersi e raggiungere uno stato d'incubazione avanzato.

2° - Esperienze d'immunizzazione compiute nell'autunno del 1931.

I tentativi svolti nella primavera, pur essendo ancora lontani dal raggiungimento di risultati definitivi, mi avevano però fornito degli importanti insegnamenti, dei quali feci tesoro. Decisi di abbandonare l'impiego di filtri di carta, preferendo compiere uno studio comparativo tra i liquidi immunizzanti, filtrati attraverso diversi tipi di candele e cioè: Chamberland L2, L3, F e B.

Era mio intendimento di compiere degli esperimenti su vasta scala presso l'azienda del Cav. Velluti di Dolo (Venezia) che gentilmente ci aveva offerto l'ospitalità. Ma per un incidente indipendente dalla nostra volontà si dovette rinunciare all'impresa: le tre once di seme-bachi ordinato allo scopo ad Ascoli Piceno alla Ditta Catenacci (incrocio con la razza *S. A. n. 2*) diede un migliaio di baciolini durante il viaggio, e tutto il rimanente si essiccò. Mi rivolsi allora alla stessa Ditta per avere nuovo seme e lo ottenni; ma siccome mi si avvertì che il seme della seconda fornitura non sarebbe nato prima del 18-20 settembre, decisi di compiere le esperienze su di un allevamento più modesto da condurre nel Laboratorio di Zoologia Agraria e Bachicoltura in Milano, dove sarebbe stato possibile mantenere buone condizioni di temperatura anche in stagione autunnale inoltrata.

L'allevamento autunnale ebbe luogo impiegando seme ottenuto dall'incrocio riprodotto di bachi *S. A. n. 2* con bachi di razza Majella; le nascite di questo seme avvennero tra il 22 e il 23 settembre. L'allevamento procedette con rapidità pressochè normale fino alla 3^a età che ebbe inizio il mattino del 5 ottobre; in seguito l'allevamento subì un rallentamento, per la difficoltà di mantenere nelle camere una temperatura superiore a + 21° C. Il 12 ottobre cominciò la 4^a età che si protrasse fino al 20 ottobre. Di durata maggiore del normale fu pure la 5^a età, talchè la salita al bosco terminò nei primi giorni di novembre.

Dopo il 15 ottobre riuscì preoccupante la provvista di foglia, ma grazie al cortese interessamento della nobile casa dei Conti Mazzotti Biancinelli di Cavernago (Bergamo), fu possibile avere

tutta la foglia occorrente, della quale gli ultimi sacchi vennero conservati per qualche giorno in frigorifero.

Nonostante lo sviluppo ritardato nelle ultime età e l'impiego di foglia che negli ultimi giorni (causa la raccolta tardiva e la conservazione in frigorifero) non era sempre in perfette condizioni, l'allevamento presentò una scarsissima mortalità, non tenendo conto naturalmente dei lotti sottoposti ad infezione artificiale. I bozzoli ottenuti erano di piccole dimensioni ed avevano un peso medio di circa 1 gr. ciascuno; da questi bozzoli, conservati in locali non riscaldati, si ebbe uno sfarfallamento ritardato, ma ottimo per quanto concerne la vigoria delle crisalidi, dato che lo sfarfallamento fu quasi completo.

L'allevamento venne diviso in 15 lotti, tenuti su tavole separate; 8 lotti servirono per la sperimentazione di 4 diversi trattamenti immunizzanti; 1 lotto non subì trattamento alcuno e servì come controllo; un'altro lotto venne solamente infettato, ed infine gli altri vennero destinati allo svolgimento di esperienze per meglio conoscere le proprietà del liquido infettante, e di queste ultime parlerò in un ultimo paragrafo.

Per la preparazione del liquido immunizzante mi servii del materiale virulento diluito a 1:10 conservato dal mese di giugno in refrigerante ad una temperatura fra + 4° C. e + 8° C.

I 4 diversi liquidi immunizzanti vennero ottenuti filtrando l'*emulsione madre* attraverso filtri di Chamberland di porosità diversa e costituiti precisamente dalle candele L2, L3, F (corrispondente alla L5) e B (corrispondente alla L7), delle quali la più porosa è la candela L2. Dopo aver eseguito la filtrazione dell'*emulsione madre*, i liquidi ottenuti subirono — come nelle esperienze primaverili — una diluizione ulteriore in modo da ridurne la concentrazione a 1:1000.

Ripetendo quanto avevo già fatto nella primavera, distinsi i diversi liquidi con lettere dell'alfabeto e chiamai ancora *liquido B* quello filtrato attraverso la candela L2, mentre chiamai *liquido C* quello filtrato colla candela L3, *liquido D* quello filtrato con la candela F, e *liquido E* quello filtrato con la candela B.

