

## Esperimenti per controllare l'immunizzazione dei bachi da seta contro la pebrina col metodo Karakan

Il problema dell'immunità acquisita del Baco da seta, ritenuta, almeno fino ad oggi, pressochè impossibile, trattandosi di immunità contro un protozoo, è stato risollevato in questi ultimi 10 anni da alcuni studiosi russi.

Nel 1931 KARAKAN affermava di aver ottenuto, mediante una sua speciale tecnica, l'immunizzazione artificiale del baco da seta contro la pebrina, e precisamente mediante una immersione del seme sano nell'emulsione ottenuta pestando il seme pebrinoso, ed effettuando tale immersione durante l'ibernazione.

Fra il 1932 e il 1935 si ripeterono, in presenza dell'Autore, gli esperimenti Karakan nell'Istituto Scientifico di Sericoltura dell'Asia Centrale, con esito positivo.

Nel 1936 il POLTEV, per incarico dell'Amministrazione Principale dell'industria della seta dell'U.R.R.S. ha ripetuto gli esperimenti con l'intento di risolvere due quesiti:

1°) il problema immunologico, e cioè la messa a punto delle basi teoriche del fenomeno Karakan;

2°) il problema morfologico, e cioè il ciclo evolutivo del parassita della pebrina del baco da seta.

I risultati ottenuti da POLTEV confermarono ancora una volta quelli del Karakan; e poichè essi erano oltre modo interessanti, e la tecnica del Karakan non presentava alcunchè di particolarmente difficile o che richiedesse una specialissima preparazione, il Prof. GRANDORI, direttore dell'Istituto di Entomologia Agraria e Bachicoltura, mi incaricava nel 1938 di ripetere e controllare gli esperimenti Karakan, attenendomi scrupolosamente alle indicazioni date dal POLTEV sui metodi seguiti nella sperimentazione.

### GLI ESPERIMENTI DEI RICERCATORI RUSSI

Come materiale per le esperienze di immunizzazione gli AA. russi impiegarono il seme marca 0 (zero) della razza di Bagdad, fornito dal semaio di Oчек, mentre per la preparazione dell'antigene, si servirono

di seme pebrinoso, di razza non specificata, consegnato dal centro di Kokanda.

Le immunizzazioni furono compiute nel seguente modo: « Una parte (in peso) del seme pebrinoso, preso direttamente dal frigorifero e pestato in un mortaio, fu addizionata a 2,5 parti di acqua di rubinetto; il tutto fu accuratamente mescolato e passato attraverso una garza ».

Alle emulsioni ottenute così, cioè secondo il metodo Karakan, venne dato il nome di « antigene ».

Oltre a questo antigene specifico, furono usati come materiali immunizzanti anche antigeni non specifici, come: il bianco e rosso d'uovo, il seme sano, la gelatina, il collodio e la celloidina.

Il seme, avviluppato in un pezzo di garza, venne tuffato negli antigeni fino ad assorbimento completo, poi ritirato dall'emulsione e liberato del superfluo, infine steso sopra uno strato sottile di garza venne rimesso nel frigorifero.

Dopo l'immunizzazione il seme fu conservato per il rimanente dell'inverno e fino al momento dell'incubazione, ad una temperatura di 3°-6°, centigradi.

L'incubazione s'iniziò il 16 aprile ed il seme da sperimentare, tenuto in scatole, fu trasportato in un locale a temperatura ordinaria.

A partire dal 19 aprile si mantenne in quella camera un'umidità del 70% ed una temperatura di +20° C. che fu elevata quotidianamente di 1°, fino a +25°.

Furono distrutti tutti i bachi nati il 24, 25, 26 aprile e tenuti quelli nati il 27, avendone potuto raccogliere un numero considerevole e sufficiente, per le esperienze da farsi.

Essi furono ripartiti in lotti da 50 a 200 bachi ciascuno e posti in piccole scatole separate.

Ogni quattro lotti costituirono una serie, e furono marcate, oltre che con numero generale comune, con I - II - III - IV. In questo modo ogni serie venne ad essere composta da 600 - 800 bachi, divisi in quattro lotti, il primo destinato ad essere infettato nella prima età, il II° nella terza, il III° nella quinta, ed il IV° a servire di controllo.

All'inizio dell'allevamento i bachi si trovavano nel laboratorio della Sezione di Microbiologia dell'Istituto a Tachkent, ma dopo il 9 maggio, furono trasportati in una bigattiera, costituita appositamente per i lavori della Sezione, situata a Djar-Aryk, a qualche chilometro dalla città, in mezzo alle piantagioni dell'Istituto.

La bigattiera in questione aveva sei *boxes*, isolati l'uno dall'altro.

I bachi vennero infettati somministrando foglie sporcate di spore di *Nosema*, e perchè le mangiassero volentieri furono tagliate in strisce.

Inoltre, le striscie vennero battute a mano con una spazzola, per avere una grande quantità di minute aperture ove penetrasse il liquido.

Finito l'allevamento, all'ottavo giorno dalla salita al bosco, i bozzoli furono contati, pesati e messi in sacchetti speciali. I bozzoli filati dai bachi di una serie, furono tenuti divisi da quelli di un'altra.

Le farfalle rimasero fino alla loro morte in questi sacchetti; in seguito fu fatto l'esame microscopico.

Gli sperimentatori russi eseguirono queste prove, per potere stabilire se il mancato attecchimento della pebrina era dovuto ad una vera resistenza acquisita dell'embrione per effetto del trattamento oppure alla semplice formazione di membrane colloidali attorno a quello, che impedivano la penetrazione del microrganismo nell'uovo.

Dai russi fu tenuto in considerazione che molte delle razze giapponesi e cinesi, da taluni ritenute più resistenti alla pebrina in confronto delle razze europee, sono agglutinanti, mentre le razze europee non lo sono.

Fu tenuto conto perciò del fatto che con la immunizzazione si forma un involuppo colloidale albuminoide, dovuto all'emulsione di seme pebrinoso alla superficie del guscio del seme immunizzato.

Poteva infatti essere ammessa l'ipotesi di una relazione fra il fenomeno di Karakhan e la creazione artificiale di una membrana colloidale alla superficie delle uova.

E' appunto per sperimentare il valore di questa ipotesi che POLTEV ha tentato l'immunizzazione del seme-bachi anche con gli antigeni non specifici sopra nominati.

Questi esperimenti diedero però risultati negativi, giacchè tutti i lotti immersi in quegli antigeni si infettarono come i controlli.

Da ciò i russi conclusero che il meccanismo della immunità non era in relazione al formarsi di membrane colloidali di albumina o di sostanze di qualsiasi specie, ma doveva essere cercato nell'azione dell'antigene specifico.

Durante queste esperienze i russi notarono che le uova trattate con i diversi antigeni avevano subito un ritardo alla schiusura, in confronto ai semi sani non trattati e tenuti di controllo.

Infatti le uova immunizzate con l'antigene specifico ebbero un giorno di ritardo, quelle con la gelatina due, infine quelle con la celloidina tre o quattro giorni; inoltre, a un più forte ritardo corrispondeva una maggiore percentuale di fallanza alle nascite. Questi due fenomeni sono strettamente collegati, perchè — secondo l'Autore — con l'aumentare dello spessore del guscio, aumenta il tempo necessario al baco per la rottura dell'uovo, e perciò si ha un ritardo nella schiusura; quindi cre-

scono anche considerevolmente le difficoltà di uscita all'esterno per il baco stesso, e da qui una maggiore percentuale di mortalità.

Nella immunizzazione con l'antigene specifico gli Autori russi ottennero dei risultati nettamente positivi, come si può ben vedere dai seguenti dati:

*Bachi immunizzati*

Età dell'infezione	N.º dei bachi esaminati	N.º dei bachi infetti	% di bachi infetti
Prima . . .	150	0	0,0
Terza . . . .	147	5	3,4
Quinta . . .	151	10	6,6

*Controllo*

Prima . . .	93	87	93,5
Terza . . . .	144	107	74,3
Quinta . . .	146	140	96,6

Sui bachi immunizzati allo stadio embrionale, e poi infettati nella 1.<sup>a</sup> età, l'infezione artificiale mediante foglie « abbondantemente coperte di spore di pebrina » non avrebbe dunque menomamente attecchito, mentre nel lotto di controllo attecchì sul 93,5% degli individui.

