

4. Dott. Giulio BOSCO. — **Proprietà immunologiche e immunochimiche di lisati batterici ottenuti con ultrasuoni.**

Riassunto. — Vengono studiate le proprietà immunologiche di lisati batterici ottenuti con ultrasuoni, e si documentano le differenze di ordine immunochimico tra germi uccisi con ultrasuoni e germi uccisi con il calore.

Résumé. — On étudie les propriétés immunologiques de bactéries lysées par les ultrasons et l'on documente les différences d'ordre immunochimique entre les germes tués par les ultrasons et les germes tués par la chaleur.

Summary. — The immunological properties of bacterial lysates obtained by supersonic disintegration are studied. Differences in the immunochemical properties of heat killed bacteria and bacteria disintegrated by supersonic waves have been found.

Zusammenfassung. — Es werden die immunologischen Eigenschaften von mit Ultraschall erhaltenen Bakterien - Lysaten beobachtet und die immunologischen Unterschiede zwischen durch Ultraschall und durch Hitze getöteten Keimen dokumentiert.

AZIONE BIOLOGICA DEGLI ULTRASUONI. — Per ultrasuoni si intendono le vibrazioni meccaniche di frequenza superiore ai 20.000 periodi per secondo; non vengono percepite dall'orecchio umano e si rilevano solo con mezzi indiretti. Gli ultrasuoni per applicazioni biologiche in alta frequenza si ottengono di solito per mezzo di generatori che utilizzano la capacità di una lamina di quarzo di mettersi in vibrazione quando tra le due superfici si applichi una differenza di potenziale di data frequenza.

La superficie emittente viene immersa in un liquido e genera in esso un fascio ultrasonoro, che ha direzione perpendicolare alla superficie della lamina, e dà luogo a numerosi fenomeni, tra i quali ricordiamo quelli dovuti alla pressione di radiazione, alla cavitazione e all'aumento della temperatura.

Riassumiamo alcune osservazioni compiute nel campo della biologia. I parameci (protozoi) sottoposti all'azione di un fascio ultrasonoro vengono in breve tempo lacerati e frammentati: lesioni analoghe presentano le dafnie (piccoli crostacei) il cui involucro viene contorto, mentre il contenuto si diffonde nel mezzo liquido. Effetti analoghi si riscontrano in uova e larve di

zanzara. Pesci e girini presentano deficienze della funzione vestibolare e muoiono per esposizioni prolungate.

Gli ultrasuoni diminuiscono l'attività respiratoria delle cellule; determinano emolisi; ledono, in particolari condizioni, le fasi finali della spermiogenesi. Agiscono con particolare intensità sulle cellule dotate di maggiore attività metabolica e sono stati utilizzati per la lotta contro le neoplasie.

Gli ultrasuoni di debole intensità determinano una eccitazione del ricambio cellulare e della circolazione, e trovano attualmente impiego nel campo della terapia fisica.

GLI ULTRASUONI IN MICROBIOLOGIA. — Le ricerche concernenti l'azione degli ultrasuoni sui virus filtrabili sono fino ad oggi poco numerose. Ricordiamo che TAKAHASHI, CHRISTENSEN e STANLEY sono riusciti a inattivare il virus del mosaico del tabacco, mentre KAUSCHE e coll., e più recentemente OSTER, hanno seguito al microscopio elettronico gli effetti della esposizione agli ultrasuoni, e cioè la riduzione delle dimensioni del virus, in seguito alla lesione meccanica di spezzettamento (da 320 a 40 millimicron).

RIVERS e coll., e successivamente KASAHARA, hanno inattivato la linfa vaccinica purificata mediante adsorbimento e lavaggi. KASAHARA ha poi ottenuto l'inattivazione del virus rabico, documentando la conservazione del potere antigene.

Esponiamo brevemente le ricerche concernenti l'azione degli ultrasuoni sui microbi (azione che è di natura prevalentemente meccanica, esplicandosi mediante forti differenze di pressione tra punti molto vicini).

Le prime ricerche sul potere battericida degli ultrasuoni ebbero in genere risultati negativi (WOOD e LOOMIS 1929; PAIC, DEUTSCH e BORCILA 1935; PONZIO 1936; DOGNON e BIANCANI 1937); tuttavia HARVEY e LOOMIS (1929) riuscirono a distruggere batteri luminosi, mentre WILLIAMS e GAINES (1930) descrissero la lisi parziale del *b. coli*.