La somministrazione del liquido virulento e dei liquidi immunizzanti venne eseguita per mezzo della foglia, seguendo il medesimo procedimento già descritto per le esperienze primaverili.

Tutti i trattamenti immunizzanti vennero eseguiti una sola volta e contemporaneamente il giorno 8 ottobre alle ore 20.30, ritardando d'un paio d'ore la somministrazione del pasto; tale immunizzazione, eseguita quando i bachi si trovavano in 3^a età (il 1° pasto dopo la seconda muta era stato somministrato la mattina del 5 ottobre), non poteva — data appunto l'età dei bachi — consentire un notevole sviluppo di giallume, come avvenne nelle esperienze primaverili; con ciascuno di questi liquidi immunizzai 2 lotti, in modo che i lotti trattati furono 8. Sette giorni dopo, e precisamente il giorno 15 ottobre, alle ore 17, quando i bachi erano in 4^a età, esegui l'infezione artificiale sopra 4 lotti immunizzati con i 4 liquidi diversi, ed estesi il trattamento infettante ad 1 dei 2 lotti che non avevano subito trattamento alcuno; per l'esecuzione dell'infezione artificiale mi servii dell'*emulsione madre* senza sottoporla ad ulteriore diluizione. Il lotto che non subì alcun trattamento servì di controllo per queste esperienze e per quelle di cui parlerò più avanti.

Riassumendo le esperienze autunnali vennero così distribuite:

Lotto I. — Immunizzato con *liquido B* il giorno 8 ottobre (3^a età).

Lotto II. — Immunizzato con *liquido C* il giorno 8 ottobre 3^a età).

Lotto III. — Immunizzato con *liquido D* il giorno 8 ottobre 3^a età).

Lotto IV. — Immunizzato con *liquido E* il giorno 8 ottobre 3^a età).

Lotto V. — Immunizzato con *liquido B* il giorno 8 ottobre (3^a età) e infettato artificialmente il 15 ottobre (4^a età).

Lotto VI. — Immunizzato con *liquido C* il giorno 8 ottobre (3^a età) e infettato artificialmente il 15 ottobre (4^a età).

Lotto VII. — Immunizzato con *liquido D* il giorno 8 ottobre (3^a età) e infettato artificialmente il 15 ottobre (4^a età).

Lotto VIII. — Immunizzato con *liquido E* il giorno 8 ottobre (3^a età) e infettato artificialmente il 15 ottobre (4^a età).

Lotto IX. — Infettato artificialmente il 15 ottobre (4^a età).

Lotto X. — Non subì trattamento alcuno.

Nella tabella II sono riportati i risultati delle esperienze di immunizzazione compiute nell'autunno del 1931.

TABELLA II.

Indicazione dei lotti	Numero dei bacilli di ciascun lotto	Morti per GIALLUME		Morti per FLACCIDENZA		Morti per MACILLENZA		BOZZOLI	
		Numero	Percent.	Numero	Percent.	Numero	Percent.	Numero	Percent.
LOTTO I Immunizzato con <i>liquido B</i>	829	21	2.53	19	2.29	—	—	789	95,18
LOTTO II Immunizzato con <i>liquido C</i>	835	16	1.91	6	0.72	—	—	813	97,37
LOTTO III Immunizzato con <i>liquido D</i>	631	8	1.26	4	0.63	—	—	619	98,11
LOTTO IV Immunizzato con <i>liquido E</i>	489	7	1.43	2	0.41	1	0.20	479	97,96
LOTTO V Immunizzato con <i>liquido B</i> e infettato	893	34	3.80	10	1.12	2	0.22	847	94,86
LOTTO VI Immunizzato con <i>liquido C</i> e infettato	1046	41	3.92	7	0.67	6	0.57	992	94,84
LOTTO VII Immunizzato con <i>liquido D</i> e infettato	958	23	2.40	9	0.94	2	0.21	924	96,45
LOTTO VIII Immunizzato con <i>liquido E</i> e infettato	858	16	1.85	9	1.04	1	0.11	832	97
LOTTO IX Infettato ma non immunizzato	773	70	9.05	15	1.94	1	0.13	687	88,88
LOTTO X Controllo senza trattamenti	494	17	3.44	2	0.40	1	0.20	474	95,96