L'infezione somministrata alla terza età avrebbe attecchito soltanto sul 3,4% di individui, contro il 74,3% del corrispondente controllo. Infine l'infezione data alla quinta età attecchì in una percentuale del 6,6% contro il 96,6% del controllo.

I russi notando quest'aumento della percentuale dei bachi infettati quanto più tardivamente si somministra l'infezione, espressero il parere che deve esistere una relazione tra l'età del baco e la sua immunità acquisita, e che con l'età, l'immunità dei bachi diminuisce progressivamente.

Gli sperimentatori russi inoltre, pesando i bozzoli di bachi immunizzati ed infettati in diverse età e quelli di bachi non immunizzati e infettati, trassero la conclusione, che l'immunizzazione non influisce sul peso del bozzolo, mentre l'infezione precoce di bachi non immunizzati, possiede una influenza negativa sul loro peso.

Un'altra prova eseguita dagli Autori russi fu la seguente.

Essi presero una parte delle uova immunizzate, con le quali poi ottennero risultati positivi, e prima della loro schiusura, le trattarono per 5 minuti con una soluzione di acido cloridrico al 10% ed un'altra parte con una soluzione di formolo al 4%.

L'acido cloridrico fu impiegato come distruttore dell'antigene, ed il formolo come disinfettante della pebrina e denaturante dell'antigene.

Se la immunizzazione si fosse conservata anche dopo l'azione dell'acido cloridrico sull'antigene, si sarebbe dovuto ammettere la penetrazione del parassita attraverso la membrana e la successiva sua azione che ha conferito all'embrione l'immunità prima della sua schiusura, mentre se l'immunizzazione dei bachi fosse riuscita dopo il trattamento con la soluzione di formolo, si sarebbe potuto affermare che l'immunizzazione con un antigene non vivente è possibile.

I risultati ottenuti furono i seguenti:

*Trattamento con acido cloridrico del seme immunizzato:*

Età dell'infezione	N.º dei bachi esaminati	N.º dei bachi infetti	Percentuale degli infetti
Prima . . . .	158	153	96,8
Terza . . . .	104	92	88,4
Quinta . . . .	105	90	85,7

*Trattamento con la soluzione di formolo del seme immunizzato:*

Prima . . . .	85	76	89,4
Terza . . . .	150	140	93,3
Quinta . . . .	153	58	37,4

Il trattamento con acido cloridrico e formolo del seme immunizzato dimostrò completamente negativa l'azione immunizzante.

Queste esperienze escludono l'ipotesi della penetrazione del parassita della pebrina, sia durante l'ibernazione sia durante l'incubazione, attraverso il guscio delle uova immerse nell'antigene, e suggeriscono, secondo POLTEV, un'ipotesi più razionale, vale a dire che il baco riceve l'antigene nel momento in cui rosicchia e deglutisce una piccola calotta del guscio per uscire all'esterno.

Gli Autori osservarono poi che l'immunità artificiale contro il *No-sema* è strettamente specifica. Gli esperimenti dimostrarono infatti che i bachi immunizzati sono estremamente resistenti all'infezione della pebrina; ma, come gli individui non immunizzati, sono facilmente colpiti da altre malattie, come il giallume e la flaccidezza.

Negative furono le esperienze degli Autori russi per ottenere l'immunizzazione con gli allevamenti estivi e autunnali, nonostante i loro sforzi per creare condizioni che assicurassero il successo dell'immunizzazione abituale di primavera.

A questo scopo posero in ghiacciaia il seme trattato con bagno in acido cloridrico, per ottenere lo schiudimento estemporaneo, e ve lo lasciarono da 8 a 21 giorni, immunizzandolo con differenti antigeni specifici.

Ma il risultato fu negativo perchè l'allevamento si dimostrò infetto. Gli Autori russi diedero di ciò la seguente spiegazione: il fenomeno si trova probabilmente in rapporto con le diverse condizioni ecologiche, nelle quali si trovano gli allevamenti estivi in confronto di quelle primaverili. Condizioni, le prime, meno favorevoli ai bachi, che hanno pure i loro organismi meno resistenti. Spiegazione questa che, dal punto di vista immunologico, è ben poco soddisfacente.

### LE OSSERVAZIONI DEGLI AUTORI RUSSI

Nel suo lavoro il POLTEV, dopo aver descritto le diverse esperienze, si domanda in che cosa consiste la natura del fenomeno immuno-biologico del Karakan, e la definisce una *immunità non sterilizzante*.

Ciò confermerebbe innanzi tutto l'impossibilità di ottenere l'immunità per mezzo di *Nosema bombycis* (vaccino morto), come dimostrano le esperienze col formolo.

Inoltre l'antigene ucciso con il disseccamento non eserciterebbe egualmente nessun effetto positivo.

L'Autore ottenne risultati negativi tentando di immunizzare uova destinate a dare nascita a bachi per un allevamento estivo per mezzo di pesto ottenuto da gusci vuoti di uova già schiuse e che erano già state immunizzate.

Infine l'impossibilità di immunizzazione degli allevamenti estivi ed autunnali, può essere appunto spiegata con l'esistenza dell'immunità non sterilizzante, perchè le condizioni di estate, meno favorevoli per i bachi, indeboliscono il loro organismo ed in luogo dell'immunità, danno loro l'infezione abituale della pebrina.

Gli sperimentatori russi si posero allora le seguenti questioni:

A quale stadio di evoluzione si sofferma il parassita della pebrina nell'organismo del baco da seta immunizzato?

Perchè il parassita non passa per il ciclo evolutivo abituale e perchè non provoca nei bachi l'infezione abituale?

In risposta a queste domande gli AA. russi riportarono delle indicazioni concernenti tutte queste questioni, prese dal classico lavoro dello STEMPELL (1).

Questi annota che, in un caso, egli ha osservato il parassita, 5 giorni dopo l'infezione del baco, quasi esclusivamente allo stadio di planonte.

Egli suppone che « ci si trova in presenza di un caso di immunità

(1) STEMPELL W. - Ueber *Nosema bombycis* Nägeli - Arch. f. Protistenkunde, Bend XV, 1909.

in cui i tessuti del baco opposero una resistenza così intensa alla penetrazione ed allo sviluppo ulteriore del parassita che condusse solamente alla moltiplicazione anormale ed all'accrescimento dei planonti ».

In altri termini: vi è anzitutto infezione abituale: il parassita penetra nell'intestino del baco ed il germe ameboide dà lo stadio di planonte, che penetra nell'intestino e si moltiplica.

Essendo l'organismo immune, non ha luogo l'ulteriore evoluzione del parassita, cioè la sua trasformazione in stadio di meronte.

Si stabilisce così un equilibrio favorevole al baco; la presenza del parassita nel suo organismo sostiene per tutta la vita del borbice la immunità, ed in questo modo lo preserva da ulteriori infezioni.

Infatti il parassita, non potendosi trasformare in meronte, che è lo stadio più nocivo per l'organismo, permette che lo sviluppo dei bachi segna un corso del tutto normale.

Gli AA. russi, dopo aver così spiegato il fenomeno dell'immunizzazione, dovettero rispondere alla domanda: perchè in un baco immunizzato non ha luogo l'infezione?

E dissero che bisogna cercare questa risposta nei seguenti fatti:

1) anzitutto il parassita si trova in uno stadio speciale nell'uovo in diapausa, e questo stadio speciale è utilizzato in qualità di antigene;

2) tali stadi speciali (stades initiaux) della pebrina sono indeboliti dalla conservazione della superficie del guscio del seme immunizzato per effetto delle temperature basse e disseccamento;

3) infine la resistenza dell'organismo del baco appena nato è esaltata essendo risaputo che gli organismi neonati manifestano molto spesso un'alta resistenza verso le infezioni.