Dopo le ricerche di YAOI e NAKAHARA (1934), YEN e LIU (1934), BECKWITH e WEAVER (1936) ricordiamo che AKIJAMA (1938) ottenne una elevata mortalità in sospensioni di *b. tifico*, determinando inoltre la maggiore resistenza degli stafilococchi rispetto agli streptococchi.

Le ricerche più interessanti sono state compiute nell'Istituto Pasteur di Parigi, dove GRABAR e ROUYER (1945) sono riusciti a distruggere un numero di germi percentualmente molto elevato: Shiga 88%, staf. aureo 90,4%, paradissenterico 98%, anthracis 97,5% megatherium 99,7% (per i due ultimi non viene indicata la presenza di spore). LAPORTE e LOISELEUR (1945) hanno osservato che i ceppi di laboratorio del *b. di Koch* sono meno resistenti di altri di recente isolamento. ROUYER e GRABAR (1947)

hanno ottenuto una mortalità del 97,8% in una sospensione di b. paradissenterici in atmosfera di azoto.

Quanto alla possibilità di isolare sostanze antigeni, ricordiamo che CHAMBERS e FLOSDORF (1936) per primi hanno disgregato i corpi batterici (streptococchi e b. tifici) allo scopo di ottenere nel liquido sospensore i costituenti labili con potere antigene.

Nel 1938 CHAMBERS e WEIL, ottennero dal pneumococco un antigene capace di dar luogo sulla cute del coniglio ad una reazione neutralizzabile con l'omologo antisiero: le ricerche si estesero alla produzione di anticorpi, ma con esito negativo.

Antigeni labili dallo streptococco sono stati isolati da MUDD e coll. (1936), mentre FLOSDORF e coll. (1939) si sono interessati del b. della pertosse.

PARTE SPERIMENTALE

CONSIDERAZIONI TEORICHE. — Esponiamo brevemente i presupposti di queste indagini sperimentali.

a) *Le ricerche di carattere immunitario si basano in genere sulla introduzione per via parenterale di sostanze batteriche dotate di potere antigene. Prendendo in considerazione le sospensioni di germi attenuati o uccisi col calore o con mezzi chimici, si nota che, sebbene diano una specificità immunitaria sufficiente per le esigenze della terapia e della profilassi, non sono soddisfacenti da un punto di vista teorico. E più precisamente, mentre la teoria vorrebbe che queste sostanze batteriche fornite di potere antigene fossero il più possibile affini a quelle del germe vivo e virulento, in pratica queste sostanze non sono identiche ma soltanto simili.*

b) *Questo si verifica in quanto i mezzi di attenuazione o uccisione impiegati contro il germe, pur conservandone la specificità, ne alterano in varia misura i costituenti chimici*

c) *Sorge da questi fatti l'esigenza di perfezionare le tecniche attuali, cercando di produrre antigeni di composizione chimica ancor più vicina a quella dei metaboliti e del protoplasma batterico.*

d) *E cioè produrre sostanze antigeni 1) a bassa temperatura, eliminando così l'uso del calore e la conseguente coagulazione proteica; 2) senza denaturazione, e quindi evitando di alterare gli elementi responsabili della più sottile specificità immunochimica (come avviene quando si formano nuovi composti in seguito a reazione con sostanze estranee chimicamente attive, quali appunto sono i disinfettanti).*

e) *Questa terza via (esclusi cioè i disinfettanti e l'azione del calore) è rappresentata dalla lesione meccanica dei microbi. Il germe non è più vitale ma è chimicamente integro: l'immunità è un fatto chimico.*

* * *

La parte sperimentale ha come punto di partenza:

- 1) le ricerche sul potere battericida degli ultrasuoni (in particolare i lavori di GRABAR e ROUYER, AKIJAMA, YAOI e NAKAHARA);
- 2) le ricerche sulla composizione chimica dei germi e sulla possibilità di isolare sostanze antigeni (CHAMBERS e FLOSDORF, MUDD, FLOSDORF e coll.);
- 3) le ricerche sulla produzione di anticorpi negli animali da esperimento mediante l'inoculazione di antigeni ultrasonori (CHAMBERS e WEIL).

