

BIBLIOTECA  
LANCISIANA



IL

# ROMO-CITOMETRO

NUOVO STRUMENTO

per dosare l'emoglobina del sangue

DEL PROF.

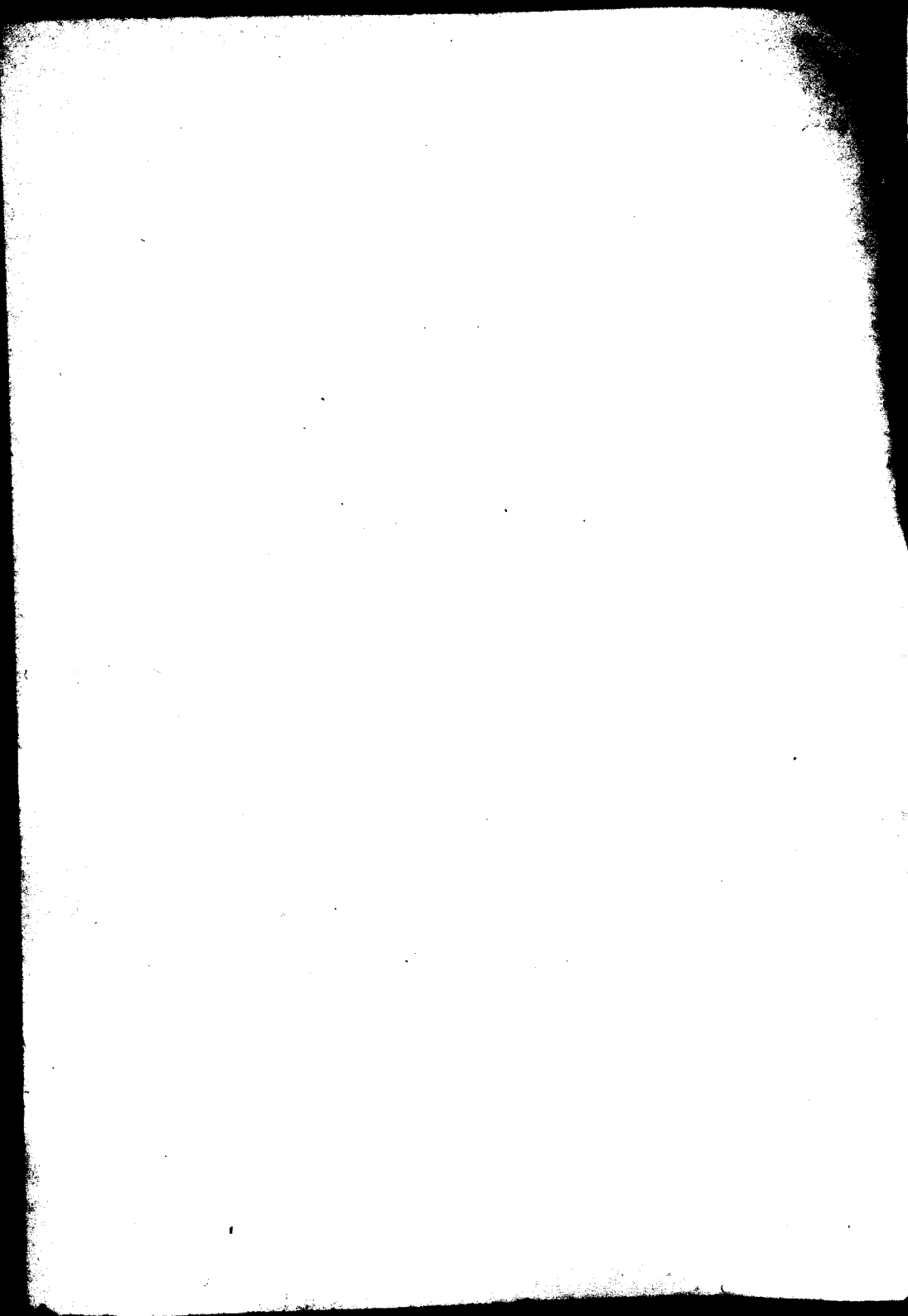
**G. BIZZOZERO**

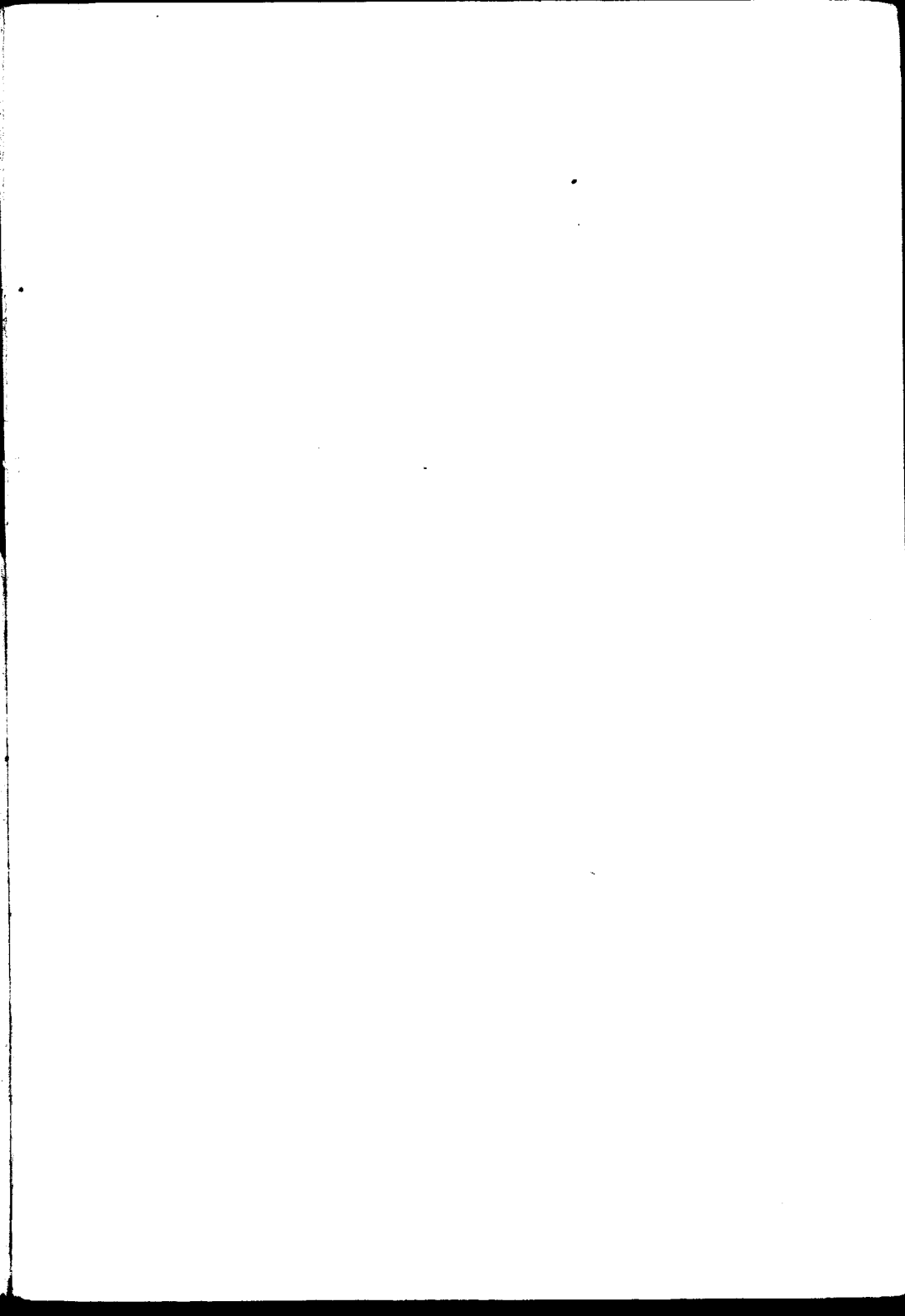