I ricercatori russi cercarono di stabilire, per poter risolvere la questione della natura del fenomeno di Karakan, quanto tempo il parassita può rimanere allo stadio di planonte, ricercando tale stadio nell'interno del baco immunizzato ed esaminato in 5.<sup>a</sup> età; ma tutte le ricerche, fatte accuratamente sui differenti tessuti e sull'emolinfa risultarono negative.

Prima di analizzare il lavoro degli sperimentatori russi, credo opportuno premettere alcune osservazioni sulle loro prove.

### PRIME CRITICHE SUL LAVORO RUSSO

Il lavoro del POLTEV, anzitutto, non descrive minutamente i metodi e le modalità seguite per la vaccinazione Karakan, e precisamente non specifica:

1) - in quale momento dell'ibernazione le uova sono state vaccinate. Dall'esposizione della pubblicazione si capisce soltanto che la vacci-

nazione non avvenne prima di porre il seme in frigorifero per l'ibernamento, perchè il POLTEV dice soltanto di aver tolto dal frigorifero il seme pebrinoso ed il seme da vaccinare, e di aver poi rimesso in frigorifero il seme vaccinato.

Però in un punto del lavoro egli si riferisce a risultati positivi della immunizzazione dell'8 maggio; vi è quindi da presumere che il trattamento fosse stato fatto a tale data.

2) - Non dice il POLTEV se abbia esaminato il vaccino al microscopio per la ricerca di spore eventualmente presenti.

3) - Non precisa il grado di infezione, espresso in numero di spore, dato ai bachi provenienti da seme vaccinato e poi infettati durante la vita larvale.

4) - Ignora l'esistenza di spore mature di *Nosema* negli embrioni di bachi durante la diapausa;

5) - Non sempre precisa il periodo di tempo d'azione dell'antigene; è soltanto lecito supporre che le uova schiuse in primavera siano state trattate con l'antigene prima dell'incubazione per un periodo di tempo variabile da 8 a 21 giorni di permanenza delle uova destinate agli allevamenti estivi e autunnali.

Dati i punti oscuri della relazione del POLTEV, gli esperimenti da me eseguiti nell'annata bacologica del 1938 nei locali dell'Istituto di Entomologia Agraria e Bachicoltura furono svolti tentando di attenersi nel miglior modo ai metodi ed alle modalità che si potevano logicamente arguire dalla relazione stessa, non solo, ma si dovettero moltiplicare i lotti in esperimento affinché almeno alcuni di questi realizzassero le condizioni di quelli degli AA. russi.

Inoltre furono aggiunti parecchi altri esperimenti di controllo condotti con criteri diversi, e che diedero interessanti risultati.

## ESPERIMENTI ESEGUITI NEL LABORATORIO DI ENTOMOLOGIA AGRARIA DI MILANO

### *Trattamenti eseguiti sulle uova.*

Il materiale usato per preparare le emulsioni pebrinose era costituito da 30 celle di seme eredo-pebrinoso di razza *Oro cinese*.

La razza trattata, e che servì per tutti gli esperimenti, fu la *Majella*.

Per le preparazioni delle emulsioni si seguì sempre il metodo russo, e cioè:

furono prelevate dalla ghiacciaia (dove la temperatura oscillava da 0° a +4° C.) le celle di seme eredo pebrinoso, e si lavarono in acqua a

zero gradi per distaccare le uova dalla carta delle celle, facendole poi asciugare per alcuni minuti su carta bibula; indi vennero pesate, e pestate in mortaio di porcellana.

A poco a poco venne aggiunta acqua di rubinetto in proporzione di parti 2,5 di acqua per 1 di uova.

Lo schiacciamento si sospese, quando le uova furono totalmente frantumate.

Il pesto, così ottenuto, venne filtrato attraverso una sottile garza; e la melma ottenuta fu raccolta in un vasetto di vetro; il residuo rimasto nel sacchetto di garza, schiacciato leggermente con le dita per spremene il più possibile l'emulsione rimastavi; dopo questa compressione il residuo assunse un aspetto bianchiccio, e venne eliminato.

Le melme, o emulsioni pebrinose così ottenute avevano una colorazione bruna e furono raccolte in vasetti di vetro a tappo smerigliato e subito collocate in frigorifera. Si cercò di eseguire queste preparazioni nel tempo più breve possibile.

La prima emulsione pebrinosa fu preparata con queste modalità, il 12 marzo 1938, e fu contrassegnata con il nominativo V (12-III).

Con questa si trattarono uova sane in date diverse, e cioè il 12 marzo, il 22 aprile e il 10 maggio 1938.

Il 12 marzo ed il 22 aprile le uova sane si trovavano in diapausa, mentre il 10 maggio era già iniziata la loro incubazione, e precisamente in tal giorno il seme era già quasi completamente sbianchito.

La seconda emulsione di seme pebrinoso fu preparata l'11 aprile 1938 e venne contrassegnata con V<sup>2</sup> (11-IV), e servì lo stesso giorno 11 aprile per un trattamento di seme sano.

La ragione di queste molteplici prove sta nel fatto che nel lavoro di POLTEV, come già feci notare, non è precisato in quale momento venne fatta la vaccinazione, e perciò ritenni opportuno applicare il trattamento in parecchi tempi successivi, e con ciò ottenere per tentativi quel grado di attenuazione del Nosema, ottenuto dai russi, e che verosimilmente è dovuto o alla bassa temperatura, o al tempo di permanenza in essa o allo stato speciale in cui viene a trovarsi il Nosema per la disgregazione delle uova, o a tutte queste tre cause unite.

Di questi tre fattori, solamente il secondo era a noi incognito; e perciò, facendo variare il tempo di permanenza in ghiacciaia delle emulsioni cosparse sui semi trattati, oppure racchiuse in recipienti, saremmo certamente riusciti ad ottenere uno stato di attenuazione del Nosema uguale a quello ottenuto dagli AA. russi.

Questo stato di attenuazione venne dai ricercatori russi ricordato come una delle cause del fatto che l'immunizzazione non si trasformava in infezione.

Però anche uno speciale stato di resistenza del bacolino neonato o in età più avanzata, avrebbe potuto essere la causa dell'immunizzazione.

Per accertare questo fatto, fu necessario un complesso di altre esperienze, che costituirono le ultime due serie di prove, di cui parleremo in seguito.

#### TECNICA DEI TRATTAMENTI DELLE UOVA.

Con questa dizione indico quelle operazioni, che i russi nel loro lavoro denominano vaccinazioni, e che da me vennero sempre eseguite con le stesse modalità descritte da POLTEV, e cioè:

Le uova sane da trattare vennero tolte dalla ghiacciaia dove stavano svernando, tranne il caso delle uova trattate il 10 maggio, che vennero prese dall'incubatrice; indi furono messe in sacchetto di garza da semebachi e lavate con acqua di rubinetto, e poi immerse nell'emulsione di pesto di seme pebrinoso.

Si lasciò il seme immerso nell'emulsione complessivamente per 17 minuti, dei quali i primi 7 con il liquido in movimento e gli altri 10 in riposo.

Il fatto che il sacchetto non rimanesse più a galla, indicava che il seme si era imbevuto bene di emulsione.

Trascorsi i 17 minuti, si tolsero i sacchetti e dopo una leggera pressione delle dita, per allontanare il liquido superfluo, il seme venne steso su tela ben distesa per ottenere l'asciugamento.

L'emulsione residua e il seme trattato vennero subito rimessi in frigorifero.

Per le uova trattate il 10 maggio si dovette variare questo schema generale in alcuni particolari. Infatti, per non fare subire al seme già in incubazione uno sbalzo di temperatura troppo forte e perciò dannoso immergendolo nell'emulsione appena tolto dalla ghiacciaia, si prelevò una parte dell'emulsione portandola a  $+ 26^{\circ}$  C., e tenendola sempre in agitazione.