Praticamente il lavoro più importante è quello di CHAMBERS e WEIL (1938): un estratto ultrasonoro di pneumococchi produce una cutireazione che viene neutralizzata dall'antisiero omologo. Però, osservano gli autori, l'inoculazione endovenosa a dosi crescenti nel coniglio non dà luogo alla formazione di anticorpi.

Risultato, quindi, negativo: ma sembra poco verosimile che non si possano produrre anticorpi quando è stata constatata l'esistenza di fenomeni immunitari locali.

Le ricerche che esponiamo si propongono di chiarire i seguenti quesiti:

- 1) formazione di anticorpi negli animali da esperimento (vaccinazione, prove di protezione, potere agglutinante e precipitante del siero);
- 2) differenze chimiche tra sospensioni sterilizzate con ultrasuoni e sospensioni sterilizzate con uno dei comuni metodi (calore).

TECNICA. — Le ricerche che esponiamo sono state eseguite nel 1947 con il generatore di ultrasuoni dell'Istituto Superiore di Sanità, sotto la guida del prof. Trabacchi. Questo generatore (frequenza 760 kilocicli per secondo; tensione 4.000 volt; potenza 72,8 watt) è costituito da un oscillatore di alta frequenza a tubi elettronici, che alimenta una piastra di quarzo (spessore 9 mm., diametro 50 mm). La tecnica utilizzata non si differenzia sostanzialmente da quella usata dagli altri ricercatori, e si basa sul passaggio del fascio ultrasonoro attraverso una fiala di vetro, a fondo piano molto sottile, contenente la sospensione microbica.

Desidero a questo proposito ringraziare il prof. Giacomini per i pre-

ziosi consigli e per l'interessamento con cui ha seguito queste mie ricerche, e il prof. Barone, che, avendo progettato e costruito il generatore nel 1946, ha voluto benevolmente sorvegliarne il funzionamento e curarne la perfetta efficienza.

E' stato studiato uno stipite Watson di b. tifico (fornito, come è noto, dei tre antigeni O, Vi, H) della collezione del prof. Puntoni; stipite che è stato preventivamente virulentato.

Alcune esperienze preliminari hanno chiarito il comportamento del b. tifico di fronte agli ultrasuoni. Sospensioni dense (1 miliardo di germi per centimetro cubico) in soluzione fisiologica sono state esposte all'azione degli ultrasuoni per tempi differenti: già dopo 60 minuti la sospensione appare fortemente rischiarata, quasi limpida, e non contiene più germi in condizione di moltiplicarsi (esito costantemente negativo delle semine in brodo e in agar). Comunque il trattamento ultrasonoro delle sospensioni è stato protratto a 90 minuti, in modo che si potesse contare su un più ampio margine di sicurezza.

I preparati microscopici eseguiti dimostrano la presenza, nel liquido sottoposto a 60-90 minuti di trattamento, di finissime granulazioni che rappresentano i detriti dei germi frantumati e disgregati mentre è costante l'assenza delle tipiche forme bastoncellari.

Nelle esperienze riportate più oltre è stata posta la comparazione con sospensioni di b. tifici Watson di identica concentrazione, uccisi per mezzo del calore (40 minuti a 58° C.).

PROVE DI TOSSICITA' NEL TOPO. — Prima di iniziare l'inoculazione nei conigli, è stata compiuta una serie di prove di tossicità nel topo, per stabilire la dose minima mortale e per studiare eventuali differenze di ordine chimico. Indichiamo con «sospensione C» quella contenente germi uccisi col calore, e con «sospensione US» quella contenente germi disgregati con ultrasuoni.

Un primo gruppo di topi bianchi viene inoculato per via peritoneale con la sospensione C in dosi variabili da 0,12 cc a 1 cc. Tutti i topi inoculati con 1 cc. e 0,50 cc. muoiono entro 24 ore e presentano un costante quadro autoptico: assenza di liquido peritoneale, epatosplenomegalia, intestino meteorico con segni di intensa desquamazione, polmoni poco congesti.

Si eseguono prelevamenti dal peritoneo, dalla milza, dal fegato e dalla cavità cardiaca, allo scopo di coltivare gli eventuali germi presenti. Nei terreni di coltura solidi e liquidi si sviluppano germi da diffusione post-mortale (proteus, coli, enterococco) mentre manca costantemente il b. tifico: il che conferma la morte dei topi per azione tossica. I topi inoculati con 0,25 - 0,12 cc sopravvivono e appaiono in buone condizioni generali.