DELL' UNIVERSITÀ DI TORINO

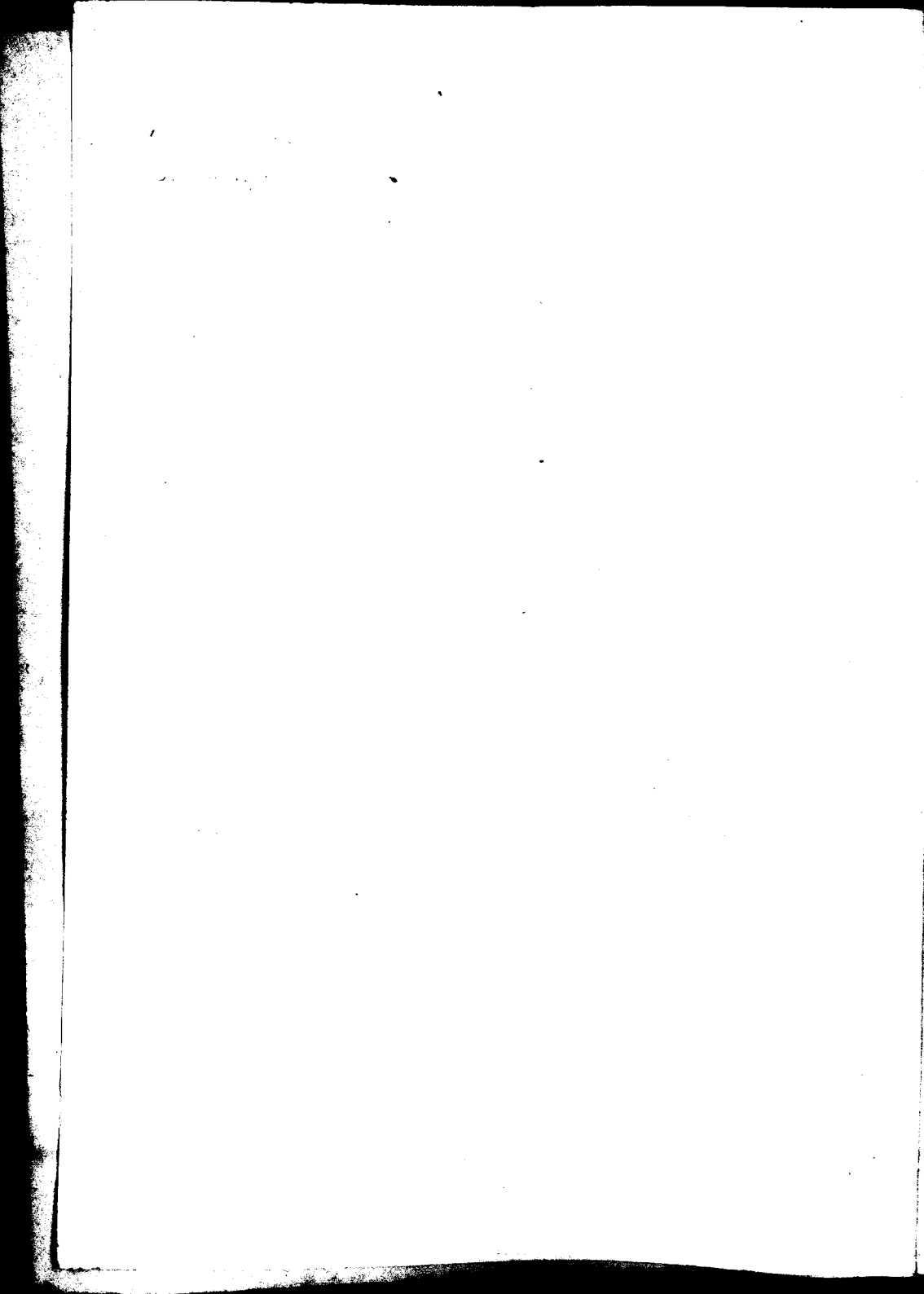


STAMPERIA REALE DI TORINO

1879







*Al m. Illustr. Conte  
Il prof. G. Bizzozero  
Torino*

IL

# CROMO-CITOMETRO

NUOVO STRUMENTO

per dosare l'emoglobina del sangue

DEL PROF.

**G. BIZZOZERO**

DELL' UNIVERSITÀ DI TORINO



STAMPERIA REALE DI TORINO  
1879

---

Estr. dagli *Atti della Reale Accademia delle Scienze di Torino*, Vol. XIV.  
Adunanza dell' 11 Maggio 1879.