In questa emulsione venne immerso un grammo delle uova sane in incubazione, e poi, fatto il descritto trattamento, le uova furono rimesse nell'incubatrice. I diversi trattamenti eseguiti furono compiuti avendo cura di impiegare il minor tempo possibile, pur lavorando con la massima precisione.

Le uova distese, dopo il bagno, ad asciugare su tela, rimasero impiastriate di emulsione V (12-III) e in tale stato si lasciarono rispettivamente 64, 24 e 6 giorni; quelle trattate con emulsione V<sup>2</sup> (11-IV) vi rimasero 36 giorni.

Nel primo caso (64 giorni) e nell'ultimo (36 giorni) le emulsioni

furono preparate nel giorno stesso del trattamento; nel secondo caso (24 giorni) la V (12-III) aveva già una permanenza di 40 giorni in ghiacciaia, e nel terzo caso (6 giorni) aveva una permanenza di 58 giorni.

Insisto su questi dati, perchè assai differenti sono le condizioni ambientali di vita per le spore di *Nosema* in una massa liquida, come è l'emulsione, e in un sottilissimo strato, dopo poco tempo disseccato, come la pellicola formatasi sulle uova trattate ed asciugate.

Le quantità di seme eredo-pebrinoso e di quello sano, usato rispettivamente per la formazione delle emulsioni e per i trattamenti, non furono costanti, ma variarono di volta in volta per ragioni dovute a necessità del momento.

TABELLA 1. - *Quantitativi di seme eredo-pebrinoso per le emulsioni:*

Emulsioni	Peso grammi
V (12-III)	7.095
V <sup>2</sup> (11-IV)	3.515

TABELLA 2. - *Quantitativi di seme sano per i trattamenti:*

Data dei trattamenti	Emulsione usata	Peso grammi
12-III 38	V (12-III)	2,5 circa
22-IV-38	» »	0,700
10-V-38	» »	1 circa
11-IV-38	V <sup>2</sup> (11-IV)	1 circa

Questo insieme di trattamenti deve essere considerato, per meglio comprendere i risultati, in due serie:

una prima serie comprendente i trattamenti di uova sane di razza Majella a diversi periodi dell'ibernazione.

una seconda serie comprendente il trattamento di uova di razza Majella durante l'incubazione, pochi giorni prima della schiusura, portando l'emulsione di seme pebrinoso alla temperatura dell'incubatrice.

I risultati di queste prove saranno riportati e commentati unitamente a quelli delle somministrazioni dell'emulsione ai bachi durante la loro vita larvale.

#### IBERNAZIONE.

Il seme bachi necessario agli esperimenti subì una regolare svernatura ad una temperatura prossima a zero gradi, con delle oscillazioni dell'ordine di 1 o 2 gradi, così da non superare mai il limite di  $+ 4^{\circ}$  C.,

fu usata una ghiacciaia quotidianamente alimentata con ghiaccio artificiale ed una frigorifera funzionante elettricamente.

Benchè durante questo periodo non vi fosse alcun pericolo che il seme pebrinoso potesse infettare quello sano, pur tuttavia si prese sempre la precauzione di tenere in scompartimento ben separato il seme pebrinoso indispensabile per la formazione delle emulsioni e per l'allevamento dei bachi infetti necessari per fornire il materiale per le infezioni artificiali da eseguirsi in già prestabiliti momenti dell'allevamento.

Si cercò inoltre sempre di abbreviare il più possibile i tempi durante i quali il seme, a qualsiasi scopo destinato, o le emulsioni per i trattamenti o per altre prove, dovettero per necessità di manipolazione essere tenuti alla temperatura dell'ambiente.

La frigorifera e la ghiacciaia vennero in seguito usufruite per mantenere a bassa temperatura le 2 emulsioni di pesto di seme pebrinoso.

#### INCUBAZIONE.

Per l'incubazione si usarono due termostati elettrici ed una incubatrice, e questo per poter isolare al momento della schiusura i bachi sani, da quelli trattati, ed entrambi dai pebrinosi.

Nell'incubatrice contenente il seme trattato si introdusse anche 1 grammo di seme destinato a controllare eventuali differenze cronologiche delle nascite fra questo seme e quello trattato.

Entrambi questi lotti erano della stessa razza Majella, provenivano da una stessa partita di seme e avevano subito identico trattamento di temperature.

Per meglio soddisfare alle esigenze di un perfetto allevamento, il Laboratorio di Bachicoltura assunse una bacologa specializzata.

*Incubazione del seme sano.* — Si svolse regolarmente dal 25 aprile al 14 maggio, giorno nel quale si ebbero le spie, e nel 15-16 e 17 diede le nascite regolari.

*Incubazione del seme trattato.* — Il giorno 14 il grammo di seme sano incubato insieme a quello trattato fu portato nel termostato dove già si trovavano le uova sane, non trattate, per poter riscontrare eventuali eterocronie nelle nascite delle uova trattate in confronto a quelle non trattate, e per allontanare queste ultime al tempo stesso dalla vicinanza e possibile contagio in seguito alle nascite dei bacolini dalle uova trattate.

Dal seguente specchietto si può facilmente seguire l'andamento delle nascite:

*Tabella nelle nascite nei diversi lotti*

Lotti	Vaccino usato	Data di somministrazione	M A G G I O					
			14	15	16	17	18	19
K 1	V (12-III)	12-III-1938	—	spie	nascite	nascite	nascite minime	nascite minime
K 2	id.	22-IV-1938	—	—	spie	nascite scarse	id. id.	id. id.
K 4	id.	10-V-1938	—	spie	nascite	nascite	id. id.	id. id.
K 3	V <sup>2</sup> (11-IV)	11-IV-1938	—	—	spie	nascite scarse	id. id.	id. id.
Seme sano di controllo	—	—	spie	nascite normali	nascite normali	nascite normali	nascite residue	nascite residue

Come appare dalla tabella, vi fu un giorno di ritardo nella schiusura delle uova trattate rispetto a quelle sane, e questa osservazione coincide con quella fatta in proposito dai ricercatori russi.

Da notare che il ritardo minore si riscontrò nei lotti K 1 e K 4, che vennero trattati rispettivamente come primo (12-III) e come ultimo (10-V); perciò cade il sospetto che questo ritardo possa essere attribuito alla lunghezza del periodo durante il quale la patina formata dal vaccino rimase aderente al corion delle uova, con conseguente ostacolo al ricambio respiratorio delle medesime.

#### INCUBAZIONE DEL SEME PEBRINOSO.

Il 26 aprile mattina questo seme fu posto in termostato a +19,7° C. che fu adibito esclusivamente all'incubazione del seme pebrinoso, in una camera situata nell'edificio ad un piano superiore a quello dove si svolgeva l'incubazione di seme sano e dove si era deciso di fare l'allevamento. Fino a tutto il giorno 7 maggio, il seme rimase alla temperatura di 19,7°, poi questa fu portata gradualmente, alla temperatura di 22 gradi. Il giorno 13 si ebbero le prime spie e nei seguenti tre giorni nascite regolari.

La durata di questa incubazione fu più breve di quella delle prime due, essendo il seme eredo-pebrinoso di razza puro Oro-Chinese.

Sia nei termostati che nell'incubatrice furono sempre tenuti recipienti contenenti acqua, per dare all'ambiente la giusta umidità necessaria.

ALLEVAMENTO.

Non potendo disporre di molti locali, come gli sperimentatori russi, fu possibile separare solamente i due allevamenti il cui contatto sarebbe stato pericoloso, e cioè quello dei bachi sani e nati da uova trattate o trattati durante la loro vita larvale da quello degli individui eredo-pebrinosi.

L'allevamento di questi ultimi fu tenuto in una camera del piano superiore del laboratorio, mentre gli altri furono allevati in un locale del piano terreno, e affidati alla bacologa che ebbe la proibizione di salire al piano superiore.

I gelsi che hanno fornito la foglia si trovavano a pochi metri di distanza dal fabbricato; alla raccolta vennero adibiti due uomini, uno per i bachi del piano inferiore, l'altro per quelli infetti del piano superiore.