Un secondo gruppo di topi bianchi riceve in peritoneo la sospensione US. Tutti i topi inoculati con 0,25 - 0,50 - 1 cc muoiono entro 24 ore presentando un quadro autoptico analogo a quello dei topi dell'altro gruppo. Le ricerche colturali svelano soltanto la diffusione post-mortale dei germi della flora intestinale. Sopravvivono i topi inoculati con 0,12 cc.

Le esperienze descritte documentano che a parità di dose (0,25 cc) la sospensione contenente germi lisati con ultrasuoni presenta un potere tossico superiore a quella che contiene germi uccisi col calore.

PRODUZIONE DI ANTICORPI NEL CONIGLIO. — Con le precedenti esperienze è stata determinata la dose minima mortale, per il topo, di una sospensione di germi uccisi o disintegrati di data concentrazione. Le inoculazioni nel coniglio vengono iniziate partendo dalla metà della suddetta dose, e cioè 0,12 cc. Vengono utilizzati 6 conigli, il cui peso si aggira sui 1.500 grammi, corrispondente all'età di 5 mesi circa: e si controlla il peso e la temperatura, curando inoltre che le inoculazioni (a 5 giorni di distanza l'una dall'altra) avvengano anche alla stessa ora della giornata. I conigli 1, 2, 3 sono stati trattati con sospensioni di germi uccisi con ultrasuoni; i conigli 4, 5, 6 hanno ricevuto germi uccisi col calore.

Non si sono notate alterazioni degne di rilievo per quel che riguarda la temperatura. Il peso è stato progressivamente in aumento, dimostrandosi così opportuna la dose inoculata (Tabelle 1 e 2).

A distanza di una settimana dalla quinta inoculazione è stata prelevata da ogni coniglio una certa quantità di sangue, in modo che fosse possibile rendersi conto del potere agglutinante del siero e della eventuale ne-

TABELLA I
SOSPENSIONE U. S.

CONIGLI	1		2		3	
	Peso	Temp.	Peso	Temp.	Peso	Temp.
1 ^a inoculazione (1/8 cc.)	1,250	38.2	1,450	38.5	1,400	38.5
2 ^a inoculazione (1/4 cc.)	1,180	38.8	1,570	38.9	1,280	38.7
3 ^a inoculazione (1/2 cc.)	1,250	38.8	1,630	38.8	1,330	39 -
4 ^a inoculazione (1 cc.)	1,360	38.5	1,650	39.2	1,440	39 -
5 ^a inoculazione (2 cc.)	1,470	38.7	1,780	39.4	1,500	38.8

TABELLA II

SOSPENSIONE O

CONIGLI	4		5		6	
	Peso	Temp.	Peso	Temp.	Peso	Temp.
1 ^a inoculazione (012 cc.)	1.800	38.5	1.750	38.6	1.700	38.7
2 ^a inoculazione (025 cc.)	2.015	38.7	1.680	39.2	1.770	39 -
3 ^a inoculazione (05 cc.)	2.030	38.9	1.660	39.2	1.800	39 -
4 ^a inoculazione (1 cc.)	2.250	39.1	1.790	39,1	1.970	39 -
5 ^a inoculazione (2 cc.)	2.360	39.4	1.930	39.4	2.180	38.8

TABELLA III

TITOLI DI AGGLUTINAZIONE PER IL
B. TIFICO WATSON

CONIGLI } Provette titolo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1:100	200	400	800	1.600	3.200	6,400	12.800	25,600
1 (US)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—
2 (US)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
3 (US)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
4 (C)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
5 (C)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
6 (C)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—

cessità di altre inoculazioni. I risultati di questa prova sono stati soddisfacenti, e si è quindi proceduto al salasso e al calcolo definitivo del titolo di agglutinazione.

Questi valori sono esposti nella tabella 3, dalla quale risulta che le sospensioni US e C hanno determinato nel siero dei conigli titoli di agglutinazione molto elevati. Questa tabella documenta chiaramente che la sospensione US, che contiene gli antigeni ultrasonori, ha determinato nei conigli inoculati la produzione di anticorpi: questi restano così dimostrati con sicurezza, contrariamente alle ricerche di CHAMBERS e WEIL.