---

# IL CROMO-CITOMETRO

NUOVO STRUMENTO

per dosare l'emoglobina del sangue

---

## I.

La grande importanza che venne sempre attribuita ai globuli rossi del sangue ha fatto sì, che in ogni tempo si moltiplicassero le proposte di metodi atti a determinare la quantità in cui essi sono contenuti in questo prezioso liquido; sicchè lavoro di lunga lena sarebbe quello di darne una esposizione. Per le comuni esigenze della fisiologia e della clinica, però, era ed è condizione indispensabile per adottarli questa, che il metodo richieda una piccola quantità di sangue, e dia risultati di una relativa esattezza. S'intende da sè, che nelle indagini sia in animali che nell'uomo generalmente non è indifferente la sottrazione di una notevole quantità di sangue, la quale, oltre al far danno alla salute, può anche alterare i risultati dello sperimento; e s'intende facilmente del pari, che, se la maggiore esattezza è sempre desiderabile, tuttavia può accontentarci per ora anche una esattezza relativa, trattandosi della dosatura di

una sostanza che va soggetta a variazioni quantitative continue anche nello stato fisiologico.

Tra i metodi proposti in passato si possono, quindi, lasciar da parte tanto quelli basati sull'analisi chimica, poichè richiedono soverchia copia di sangue, quanto quelli fondati sulla numerazione dei globuli, perchè, oltre all'essere di noiosa applicazione, mancano di esattezza, essendo stato dimostrato che il numero dei globuli non è sempre in ragione diretta della quantità d' emoglobina; ora, è appunto di questa e non di quello che all'osservatore importa di tenere il massimo conto.

Rispondono meglio alle esigenze scientifiche parecchi metodi proposti in tempi più recenti, e poggiati sulla intensità di colorazione della emoglobina sia sciolta, sia ancora fissata nei globuli sanguigni. — Io non farò che accennarli, essendo essi già stati replicatamente descritti nei molti lavori pubblicati negli ultimi anni su questo interessante argomento (1).

Nel metodo di HOPPE-SEYLER la soluzione di sangue da analizzare viene paragonata ad una soluzione di emoglobina di conosciuta titolazione, ed allungata con acqua fino a che la colorazione delle due soluzioni sia eguale. Dalla quantità d'acqua che s'è dovuta aggiungere alla quantità nota di sangue adoperato si desume il contenuto in emoglobina. — Modificazione di questo è il metodo di WORM MÜLLER, che, invece di diluire una data quantità di sangue con una indeterminata quantità di acqua, colorisce una determinata quantità d'acqua con una indeterminata quantità di sangue, e determina il

---

(1) V. ad es. la rassegna che ne è fatta nella Memoria di L. MALASSEZ: *Sui diversi metodi di dosatura dell' emoglobina e su di un nuovo colorimetro*. Parigi, 1877.

contenuto emoglobinico dalla quantità di quest' ultimo che si dovette adoperare.

HAYEM, invece, paragona il colore di una determinata soluzione del sangue in esame coi diversi gradi di una scala fatta con colori all'acquerello, coi quali s' è studiato d'imitare al più possibile il colore del sangue. L'esame si fa a luce riflessa, non per trasparenza, come cogli altri metodi.

Nel cromometro di MALASSEZ il colore della soluzione sanguigna raccolta in un piccolo recipiente di vetro a faccie parallele, in modo che essa costituisca uno strato costantemente dello stesso spessore, viene paragonato per trasparenza al colore di una soluzione contenuta in un prisma cavo di vetro, e colorata per mezzo del picrocarminato d'ammoniaca, che, com' è noto, è assai simile, per colore, al sangue. A seconda del punto del prisma che si esamina, lo spessore dello strato di soluzione contenutovi, e, quindi, la sua intensità di colorazione sarà diversa. Ora, la determinazione della quantità di emoglobina del sangue da analizzarsi si desume dal punto del prisma in cui la sua intensità di colorazione è eguale a quella della soluzione sanguigna contenuta nel recipiente a faccie parallele.

Su consimile principio è basato l'emocromometro di QUINCKE. Consta di una serie di tubi di vetro tutti di egual lume. In uno s'assorbe il sangue in esame convenientemente diluito; negli altri stanno, chiusevi a fuoco, delle soluzioni a diversa e conosciuta concentrazione di picrocarminato d'ammoniaca. Si determina quale di queste soluzioni corrisponda, per intensità di colore, alla soluzione sanguigna, e, con questa base, mediante un calcolo semplicissimo si pratica la determinazione dell'emoglobina.