Per me, che dovetti lavorare presso entrambi gli allevamenti, tenni in ciascuno dei due locali una vestaglia che rimaneva appesa all'esterno del locale e che io indossavo entrando, in modo da evitare qualsiasi contatto con indumenti che erano stati nel locale superiore infetto.

Dopo ogni operazione disinfettavo le mani e tutto ciò che avessi adoperato con soluzioni di formalina o alla fiamma.

Così fecero tutte le persone che per qualsiasi ragione dovettero entrare a lavorare nei locali dell'allevamento.

Fu necessario adottare un sistema che rendesse impossibile la propagazione dell'infezione data a determinati lotti ad altri che dovevano rimanere sani. Durante l'allevamento infatti si sarebbero avuti da governare, insieme a bachi sani di controllo, bachi trattati col vaccino allo stato larvale, bachi nati da uova trattate, bachi sani e poi infettati in diverse età e bachi trattati o nati da uova trattate e poi infettati.

Era perciò necessario impedire che l'infezione pebrinosa si potesse propagare attraverso il pulviscolo atmosferico fra questi diversi lotti.

Si adottò, per ottenere questo isolamento, il metodo dalla campana Grandori. Questa campana, come si vede anche dalla fotografia qui riportata, è costituita da una intelaiatura « di grosso filo di ferro su cui il cellofane è disteso in superficie cilindrica dell'altezza di 20 cm.; tale porzione cilindrica si continua poi in alto, senza alcuna soluzione di continuità, con un cappello conico che costituisce una copertura completa » (1).

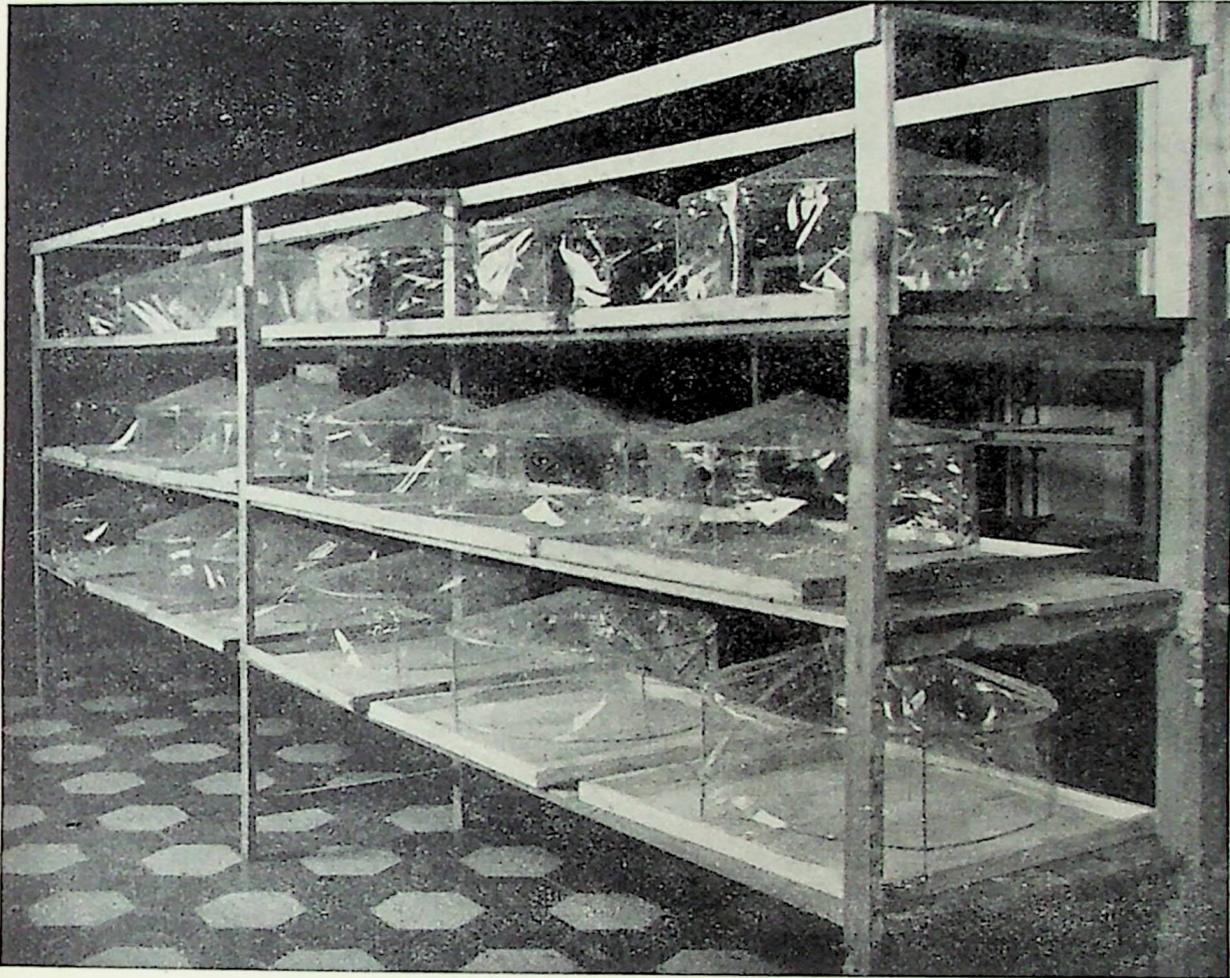
« L'orlo inferiore della parete cilindrica di cellofane non tocca il piano della tavola, ma ne rimane sollevato circa 4 cm., per lasciar passaggio ad un sufficiente ricambio d'aria ».

Questa campana che serve a difendere dalla caduta del pulviscolo

---

(1) GRANDORI R. - *Esperimenti sulla propagazione della pebrina attraverso il pulviscolo atmosferico*. - Questo Boll., vol. VII, Milano, 1935.

atmosferico lotti di 200 e più bachi nelle prime tre età e di un centinaio nelle età successive, impedisce, unitamente ad altri accorgimenti, che illustrerò in seguito, che la pebrina possa diffondersi fra lotto e lotto. Si veda a questo proposito i risultati delle esperienze del Prof. Grandori, riportati nel lavoro sopra citato. La campana appoggia su un vassoio di cartone con bordi in legno la cui superficie superiore è ricoperta da comune carta da arella.



Uno dei castelli dell'allevamento sperimentale condotto in una sala dell'Istituto di Entomologia Agraria e Bachicoltura dell'Università di Milano. Ogni campana di cellofane proteggeva un lotto di bachi.

Il cambio dei letti venne eseguito con il metodo della carta forata.

I letti vecchi vennero sempre immersi in soluzioni di formalina e gettati via.

Gli accorgimenti necessari per impedire la diffusione della pebrina, oltre all'adozione della campana, furono:

1°) sollevare le campane solo per il tempo strettamente necessario e di quel tanto indispensabile.

2°) distribuire la foglia con il seguente turno: prima ai bachi sani, poi ai bachi trattati, infine a quelli trattati e già infettati, per ultimo ai bachi nati sani ed in seguito infettati.

3°) non sollevare polvere, perciò non spazzare il pavimento con le comuni scope. Far massima attenzione nel cambio dei letti, specialmente per i bachi infettati, il cui cambio venne sempre compiuto fuori dal locale dell'allevamento, trasportando per il brevissimo tempo necessario fuori del locale tutto il sistema vassoio-campana, ed arrotolando poi la carta del vecchio letto ed immergendola con tutto il contenuto nella soluzione di formalina.

4°) passare sovente uno straccio umido di soluzione di formalina sul pavimento del locale, badando di non apportare eccessiva umidità.

5°) evitare che qualsiasi strumento, che avesse toccato precedentemente bachi infetti, fosse messo a contatto con bachi sani o semplicemente trattati; in caso di necessità, si disinfettava lo strumento alla fiamma.

6°) impedire che per qualsiasi motivo potessero venire scambiate le campane ed i vassoi.