SAGGI DI PROTEZIONE. — a) Presentando una buona quantità di anticorpi agglutinanti ad alto titolo, i conigli vaccinati vengono cimentati con germi vivi e virulenti, inoculati per via endovenosa, in tal dose da essere sicuramen-

te e rapidamente mortale per gli animali di controllo. I conigli 1 (US) e 5 (C), trascorsa una settimana dal salasso, ricevono per via endovenosa una patina di b. tifico Watson (coltivato per 24 ore su agar) sospesa in 10 cc di di soluzione fisiologica: patina valutabile a 10 miliardi di germi. Sopravvivono. Morte dei controlli entro 24 ore.

b) i conigli 2 (US) e 4 (C) ricevono ciascuno 15 miliardi di germi con le stesse modalità. Sopravvivono. Morte dei controlli.

c) I conigli 3 (US) e 6 (C) ricevono ciascuno 15 cc di brodocoltura di 3 giorni, sempre per via endovenosa: e cioè, oltre ai germi vivi e virulenti, anche una quantità non indifferente di metaboliti e di tossine. Dopo 24 ore sono vivi e in buone condizioni generali. Morte dei controlli.

d) In una esperienza del gruppo « prove di tossicità » non riportata per brevità nelle pagine precedenti, si erano ottenuti dati interessanti utilizzando dei ratti albini. Tra gli altri restarono in vita due ratti, ciascuno dei quali aveva ricevuto in peritoneo 0,5 cc di sospensione US: avevano cioè avuta una sola iniezione di antigene ultrasonoro e non erano più stati utilizzati.

Ora, dopo le prove di protezione sui conigli, ciascuno di questi due ratti riceve in peritoneo 10 cc di brodocoltura di b. tifico (il doppio della dose mortale), mentre un trattamento analogo ricevono due ratti di controllo.

Dopo 24 ore i controlli vengono trovati morti, con un significativo quadro anatomopatologico mentre vivi e in buone condizioni appaiono i ratti precedentemente trattati con l'antigene ultrasonoro.

e) Analoga prova su quei topi bianchi sopravvissuti alle prove di tossicità, che avevano ricevuto ciascuno un'unica dose (0,12 cc) di sospensione US. Ora ricevono in peritoneo 1 cc di brodocoltura (5 volte la dose mortale). Sopravvivono e non presentano alcun segno di sofferenza. Morte dei topi usati come controlli.

Queste prove di protezione, eseguite su conigli, topi e ratti, documentano che gli antigeni ultrasonori non determinano soltanto la formazione di anticorpi circolanti, ma inducono anche un solido grado di immunizzazione, dimostrato dal fatto che gli animali (per quanto inoculati con dosi massive più che mortali di germi vivi e virulenti, e — per quel riguarda le brodocolture — anche con dosi considerevoli di prodotti tossici) sono rimasti in vita e in buone condizioni generali.

PROVE DI PRECIPITAZIONE. — Avendo a disposizione del siero immune verso il b. tifico, è stato studiato il suo comportamento dal punto di vista della precipitazione, utilizzando come antigeni estratti batterici omologhi e filtrati per candela di brodocolture, e precisamente:

- 1) ANTIGENE A: filtrato di brodocoltura;

2) ANTIGENE B: filtrato di brodocoltura, esposto poi al calore (bagnomaria a 100° C per 5 minuti);

3) ANTIGENE C: filtrato di sospensione densa in soluzione fisiologica di una agarcoltura di 24 ore, esposta poi al calore (100° C. per 5 minuti);

4) ANTIGENE US: filtrato di sospensione analoga alla precedente, ma trattata con ultrasuoni.

Lo scopo di queste prove (Tabella 4) è quello di mettere in evidenza il titolo, cioè la massima diluizione a cui ciascuno dei quattro antigeni è capace di produrre la precipitazione. Viene usata per queste prove la così detta « reazione per miscela » secondo la tecnica di Uhlenhut.

La tabella 4 riassume i risultati di queste prove di precipitazione. Da essa risulta che il titolo più alto (1:64.800) si ha con l'antigene costituito da un filtrato di lisato batterico ottenuto mediante ultrasuoni, mentre l'analogo estratto ottenuto col calore si dimostra meno attivo, come pure i filtri di brodocoltura.

PROVE DI PRECIPITAZIONE (Siero 1:4)

TABELLA IV

Anti- geni Prov. Tit.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	1 : 200	400	800	1.600	3.200	6.400	12.800	25.600	38.400	51.200	64.800
A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	—	—
B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
C	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	—
US	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Le ricerche esposte hanno cercato di portare un contributo di chiarificazione al problema, di notevole interesse pratico e teorico, delle proprietà immunologiche e immunochemiche dei lisati batterici ottenuti con ultrasuoni.