Buoni risultati hanno dato i metodi spettroscopici. PREYER fu il primo che ne ebbe l'idea. Esaminando allo spettroscopio una soluzione concentrata di una nota quantità di emoglobina, non si scorgono che i raggi rossi; ma se si aggiunge gradatamente dell'acqua, arriverà un momento in cui appariranno anche i raggi verdi. A questo punto si determina la quantità d'acqua aggiunta, e, con ciò, si titola la soluzione. Si avrà così una soluzione titolata d'emoglobina che in quelle date condizioni (luce, larghezza della fessura dello spettroscopio, spessore dello strato di soluzione) permette il passaggio ai raggi verdi. Ciò premesso, ad essa si sostituisce una determinata quantità del sangue da esaminare, e la si allunga gradatamente di tanto, che anch'essa produca lo stesso effetto ottico, permetta cioè il passaggio de' raggi verdi: la soluzione sarà a questo punto d'egual titolo di quella antecedente di emoglobina, e dalla quantità d'acqua che si è aggiunta si desumerà il contenuto di sostanza colorante. — QUINCKE ha modificato leggermente questo metodo; invece di diluire il sangue in un ematinometro, ne mette una soluzione a titolo fisso in un prisma di vetro, che fa scorrere dinanzi alla fessura dello spettroscopio, e arresta in quella posizione in cui cominciano ad apparire i raggi verdi.

Per questi due metodi s'ha lo svantaggio di dover pigliare per punto di partenza una soluzione titolata di emoglobina. Nel metodo di VIERORDT ciò non è necessario, ed anche la quantità di sangue che abbisogna per l'esame è piccolissima. Questo metodo venne già applicato da diversi osservatori, e su di esso è basato il bel lavoro di LEICHTENSTERN pubblicato nel 1878: *Indagini sul contenuto in emoglobina del sangue negli stati normali*

e patologici (1). Esso si fonda sulla diversa intensità di assorbimento di luce in corrispondenza delle strie spettroscopiche dell'emoglobina a seconda della concentrazione di soluzione di quest'ultima. Siccome, però, la descrizione ne è alquanto complicata, così rimando alla anzicitata Memoria di LEICHTENSTERN ed alle pubblicazioni dell'inventore (2).

Il metodo di MANTEGAZZA, finalmente, riposa su di un principio affatto differente da quelli finora esposti; sulla misura del grado di trasparenza di un liquido in cui i globuli siano soltanto sospesi. Se, guardando la fiamma di una candela stearica attraverso uno strato di spessore costante della diluzione sanguigna, s'interpone una serie di vetri azzurri fra questa e la fiamma, arriverà un momento in cui la fiamma non sarà più visibile. È chiaro, che quanto più il sangue sarà trasparente, tanto più grande sarà il numero dei vetri azzurri che si potranno interporre senza che la fiamma scompaia; dal numero dei vetri si potrà, così, giudicare della trasparenza della soluzione, e, conseguentemente, della sua ricchezza in sostanza colorante.

Parecchi mesi or sono, intendendo io di dar principio ad una serie di indagini sulle alterazioni qualitative del sangue, mi trovai nella necessità di scegliermi uno strumento per potere, con precisione e relativa rapidità, dosare l'emoglobina. Mi procurai, perciò, parecchi degli

(1) *Untersuchungen über den Haemoglobulingehalt des Blutes in gesunden und kranken Zuständen.* Leipzig, F. C. W. VOGEL, 1878.

(2) VIERORDT, *Die Anwendung des Spectralapparates z. Messung und Vergleich. des farb. Lichtes* Tübingen, 1871. — *Die Anwend. des Spectralapparates zur Photometrie der Absorptionsspektren.* Tübingen, 1873.

strumenti più sopra descritti, ed istituì fra loro un confronto. — Fino da quando io assisteva il Prof. MANTEGAZZA nelle sue esperienze sul *globulimetro*, io mi era persuaso della grande esattezza cui si può giungere col principio da lui adottato, e m'era rimasto il desiderio di fare al suo strumento alcune correzioni, modificazioni ed aggiunte, le quali emendassero i difetti che vi erano stati riconosciuti e che ne avevano impedito la diffusione.