Osservando i risultati relativi ai primi 4 lotti e confrontandoli con quelli del lotto di controllo (X), si può constatare che i trattamenti immunizzanti hanno costantemente determinato una notevole diminuzione della mortalità per giallume, che è discesa a molto meno della metà nei lotti trattati con liquido filtrato attraverso le candele più fini (F e B). E dal medesimo confronto si può anche affermare che diminuendo la porosità delle candele impiegate per le filtrazioni aumenta la refrattarietà al giallume da parte dei lotti immunizzati con i diversi liquidi; e l'apparente anomalia per cui il lotto III (immunizzato col *liquido D* filtrato con la candela F) presenta una mortalità per giallume di 1,26 % di fronte a quella di 1,43 % del lotto IV (immunizzato con *liquido E* filtrato con candela B) può essere facilmente spiegata pel fatto che la differenza del 0,17 % è trascurabile e rientra nei limiti degli errori di sperimentazione, ed anche perchè nel lotto III vi è stata una mortalità per flaccidezza superiore del 0,22 %, per cui si potrebbe anche ammettere che il maggior sviluppo di quest'ultima malattia abbia mascherato lo sviluppo del giallume determinando la lievissima differenza.

Assai brillanti sono i risultati delle esperienze di immunizzazione seguita da infezione artificiale; esse vennero svolte sui lotti V, VI, VII, VIII, nei quali, nonostante l'avvenuta infezione artificiale (che nel lotto IX non immunizzato aveva determinato una mortalità del 9,05 %) si è avuta una mortalità scarsissima; tale mortalità nei lotti V (immunizzato con *liquido B*) e VI (immunizzato con *liquido C*) fu soltanto lievemente superiore a quella del lotto di controllo, mentre nei lotti VII (immunizzato col *liquido D*) e VIII (immunizzato col *liquido E*) si è verificata una percentuale di morti per giallume fortemente inferiore a quella del lotto di controllo!

Anche il fatto per cui il lotto VI presenta una mortalità lievemente superiore a quella del lotto V (la differenza è del 0,12 % soltanto), dev'essere evidentemente attribuito ad un maggior sviluppo della flaccidezza nel lotto V, che supera del 0,45 % la percentuale di flaccidezza del VI lotto.

Concludendo, resta confermato che la diminuzione della porosità delle candele usate per la preparazione dei liquidi immunizzanti, determina un aumento continuo della refrattarietà al

giallume. Il miglior risultato finora raggiunto fra i diversi lotti sperimentali è quello ottenuto nel lotto VIII, che ebbe una percentuale di giallume del 1,85 % di fronte a quella del 9,05 del lotto non immunizzato, ma infettato, e di fronte a quella del 3,44 % del lotto di controllo.

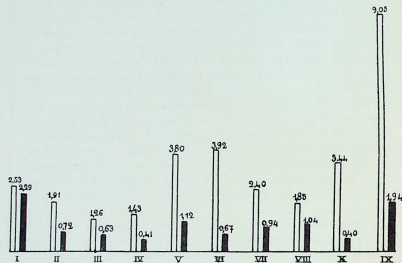


Diagramma raffigurante l'andamento della mortalità nei diversi lotti degli esperimenti autunnali. Le colonne bianche rappresentano le percentuali di mortalità per giallume; quelle nere le percentuali di flaccidezza. I numeri romani posti inferiormente a ciascuna coppia di colonne corrispondono ai numeri dei diversi lotti dei quali si parla nel testo.

Queste esperienze non danno ancora sicure indicazioni sul meccanismo d'azione dei liquidi somministrati, per cui non si può ancora affermare se si tratti di un'azione simile a quella di un vaccino, oppure analoga a quella delle proteine specifiche usate nella moderna terapia.

Allo scopo di determinare se l'azione immunizzante sia esercitata dal solo liquido proveniente da bachi giallumosi, oppure sia comune ai liquidi ottenuti spremendo bachi sani, mi propongo di compiere apposite ricerche sperimentali.

3° - Ricerche sulla diminuita virulenza del liquido infettante, in seguito a speciali trattamenti.

Nel medesimo allevamento sperimentale condotto in Laboratorio nell'autunno del 1931 destinai 5 lotti allo svolgimento di alcune esperienze sulle proprietà del liquido infettante, mentre i lotti IX e X mi servirono contemporaneamente a stabilire un paragone per queste ultime esperienze oltrechè per quelle già descritte.

Per l'esecuzione di queste ricerche trattai 4 lotti con *emulsione-madre* diluita a 1/10, conservata in frigorifero dal mese di giugno, e filtrata con candele di Chamberland di porosità diversa. Tali trattamenti vennero eseguiti il giorno 13 ottobre alle ore 8, somministrando durante un sol pasto la foglia che venne immersa nei diversi liquidi filtrati (non sottoposti ad ulteriore diluizione), per qualche minuto, e che fu poi lasciata asciugare.