Dalle ricerche bibliografiche compiute risultava che erano stati isolati e messi in evidenza gli antigeni ottenuti con ultrasuoni, mentre aveva dato esito negativo la produzione di anticorpi negli animali da esperimento mediante l'inoculazione di antigeni ultrasonori.

Le nostre ricerche, concernenti il b. tifico, hanno invece dato risultato positivo, ed è stata documentata la presenza, nel siero degli animali inoculati, di un elevato potere agglutinante e precipitante, nonché di una solida condizione di immunità attiva.

Resta da chiarire l'esito negativo delle ricerche di CHAMBERS e WEIL. Questi autori hanno utilizzato gli antigeni solubili diffusisi nel liquido rimasto dopo l'allontanamento mediante centrifugazione dei residui batterici disorganizzati: noi invece abbiamo utilizzato il liquido e i fram-

menti dei corpi microbici. A quel che risulta dalla loro pubblicazione, possiamo fare l'ipotesi che CHAMBERS e WEIL abbiano adoperato sostanze a limitato potere antigene, in modo che gli anticorpi *certamente formati* in vivo non abbiano poi potuto agire in vitro contro il germe intero, o abbiano agito insufficientemente.

Il secondo quesito che ci siamo proposti riguarda le possibili differenze di ordine chimico tra sospensioni di germi uccisi con ultrasuoni e sospensioni sterilizzate con uno dei comuni metodi.

Che esistano differenze chimiche, ci è riuscito di provarlo con lo studio della dose minima mortale. Questo fatto (che cioè 0,25 cc di sospensione trattata con ultrasuoni siano letali per i topi, mentre con 0,25 cc della stessa sospensione di germi — sterilizzata però col calore — i topi restino in vita) rappresenta una chiara conferma sperimentale della nostra affermazione teorica, base delle nostre ricerche, concernente il meccanismo d'azione degli ultrasuoni: che cioè la lesione o frammentazione del corpo batterico mediante queste vibrazioni meccaniche debba determinare la liberazione, nel liquido sospenditore, di sostanze antigeni chimicamente integre, o per lo meno molto più affini chimicamente a quelle del germe vivo e virulento: e appunto la prova biologica ha appurato che l'antigene ultrasonoro, a parità di dose, è più tossico di quello ottenuto col calore.

Infine la prova decisiva, concernente quella che abbiamo chiamato « più sottile specificità immunochimica », si è avuta cimentando i derivati batterici, usati come precipitogeni, con l'omologo antisiero, e facendo inoltre il confronto con i filtrati di brodocoltura. Le prove di precipitazione hanno chiaramente documentato che il lisato batterico mediante ultrasuoni riesce a provocare la precipitazione a un titolo molto più alto rispetto agli altri antigeni, impiegati come controllo.

L'autore desidera esprimere la propria riconoscenza al prof. Trabacchi, per aver potuto utilizzare il generatore di ultrasuoni dell'Istituto Superiore di Sanità, e al prof. Puntoni, preside della Facoltà di Medicina, per avere avuto nell'Istituto di Igiene la più completa libertà di lavoro.

Roma, Istituto Superiore di Sanità e Istituto d'Igiene dell'Università, luglio 1949.

B I B L I O G R A F I A

- AKIJAMA S. - Tokoku J. Exp. Med. 30 1938, 192.
BARONE A. - Rendiconti Ist. Sup. Sanità di Roma 9 1946, 632.
CHAMBERS LA. e coll. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34 1936, 631.
CHAMBERS LA., WEIL A. J. - Id. 38 1938, 924.
DI MACCO G. - Arch. It. Med. Sperim. 2 1938, 66 (ampia bibliografia).
FANUCCHI F., BUSSI L. - Lo Sperimentale 97 1944, 251 (ampia bibliografia).
FLOSDORF E. W. e coll. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 41 1939, 122.
GIACOMINI A. - Alta Frequenza 3 1938, 660.
GRABAR P., ROUYER M. - Ann. Inst. Pasteur 71 1945, 154.
MUDD S. e coll. - J. Bact. 31 1936, 571.
SAUTET J. e coll. Rev. Canad. Biol. 6 n. 2 1947, 179.
-