Delle critiche fatte al *globulimetro* di MANTEGAZZA alcune reggono, altre no. — Non regge quella che tenta di dimostrare erroneo il principio su cui si fonda. Da alcuni si disse: i raggi luminosi che passano attraverso lo strato sanguigno, in parte vengono assorbiti, in parte vengono riflessi dai globuli sanguigni. Ora, siccome questi ultimi sono costituiti da uno stroma entro cui sta la materia colorante, l'emoglobina, così una maggiore o minore riflessione della luce potrà dipendere tanto da una alterazione della emoglobina, quanto da un'alterazione dello stroma. Le indicazioni date dallo strumento, perciò, non saranno dovute sempre al variare dell'emoglobina, e, quindi, non potranno servire alla dosatura di essa. — Il ragionamento è giusto, ma la premessa è inesatta. I globuli sanguigni riflettono la luce specialmente in ragione della emoglobina che contengono, e della forma che, quando ne contengono, hanno. Il loro stroma è così trasparente, che quando (sottoponendo il sangue al congelamento, all'azione dei vapori di cloroformio, all'aggiunta di acqua ecc.) l'emoglobina ne esce e si diffonde nel liquido che li circonda, esso sfugge assolutamente alla vista, sicchè per molto tempo si credette che si disciogliesse; di conseguenza, *il sangue diventa trasparente*. Nessuno ha dimostrato che ciò non sia anche nei casi

patologici. La mancanza di trasparenza dello strato sanguigno non dipende dalla presenza degli stroma dei globuli, ma sì da ciò che in essi è contenuta l'emoglobina; è questo fatto che produce una differenza dell'indice di rifrazione fra i globuli ed il siero; quanto più la quantità di emoglobina è considerevole, tanto maggiore sarà la differenza dell'indice, e più grande l'opacità dello strato sanguigno.

Pel globulimetro non regge nemmeno la critica fatta al lattoscopio di DONNÉ; che, data eguale la quantità di emoglobina, qui del grasso, la riflessione sia influenzata dalla grossezza dei globuli che stanno sospesi nel liquido. Infatti, nel sangue i globuli hanno presso a poco lo stesso diametro, ed anche nei casi di microcitemia il numero dei globuli piccoli è relativamente ristretto.

Un'altra serie di critiche, invece, ha solida base; ed è in seguito ad esse che io ho trasformato il globulimetro nel mio nuovo strumento.

La principale è quella che riguarda la graduazione. Come si è detto, questa nell'istrumento di MANTEGAZZA viene fatta mediante un vario numero di vetri colorati disposti dinanzi alla soluzione sanguigna. — Ora, prescindendo da ciò che la scala risultante è affatto arbitraria, riesce impossibile il confronto dei risultati ottenuti fra due strumenti diversi non confrontati con un istrumento modello, poichè in commercio è impossibile ottenere delle lastre di vetro della precisa grossezza ed intensità di colorazione. Si noti che l'errore può essere grande, poichè p. es. nei casi di anemia l'errore dipendente dalla differenza del vetro deve essere moltiplicato per 15 - 20 - 25, quanti, cioè, sono i vetri che corrispondono al grado dell'anemia stessa. — Per to-

gliere questo difetto io ho adottato pel mio strumento il principio di costruzione del lattoscopio di DONNÉ; ho preferito misurare la trasparenza dello strato col modificarne lo spessore. Per questa via si ottiene una graduazione a base fissa, e che può essere riprodotta in qualunque strumento, da qualunque fabbricatore, senza il paragone con alcun strumento campione.

Per usare del globulimetro di MANTEGAZZA la notevole quantità di sangue che si richiedeva (1 cent. cubo) costringeva a salassare direttamente una vena. — Io ho ridotto assai le proporzioni del mio strumento, sicchè per esso possono bastare 10 mill. cub. di sangue, assai meno, cioè, del sangue che s'ottiene da una piccola puntura di spillo.

Finalmente il globulimetro trova una fonte di errori nel fatto, che in date condizioni il sangue contiene degli elementi morfologici incolori (leucociti, globuli di grasso) che possono riflettere la luce indipendentemente dall'emoglobina, e che, quindi, rendono lo strato più opaco. Della gravezza dell'errore verrà trattato più tardi. — Io ho però rimediato completamente a ciò, dando allo strumento tale disposizione che lo si possa (quando si voglia) facilmente far agire non già con *sospensioni*, ma con vere *soluzioni* di sangue; trasformandolo, così, da globulimetro, o citometro che dir si voglia, in cromometro. Si è appunto pel fatto che il mio strumento può lavorare su due diversi principi, ed è, per così dire, un strumento doppio, che io gli applicai il nome di *cromo-citometro*.