Oltre a questi accorgimenti speciali, necessari per il mio lavoro, si adottarono tutte le norme generali di igiene del locale e di buon governo.

Il locale era una sala di oltre 200 m.<sup>3</sup>; nelle ore più calde delle belle giornate si tennero aperte le finestre, avendo cura di non provocare correnti d'aria.

La luce fu regolata opportunamente mediante tende applicate alle finestre.

La foglia per il pasto dei bachi fu sempre raccolta fresca di volta in volta; quando il tempo non lo permise e per i pasti della notte e della prima mattina la foglia fu conservata in un locale attiguo alla bigattiera.

La temperatura fu mantenuta fra i 22° ed i 25° C., nonostante alcune giornate caldissime del principio di giugno, durante le quali si bagnarono all'esterno i muri del locale esposti al sole.

I pasti furono distribuiti con la regola seguente:

durante la I età	8 pasti (ogni 2 ore)
» la II »	6 » (ogni 3 ore)
» la III »	6 » (ogni 3 ore)
» la IV »	6 » (ogni 3 ore)
nei primi 3 giorni della V <sup>a</sup> età	6 » (ogni 3 ore)
dal 4° giorno della V <sup>a</sup> età in poi	8 » (ogni 2 ore)

e fu ridotta al minimo la sospensione notturna dei pasti.

La foglia fu somministrata trinciata in striscie di crescente larghezza nella 5<sup>a</sup> età fu data intiera.

I lotti di bachi coperti dalle campane e contrassegnati da numeri si mantennero disposti l'uno accanto all'altro su castelli appositi, uno dei quali è rappresentato nella annessa figura.

A cominciare dalla 3<sup>a</sup> età per impedire che i bachi rimanessero affollati sopra una ristretta superficie, si compirono i necessari diradamenti, tanto più indispensabili per il nostro lavoro inquantochè il metodo di difesa contro la propagazione della pebrina si basava sulla copertura dei bachi; perciò era necessario diminuire il numero di questi man mano che aumentava la loro grossezza, affinchè tutti si trovassero sempre al coperto.

Cosicchè, a maturità, sotto ogni campana si trovarono non più di 100 bachi.

Particolare attenzione richiese il periodo delle mute, giacchè l'andamento di parecchi lotti fu assai lento e stentato, e si ebbero bachi diseguali; perciò fu spesso arduo regolare con precisione l'inizio e la fine delle mute.

Per formare i boschi si introdussero sotto le campane fascinette di ravizzone ben disseccate.

Dopo una settimana e più dall'inizio della salita al bosco s'iniziò la sbazzolatura.

Ogni bozzolo venne messo in un sacchettino di carta, portante il numero corrispondente del lotto ed i sacchetti di uno stesso lotto furono uniti in lunghe filze.

## TRATTAMENTI DURANTE LA VITA LARVALE

Oltre ai metodi di vaccinazione usati dagli Autori russi, ho voluto sperimentare un altro metodo, e cioè quello di somministrare l'antigene non ad uova ma a bacolini di diverse età, specialmente ai neonati, basandomi su quanto riferiscono i ricercatori russi che cioè gli organismi giovani presentano una maggiore resistenza verso le infezioni ad immunità non sterilizzante.

Questi trattamenti con le susseguenti rispettive infezioni costituiscono un secondo gruppo di prove. A sua volta questo gruppo era suddiviso in due serie di prove:

una, comprendente la somministrazione dell'emulsione su foglie di gelso a bachi sani di razza Majella al secondo pasto della prima età; una seconda serie comprendente la somministrazione dell'emulsione su foglia di gelso a bachi sani di razza Majella in seconda e terza età.

Le somministrazioni furono così compiute: si tagliò in sottilissime striscie la quantità di foglie di gelso necessarie per il pasto dei bachi da trattare; si prelevò dalla ghiacciaia l'emulsione e se ne versò in una capsula di porcellana il necessario per bagnare completamente la foglia; il rimanente veniva riposto in frigorifero, a temperatura oscillante da 0° a + 4° C.

Indi le striscioline di foglia venivano immerse nell'emulsione e rimescolate con una pinzetta fino a completo assorbimento del liquido.

Si distendevano poi le strisce di foglia su carta da arelle e si metteva in funzione per una decina di minuti un ventilatore, ottenendo così l'asciugamento delle strisce di foglia.

Dopo qualche ora dal pasto ci si assicurava con una lente se i bachi avessero mangiato, e si trovavano erosioni.

In definitiva i trattamenti compiuti furono i seguenti:

Emulsione preparata il 12-III-1938 Trattamento fatto					Emulsione preparata l'11-IV-1938 Trattamento fatto		
sulle uova		sui bachi			sulle uova	sui bachi	
svernanti	alla schiusura	1° giorno 1ª età	2ª età	3ª età	svernanti	2ª età	3ª età
12-III-1938	10-V-1938	14-V-1938	25-V-1938	2-VI-1938	11-IV-1938	25-V-1938	2-VI-1938
22-IV-1938	—	—	—	—	—	—	—

Per ognuno di questi trattamenti si dovettero eseguire delle successive infezioni per poter determinare se i bachi avessero assunta o no la immunità.

Le infezioni ai bachi furono date a partire dalla terza età perchè nell'allevamento di bachi eredo-pebrinosi le spore di Nosema furono visibili soltanto tardi; e sebbene l'infezione fosse presente ereditariamente nella partita, tuttavia, essendo noto che il Nosema non si trasmette dalla madre al 100% dei figli, nel prelevare alcuni bachi per farne il pesto non si sarebbe avuta la matematica certezza che fossero infetti.

Noi abbiamo sempre voluto somministrare pesti nei quali avessimo accertato al microscopio le spore del Nosema.

Non solo, ma abbiamo voluto, mediante un calcolo largamente approssimativo basato sul numero dei corpuscoli per campo visivo, dare a tutti i lotti una infezione di intensità approssimativamente uguale.

Nello schema generale del lavoro, riportato nella tabella, si osserva che le infezioni eseguite dopo i trattamenti non si poterono effettuare in 3ª, 4ª e 5ª età in tutti i casi; la ragione di ciò sta nel numero esiguo

di bachi di alcuni esperimenti, che derivava da perdite alla schiusura assai più elevate di quelle che riscontrarono gli Autori russi.

I controlli furono costituiti:

1°) - da lotti trattati con emulsione e non successivamente infettati.

2°) - da lotti di bachi sani e non trattati con emulsione, ma infettati

3°) - da un lotto di bachi sani, non trattati con la emulsione e non infettati, per poter escludere la eventualità di una propagazione meccanica dei corpuscoli della pebrina, malgrado le precauzioni prese.

Le infezioni vennero date attenendosi al metodo russo, ma con una maggiore precisione ed uniformità.

Le foglie destinate a ciascun pasto dei bachi da infettare vennero battute con una spazzola ruvida, per bucherellarle ed aumentare così la capacità di assorbimento del liquido infettante.

Si bagnò detta foglia, dopo averla tagliata in sottili striscie, in un pesto di bachi eredo-pebrinosi, nel quale era stata accertata la presenza di spore di *Nosema*; indi le strisce di foglia vennero asciugate con il metodo del ventilatore e somministrate ai bachi sotto le campane, controllando ed accertando che i bachi le mangiavano.

Prima di eseguire queste infezioni, come prima di somministrare le emulsioni degli antigeni ai bachi, si prelevò una piccola quantità dei loro cacherelli, per controllare, fattone un pesto, al microscopio, se vi fossero eventualmente dei corpuscoli. Questa misura precauzionale venne a dare la sicurezza sullo stato di salute nel quale si trovavano i bachi al momento del trattamento e dell'infezione. (1)

Per essere sicuri di dare a tutti i lotti una infezione uniforme, si cercò di infettare il maggior numero possibile per ciascuna volta.

Tutti gli strumenti che furono utilizzati in queste operazioni furono sempre disinfettati o alla fiamma o con soluzioni di formalina.