Contemporaneamente procedetti ad analogo trattamento su di un ultimo lotto a cui somministrai per una sola volta la foglia trattata con *emulsione-madre*, che venne durante l'estate sottoposta a tre congelamenti successivi.

Riassumendo, per l'esecuzione delle ricerche distribuii nel seguente modo le esperienze:

Lotto XI. — Trattato il giorno 13 ottobre (4° età) con *emulsione-madre* filtrata con candela L2.

Lotto XII. — Trattato il 13 ottobre (4° età) con *emulsione-madre* filtrata con candela L3.

Lotto XIII. — Trattato il 13 ottobre (4° età) con *emulsione madre* filtrata con candela F.

Lotto XIV. — Trattato il 13 ottobre (4° età) con *emulsione-madre* filtrata con candela B.

Lotto XV. — Trattato il 13 ottobre (4° età) con *emulsione-madre* ripetutamente congelata.

Nella tabella III sono esposti i risultati di queste esperienze e per poter stabilire gli opportuni confronti ho riportato i risultati già citati dei lotti IX e X.

TABELLA III.

Indicazione dei lotti	Numero dei lotti di ciascun lotto	Morti per GIALLUME		Morti per FLACCIDEZZA		Morti per MACILEZZA		BOZZOLI	
		Numero	Percent.	Numero	Percent.	Numero	Percent.	Numero	Percent.
		LOTTO IX - Infettato artificialmente	773	70	9,05	15	1,94	1	0,13
LOTTO X - Controllo senza trattamenti	494	17	3,44	2	0,40	1	0,20	474	95,96
LOTTO XI - Trattato con emulsione madre filtrata con candela L 2	666	31	4,65	4	0,60	—	—	631	94,75
LOTTO XII - Trattato con emulsione madre filtrata con candela L 3	731	23	3,15	9	1,23	1	0,18	698	95,44
LOTTO XIII - Trattato con emulsione madre filtrata con candela F	583	26	4,44	3	0,51	1	0,17	553	94,88
LOTTO XIV - Trattato con emulsione madre filtrata con candela B	427	18	4,21	6	1,40	—	—	403	94,39
LOTTO XV - Trattato con emulsione madre ripetutamente congelata	525	20	3,80	3	0,57	—	—	502	95,63

Confrontando i risultati del lotto di controllo con quelli dei successivi 5 lotti si può notare che in quest'ultimi la mortalità percentuale di giallume fu di poco superiore alla mortalità ordinaria, mentre tale percentuale subì una fortissima riduzione rispetto a quella del lotto IX, infettato artificialmente.

Escludendo da questa considerazione i risultati anomali del lotto XII e confrontando tra loro le percentuali di giallume dei lotti XIII, XIV, XV, risulterebbe che ad un aumento di finezza dei pori delle candele impiegate per la filtrazione del liquido virulento, corrisponde una continua diminuzione della mortalità

per giallume. Però tale diminuzione non è troppo spiccata; e quindi, tenendo conto della notevole anomalia presentata dal lotto XII, il voler trarre, una conclusione definitiva su questo fatto sarebbe per ora alquanto arrischiato.

Assai significativa è l'esperienza condotta sul lotto XV che venne trattato con liquido virulento ripetutamente congelato e che presentò una mortalità per giallume poco diversa, sebbene leggermente superiore a quella del lotto di controllo; considerando poi che nel lotto XV si ebbe una percentuale di giallume del 3,80 %, mentre nel lotto IX, infettato col medesimo liquido che non subì però alcun trattamento, la mortalità per giallume fu del 9,05 %, si deve necessariamente riconoscere che in seguito al congelamento il liquido virulento abbia veramente perduto totale o quasi totalmente il suo potere infettante.

I risultati delle esperienze condotte sugli ultimi 5 lotti ed in modo particolare quelle del lotto XV, benché possano essere isolatamente spiegate in modi diversi, non contrastano, anzi depongono a favore delle teorie sulla natura parassitaria del giallume, ed in particolare portano nuove documentazioni alla teoria clamidozoaria.

Dopo le ampie illustrazioni da me date (6) ai *cocchi vescicolari* scoperti da VERNON (7,8) si può ritenere particolarmente accettabile la teoria clamidozoaria sulla natura del giallume, con la quale s'ammette che la malattia sia dovuta ad un essere vivente che presenta durante il suo ciclo di sviluppo nell'ospite delle formazioni visibili al microscopio, mentre durante altre fasi di sviluppo sarebbe costituito da formazioni ultramicroscopiche filtrabili con le candele di Chamberland. Questi supposti parassiti, sviluppandosi nel baco colpito, determinano delle speciali alterazioni nei nuclei, entro ai quali i parassiti stessi si sviluppano e crescono gradatamente di numero, assumendo la

(6) F. GANCULO. — Studi e ricerche sul giallume del baco da seta. — Bollettino del Laboratorio di Zoologia Agraria e Bachiocoltura del R. Istituto Superiore Agrario di Milano. - Vol. II, Anno 1929-30.