## II.

Il cromo-citometro serve a determinare la quantità di emoglobina contenuta nel sangue.

Il cromo-citometro può servire come citometro o come cromometro. E nell' uno e nell' altro caso l'istrumento agisce per ciò, che con esso si fa variare lo spessore di uno strato di sangue diluito; e dallo spessore che si deve dare allo strato onde ottenere un determinato effetto ottico si deduce la ricchezza emoglobinica del liquido preso in esame. Quando lo strumento agisce da citometro il sangue viene semplicemente mescolato con una determinata quantità (1:50) di soluzione (cloruro sodico 0,75, acqua 100) che non ne altera i globuli: questi ultimi quindi rimangono colorati e stanno sospesi nel liquido: la ricchezza emoglobinica del sangue si deduce dallo spessore che devesi dare allo strato per poter vedere appena appena distinta la fiamma di una candela posta in una camera buia ad un metro e mezzo di distanza dall'istrumento. — Quando invece l'istrumento agisce da *cromometro*, il sangue viene mescolato con una determinata quantità di acqua, la quale scioglie l'emoglobina, sicchè il liquido, pur rimanendo colorato, diventa trasparente; la ricchezza emoglobinica si deduce dallo spessore che devesi dare allo strato perchè la sua intensità di colorazione sia uguale a quella di un vetro-campione colorato, che fa parte dell'istrumento.

### Descrizione dello strumento.

La parte essenziale dello strumento (fig. 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup>) è costituita da due tubi (*ab* e *cd*), di cui l'uno entra nell'altro. Entrambi i tubi sono chiusi ad una stessa estremità da un disco di vetro (*z* e *z'*); l'altra loro estremità è aperta. Il tubo interno può essere introdotto liberamente nel tubo esterno, ma solo per un certo tratto; per l'ultimo tratto, ch'è circa di 6 millimetri, vi si introduce per mezzo d'una vite, di cui esso porta il maschio (*v'*), mentre la madrevite è incisa sulla superficie interna del tubo esterno (*v*). Quando l'un tubo è avvitato completamente nell'altro, i due dischi di vetro sono a reciproco contatto.

Al di sopra del tubo esterno è saldato un recipiente (*r*) a forma di semicanale coll'asse più lungo parallelo a quello del tubo, limitato all'avanti e all'indietro da due superficie piane, della lunghezza di 13 mill. e capace di qualcosa più che mezzo grammo di liquido. Questo recipiente nella parte anteriore del suo fondo porta un foro, che corrisponde ad un foro scavato nella parete del tubo esterno; si ha così un canaletto che mette in comunicazione il semicanale con la capacità del tubo esterno, e che mette capo in quest'ultimo immediatamente all'indietro del disco di vetro che ne chiude l'estremità anteriore. — Il tubo esterno è fermato a vite sul manico dell'istrumento (*m*, *m'*).

Il tubo interno ha la lunghezza totale di 21,5 mill. — All'estremità ant. (ch'è chiusa dal disco di vetro) il suo diametro interno è di 5 mill.; andando all'indietro, si va lentamente dilatando, sicchè all'estremità posteriore raggiunge 7 mill. — La superficie esterna del tubo (fig. 1<sup>a</sup>

e 2<sup>a</sup> cd), andando dall'avanti all'indietro, offre le seguenti particolarità: 1° per un millimetro e mezzo essa è liscia, e qui il tubo misura la grossezza di 7<sup>m</sup>,5; 2° nei successivi 5<sup>m</sup>,5 essa porta l'elica della già menzionata vite, il cui passo misura *precisamente* mezzo millimetro, e qui il tubo misura 8<sup>m</sup>,0; 3° di nuovo per 1<sup>m</sup>,5 il tubo è liscio e va leggermente ingrossando; 4° nei successivi 12<sup>m</sup> il tubo ha una grossezza di 8<sup>m</sup>,5, ed è liscio; è su questa sezione che è segnata la graduazione dello strumento, che verrà descritta a momenti; 5° nell'ultimo mill. il tubo è abbracciato da un cercine (*cr*) a forma di disco forato, del diametro di 19<sup>m</sup>, che è saldato fermamente col tubo, e che serve a doppio scopo: cioè a maggior comodità nell'avvitare e svitare il tubo, e ad intercettare i raggi luminosi che non passano per lo strato di sangue, quando si pone in attività l'istrumento.