Si riuscì in sole tre volte ad infettare tutti i bachi e si mantenne presso a poco costante l'intensità d'infezione dei tre pesti usati.

Infatti si fece in modo che si avessero 40 spore all'incirca per campo ad un ingrandimento di circa 700 diametri.

L'andamento della vita larvale dei bachi fu continuamente osservato ed i fatti più interessanti furono annotati, così da avere alla fine dell'allevamento la storia di ogni lotto.

Ritengo superfluo riportare qui tutti i dettagli di questo giornale

---

(1) Dell'esito di tutti questi esami microscopici si è tenuto nota insieme a tutte le osservazioni giornalieri dell'allevamento di bachi ammalati, ecc., in un dettagliato giornale degli esperimenti che si conserva presso il Laboratorio di Entomologia e Bachicoltura della R. Università di Milano a disposizione di chiunque abbia interesse a consultarlo.

d'esperienze, bastando riassumere i risultati nelle tabelle generali, nelle quali sono riportati tutti i dati degli esami microscopici delle farfalle, dei bachi messi in soluzione di formalina e di quelli morti durante l'allevamento.

La prima osservazione, che viene spontanea esaminando la vita dei diversi lotti di bachi, riguarda il fatto che non si lasciò terminare la vita larvale a ben 1457 bachi di 15 lotti, mettendoli in soluzione di formalina al 5%. Questa decisione fu presa, perchè l'allevamento, per le condizioni stagionali molto sfavorevoli, si sarebbe protratto a tutto giugno, e sarebbe derivato da ciò un forte accentuarsi di mortalità da giallume e flaccidezza, che si era già notevolmente pronunciata e che minacciava di rendere difficilissimo l'accertamento delle percentuali di sani ed infetti di pebrina se questo fosse stato rinviato esclusivamente all'esame delle farfalle.

Non essendo possibile esaminare al microscopio oltre ai bachi morti di ogni giorno, anche i numerosi ritardatari, che si trovano in 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> età, e che stentavano a filare il bozzolo o si mostravano comunque sofferenti, questi si conservarono in formalina, rimandando così l'accertamento della sanità o dell'infezione a periodi di tempo successivi.

In alcuni lotti, specialmente quelli infettati in 3<sup>a</sup> età, non si poté determinare con esattezza la data della 1<sup>a</sup> muta a causa della forte disuguaglianza creatasi.

Con la denominazione « bachi morti durante l'allevamento » usata nelle tabelle si intende generalmente bachi morti di flaccidezza; si ebbero soltanto tre casi di morti da giallume.

L'esame microscopico dei bachi conservati in formalina venne fatta col solito metodo, schiacciando tutto il baco o parte di esso in un mortaio di porcellana, con qualche goccia di acqua di rubinetto.

La visibilità delle spore di *Nosema* anche dopo un lungo soggiorno del baco in formalina, è perfetta.

L'esame microscopico fu iniziato dopo la sbazzolatura.

Per impedire che nel frattempo lo sfarfallamento generasse confusione, s'introdusse ciascun bozzolo in una cella chiusa, obbligando così le farfalle a rimanere isolate.

Per ogni cella poi si constatava se era già avvenuta la sfarfallatura; in questo caso si faceva scivolare la farfalla nel mortaio e se ne faceva il pesto; in caso di mancato sfarfallamento, con un rasoio si tagliava il bozzolo e si estraeva con pinze, che ogni volta venivano accuratamente lavate, la farfalla o la crisalide e qualche volta anche il baco morto subito dopo aver costruito il bozzolo.

Tranne casi di fortissima infezione rivelata a primo colpo d'occhio, si esaminarono sempre con la massima attenzione molti campi.

## CONCLUSIONI

Dal confronto fra le percentuali ottenute nei nostri esperimenti e quelle ottenute dai russi risulta una profonda differenza di risultati.

Dalle tabelle riportate, si vede chiaramente che l'emulsione di uova pebrinose non ha funzionato come antigene, e che anzi l'emulsione di seme pebrinoso V (12-III) rimasta nel frigorifero dal 12 marzo al 14 maggio è stata infettante per i bachi appena nati.

Invece la parte dell'emulsione rimasta aderente e disseccata sul guscio per un tempo che va da 64 a 6 giorni dalla schiusura, non è stata nè immunizzante nè infettante; e quindi si deve concludere che tale emulsione non contenga altro che spore morte od altri stadi morti del *Nosema*, e che non contenga neppure alcuna sostanza capace di funzionare come antigene.

Si giunge pertanto alla conclusione che le spore di *Nosema*, contenute nell'emulsione, muoiono rapidamente quando si essiccano intorno all'uovo, mentre rimangono più di 2 mesi vive nell'emulsione tenuta in frigorifero. Sembra inoltre inverosimile che condizioni esterne, capaci di uccidere le spore, rispettino determinati stadi del *Nosema*, diversi dalla spora matura e che, secondo il POLTEV, sarebbero essi soli in grado di impartire ai bachi un'immunità non sterilizzante.

Sembra anche assai strano il risultato dell'immunità al 100% affermata dai ricercatori russi, anche perchè noi non ci limitammo a ripetere i loro esperimenti sulle uova, ma ne abbiamo eseguiti altri su bachi appena nati; questi ultimi avrebbero dovuto confermare la loro tesi, ed invece hanno portato a risultati completamente negativi.

Si potrebbe obiettare che gli sperimentatori russi hanno saputo trovare le condizioni ottime per l'attenuazione del parassita e che tali condizioni non si sono verificate nei nostri esperimenti. Le condizioni più importanti (durata della permanenza del seme nell'emulsione, temperatura, grado di umidità tale da impedire l'eccessivo disseccamento dell'emulsione alla superficie del seme trattato) furono press'a poco le stesse per noi e per loro. E dal lavoro degli Autori russi non sembra che sul fenomeno da essi constatato possa avere qualche influenza una leggera variazione di queste condizioni.

Un'ulteriore obiezione potrebbe farsi alla discordanza fra i risultati nostri e quelli degli Autori russi, e cioè che tale discordanza possa dipendere dal diverso modo di comportarsi, di fronte all'antigene, della

razza *Bagdad* usata dai russi e della razza *Majella* usata da noi. Ma, dato e non concesso che differenze razziali di reazione verso il supposto antigene possano verificarsi, resta evidentemente annullata ogni importanza ed ogni possibilità di applicazione pratica di un metodo immunitario che avrebbe valore solo per qualche razza e non ne avrebbe alcuno per altre razze, e proprio per quelle che formano la base della Bachicoltura italiana.

Infine, anche ammettendo per un momento che gli Autori russi siano giunti al risultato positivo — sempre limitatamente agli allevamenti primaverili — realizzando condizioni specialissime che a noi non riuscì di realizzare, ma che essi non hanno per altro indicato, resta da discutere quale valore possa avere per eventuali applicazioni alla grande pratica industriale un'immunità che verrebbe conferita al 100% dei bachi figli soltanto nel caso che essi ricevano poi dall'ambiente un'infezione allo stadio di neonati, mentre ricomparirebbe sempre un'infezione nel 3,4% e nel 6,6% dei bachi figli quando questi contraggano l'infezione rispettivamente in 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> età. Poichè è più che dimostrato dall'esperienza vastissima dei semai che i bachi s'infettano in corso di allevamento con tanto maggior probabilità e intensità quanto più gli allevamenti sono tardivi e i bachi in avanzata età, ne consegue che tale immunità limitata ai neonati non eliminerebbe affatto la selezione microscopica per le razze da riproduzione; l'unica applicazione pratica verrebbe quindi a mancare.

Resta poi da notare che purtroppo gli AA. russi non pensarono ad istituire un allevamento di controllo che provenisse da uova e bachi vaccinati e non successivamente infettati, giacchè soltanto da tale procedimento essi avrebbero potuto decidere in quali casi l'emulsione, anzichè essere immunizzante, è infettante, come a noi si è dimostrata somministrandola ai bacolini al 2° pasto dopo la nascita.