(7) E. VERNON. — Sulla evoluzione postembrionale degli arti toracali e cefalici del *filugello*. — Annuario della R. Stazione Baciologica di Padova. - Volume XXXI, 1903.

(8) E. VERNON e C. GHIRLANDA. — Sul microbio specifico del giallume bombycino. - Annuario della R. Stazione Baciologica di Padova. - Vol. XLII, 1917.



forma di *cocchi vescicolari* (diversi probabilmente dai comuni cocchi, ma che così continuo a chiamare per conservare l'espressione adottata dal loro scopritore), i quali rigonfiano i nuclei dopo aver provocato una graduale distruzione della cromatina (9).

Conclusioni.

Riassumendo, in base ai risultati delle ricerche condotte durante quest'anno, si possono formulare le seguenti conclusioni:

1) Che il liquido virulento, filtrato con candele di Chamberland e diluito a 1:1000, somministrato per mezzo della foglia, conferisce ai bachi una spiccata refrattarietà al giallume.

2) Che l'azione immunizzante è tanto più efficace, quanto maggiore è la finezza dei pori delle candele impiegate per la filtrazione dei liquidi.

3) Che dagli esperimenti, finora compiuti non risultano ancora sicuri elementi per poter stabilire quale sia il meccanismo d'azione dei trattamenti immunizzanti; occorrono quindi nuove sperimentazioni per poter sapere se il processo immunizzante sia dovuto all'azione di un vaccino, o non sia di natura aspecifica e legato all'azione di talune proteine.

4) Che il liquido virulento, sottoposto a congelamento, non è più capace di determinare nei bachi uno sviluppo di giallume superiore a quello ordinario.

5) Che la filtrazione del liquido infettante attraverso le candele di Chamberland, attenua fortemente la virulenza del liquido stesso quando questo non sia stato diluito.

Complessivamente, i risultati ottenuti pur non essendo definitivi, sono assai incoraggianti, e fanno sperare che seguendo questa via nella sperimentazione, si potrà forse raggiungere una meta di grande valore scientifico, con applicazioni pratiche di non minore importanza.

(9) C. ACQUA vorrebbe affermare d'aver già illustrato prima di me le alterazioni nucleari nei tessuti di bachi malati di giallume e i cocchi vescicolari, citando dei lavori nei quali egli tratta invece degli straterelli membranosi avvolgenti i cristalli.

Contributo alla biologia ed all'embriologia della GALERUCCELLA LUTEOLA (F. Müller) e del suo endofago TETRASTICHUS XANTHOMELAEAE (Rond.)

(NOTA PRELIMINARE)

Nel novembre 1930 ho intrapreso uno studio biologico ed embriologico della *Galerucella luteola* (F. Müller) contemporaneamente a quello del suo endofago *Tetrastichus xanthomelaenae* (Rond.).

La ricchezza di materiale, grandissima negli anni 1928 e 1929 sui Carpini di alcuni giardini milanesi, faceva ritenere agevole il mio studio, almeno per quanto riguarda la *Galerucella*; ma nel 1930 l'infezione si era fortemente attenuata, e nel 1931 la scarsità di uova, larve e adulti di *Galerucella* fu tale, da permettermi di svolgere, a gran fatica, soltanto una parte del programma di lavoro, che mi ero prefisso.

Nondimeno, avendo potuto osservare fatti biologici ed embriologici che ritengo possano interessare gli studiosi, ho diviso di darne notizia in questa nota preliminare, che sarà poi seguita da un lavoro completo e ampiamente illustrato.

La difficoltà, cui ho accennato, di poter procurarmi in natura il materiale necessario in quantità sufficiente, mi persuase a condurre in Laboratorio un allevamento di *Galerucella* e di *Tetrastichus*, onde avere uova di cui poter sicuramente controllare l'epoca della deposizione, e quindi l'età dell'embrione.

Oltre alle difficoltà inerenti alla disponibilità di materiale adatto, ho trovato poi difficoltà non indifferenti nello svolgimento del lavoro, specialmente nella tecnica dei preparati embriologici; mi è gradito rivolgere qui un particolare ringraziamento al mio maestro, Prof. GRANDORI, che mi fu largo di assistenza e consigli per tutta la durata delle mie non facili ricerche.