TABELLA I. — Trattamenti con emulsione di seme pebrinoso preparata il 12-III-38.

S U L L E U O V A										
s v e r n a n t i										
Trattamento fatto il 12-III-38 (K <sup>1</sup> )			22-IV-38 (K <sup>2</sup> )			10-V-38 (K <sup>4</sup> ) alla schiusura				
susseguente infezione			susseguente infezione			susseguente infezione		susseguente infezione		nessuna infezione
III età	IV età	V età	III età	IV età	V età	III età	IV età	IV età	V età	
1-VI-1938	8-VI-1938	15-VI-1938	6-VI-1938	6-VI-1938	13-VI-1938	6-VI-1938	8-VI-1938	8-VI-1938	13-VI-1938	
lotto 1	2	3	5	40	41	8	9	42		

S U I B A C H I										
trattamenti al 1° giorno della I età (14-5-38)			trattamento alla II.a età (25-5-38)			trattamento alla III.a età (2-6-38)				
susseguente infezione			susseguente infezione			susseguente infezione		susseguente infezione		nessuna infezione
III età	IV età	V età	III età	IV età	V età	IV età	V età	IV età	V età	
1-VI-1938	8-VI-1938	13-VI-1938	1-VI-1938	13-VI-1938	13-VI-1938	8-VI-1938	13-VI-1938	8-VI-1938	13-VI-1938	
10	11	12	13	43	44	15	16	45		

N.B. — Il numero totale dei lotti fu di 31. La numerazione giunge fino a 48 perchè inizialmente erano stati preparati e numerati altri 17 lotti che erano destinati a ricevere l'infezione dal pesto di bachi pebrinosi d'età giovanile; ma quei lotti furono soppressi perchè non si vollero somministrare pesti di bachi erodepebrinosi fino a quando non comparvero nei caccherelli di questi le spore mature. Per non generare confusioni, si lasciarono ai lotti i numeri originari.

TABELLA II. — Trattamenti con emulsione di seme pebrinoso preparata l' 11-IV-1938.

SULLE UOVA SVERNANTI		S U I B A C H I			
Trattamenti fatti (11-IV-38) (K <sup>3</sup> )		Trattamenti alla II età (25-V-38)		Trattamenti alla III età (2-VI-38)	
susseguente infezione in III età 6-VI-1938	nessuna infezione	Susseguente infezione		Susseguente infezione	
		III età 1-VI-1938	V età 13-VI-1938	IV età 8-VI-1938	V età 13-VI-1938
Lotto 18	46	23	24	25	43
			47	26	
					nessuna infezione

TABELLA III. — Controlli.

INFEZIONE SOMMINISTRATA IN:			Nessuna infezione
III età	IV età	V età	
Controlli per i lotti:			
1 - 5 - 8 - 10	2 - 9 - 11	3 - 12 - 14	
13 - 18 - 23	15 - 25	16 - 24 - 26	
Infettati il			
1 - 6 - 38	8 - 6 - 38	13 - 6 - 38	
28	29	30	32

N.B. — I bachi venivano esaminati al microscopio man mano che morivano, oppure allo stato di crisalide o di farfalla.

TABELLA IV. — Risultati dell'esame microscopico. trattamenti di uova sane in diversi periodi dell'ibernazione.

Num. del lotto	Data dei trattamenti con emulsione	Età della susseguente infezione	Bachi morti durante l'allevamento			Bachi conservati in formalina			Farfalle			Totale individui allevati	Percento individui infetti
			totale	infetti	sani	totale	infetti	sani	totale	infette	sane		
1	12-III-1938	3.a	27	26	1	130	113	17	22	17	5	179	87.15%
2	id.	4.a	99	99	—	—	—	—	80	80	—	179	100 %
3	id.	5.a	18	13	5	—	—	—	74	73	1	92	93.4 %
40	id.	nessuna infezione	—	—	—	169	—	169	—	—	—	169	0 %
5	22-IV-1938	3.a	2	2	—	57	54	3	—	—	—	59	94.9 %
41	id.	nessuna infezione	—	—	—	9	—	3	—	—	—	9	100 %
18	11-IV-1938	3.a	—	—	—	24	23	1	—	—	—	24	95.8 %
46	id.	nessuna infezione	—	—	—	13	—	13	—	—	—	13	0 %

TABELLA V. — Risultati dell'esame microscopico. Trattamenti di uova sane durante l'avanzata incubazione.

Num. del lotto	Data del trattamento con emulsione	Età della susseguente infezione	Bachi morti durante l'allevamento			Bachi conservati in formalina			Farfalle			Totale individui allevati	Percento individui infetti
			totale	infetti	sani	totale	infetti	sani	totale	infette	sane		
8	10-V-1938	3.a	—	—	—	20	16	4	—	—	—	20	80 %
9	id.	4.a	12	12	—	27	26	1	—	—	—	39	97.1 %
42	id.	nessuna infezione	—	—	—	51	—	51	—	—	—	51	0 %

TABELLA VI. — Controlli non vaccinati e infettati in III, IV, V età o non infettati.

Num. del lotto	Età della susseguente infezione	Bachi morti durante l'allevamento		Bachi conservati in formalina		Farfalle		Totale individui allevati	Percento individui infetti			
		totale	infetti	sani	—	totale	infette			sane		
28	3.a	13	13	—	83	53	30	63	62	1	159	80.5 %
29	4.a	126	126	—	—	—	—	49	49	—	175	100 %
30	5.a	26	21	5	—	—	—	172	171	1	198	96.9 %
32	nessuna infezione	—	—	—	—	—	—	194	2 (1)	192	194	1.1 %

(1) Si trattò evidentemente di 2 bachi che riuscirono ad eludere la sorveglianza e i dispositivi di isolamento dei lotti fra di loro, e passarono da un vassoio all'altro.

TABELLA VII. — Risultati dell'esame microscopico. - Somministrazione di emulsione a bachi al 2° pasto dopo la nascita.

Num. del lotto	Età della susseguente infezione	Bachi morti durante l'allevamento		Bachi conservati in formalina		Farfalle		Totale individui allevati	Percento individui infetti			
		totale	infetti	sani	—	totale	infette			sane		
10	3.a	1	1	—	181	105	76	—	—	—	182	58.2 %
11	4.a	136	131	5	—	—	—	40	38	2	176	96 %
12	5.a	54	43	11	—	—	—	143	143	—	197	94.4 %
43	nessuna infezione	—	—	—	—	—	—	92	78	14	92	85.8 %

TABELLA VIII. — Risultati dell'esame microscopico. - Somministrazione dell'emulsione a bachi in diverse età.

Num. del lotto	Età della somministrazione dell'emulsione	Età della susseguente infezione	Bachi morti durante l'allevamento			Bachi conservati in formalina			Farfalle			Totale individui allevati	Percento individui infetti
			totale	infetti	sani	totale	infetti	sani	totale	infette	sane		
13	2.a	3.a	3	3	—	189	160	29	—	—	—	192	84.8 %
14	2.a	5.a	27	24	3	—	—	—	172	169	3	199	96.9 %
44	2.a	nessuna infezione	1	—	1	—	—	—	114	4	110	115	3.4 %
15	3.a	4.a	31	21	1	158	126	32	—	—	—	189	78.1 %
16	3.a	5.a	38	29	9	—	—	—	158	158	—	196	95.4 %
45	3.a	nessuna infezione	—	—	—	—	—	—	72	1	71	72	1.2 %
23	2.a	3.a	—	—	—	194	155	39	—	—	—	194	79.8 %
24	2.a	5.a	50	34	16	—	—	—	142	140	2	192	95.8 %
47	2.a	nessuna infezione	—	—	—	—	—	—	124	—	124	124	0 %
25	3.a	4.a	26	25	1	152	148	4	—	—	—	178	97.1 %
26	3.a	5.a	39	27	12	—	—	—	137	130	7	176	89.2 %
48	3.a	nessuna infezione	—	—	—	—	—	—	33	—	33	33	0 %