Ecco ora come è fatta la graduazione del tubo, affine di determinare la distanza che separa l'uno dall'altro i due dischi di vetro che limitano lo strato sanguigno; val quanto dire, adunque, lo spessore di quest'ultimo. Nel disegno del tubo interno che è rappresentato dalla fig. 1<sup>a</sup> si scorge, che nella quarta porzione del tubo stesso sono segnate 7 linee circolari (parallele fra loro) lontane un millimetro l'una dall'altra. Quando il tubo interno è al più possibile introdotto nell'esterno (e, quindi, i due vetri sono a contatto), il margine posteriore di quest'ultimo coincide precisamente con la prima di queste linee circolari. Ora, se noi svitiamo il tubo di 2 passi di vite, siccome ogni passo è 0<sup>m</sup>,5, così l'avremo svitato di un millimetro, e il margine posteriore del tubo esterno corrisponderà alla 2<sup>a</sup> linea; se svitiamo di 4 passi, il tubo sarà stato svitato di 2 mill., e il margine del tubo esterno

corrisponderà alla terza linea; e così di seguito. Con altre parole, dal numero delle linee che sporgono al di fuori del margine posteriore del tubo esterno si deduce di quanto si sia estratto il tubo interno, ovvero di quanto distino fra loro i due dischi di vetro che chiudono l'estremità dei due tubi, ovvero ancora lo spessore dello strato sanguigno che è compreso fra questi due dischi. — Siccome il passo della vite è di mezzo millimetro, se nel tubo interno si avesse voluto segnare ogni passo, le linee graduatorie avrebbero dovuto distare soltanto mezzo millimetro l'una dall'altra. Ma la loro vicinanza ne avrebbe reso difficile la lettura; epperò ho preferito segnare soltanto i millimetri; e di ciò è importante tener conto nel leggere la graduazione, onde non commettere degli errori di mezzo millimetro. — Allo scopo di misurare le frazioni di millimetro, la parte sporgente del tubo interno è divisa in 25 gradi per mezzo di linee equidistanti l'una dall'altra e parallele all'asse del tubo stesso. Si comprende agevolmente, che se un'intera rotazione del tubo intorno al proprio asse corrisponde a mezzo millimetro, ogni grado varrà  $\frac{0,5}{25}$ , ossia un cinquantesimo di millimetro. Per facilitare i calcoli, è preferibile tradurre in centesimi di millimetro; per il che si riterrà che ogni grado della scala equivale a due centesimi di millimetro (0<sup>m</sup>,02).

La lettura di queste frazioni di mill. viene resa più agevole da ciò, che i gradi sono numerizzati ogni cinque. Ad istrumento chiuso, il 0 della scala corrisponde ad una linea segnata sul tubo esterno dello strumento. Perciò, ad ogni rotazione *completa* del tubo interno, cioè ad ogni variazione di spessore dello strato sanguigno eguale a mezzo millimetro, lo zero tornerà a corrispondere alla

linea del tubo esterno; mentre, invece, nelle frazioni di rotazione a quest'ultima linea corrisponderà, a seconda dei casi, l'uno o l'altro dei gradi della scala. —

Allorchè si vuole far funzionare l'istrumento da cromometro, è necessario annettergli un vetro-campione colorato. Questo vetro è tenuto fisso e difeso in una specie di scatola circolare d'ottone (fig. 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> *sc*), le cui due metà si fissano l'una sull'altra a vite, e che porta nel suo centro un foro circolare (fig. 3<sup>a</sup> *f*) del diametro di 5 mill., il quale è chiuso soltanto dal vetro colorato in questione. Questa scatola è fissata in una lamina (fig. 3<sup>a</sup> e fig. 4<sup>a</sup> *l*) parimente d'ottone (colorata, come la scatola, in nero) la quale, per mezzo di un'asticina (fig. 3<sup>a</sup> *ast*) dello stesso metallo che si insinua nel foro *y* (fig. 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup>) si può fissare all'istrumento, e levare da esso con tutta facilità. Credo che uno dei pregi principali dello strumento sia il processo che ho tenuto per colorare questo vetro-campione. È noto quanto sia difficile ottenere dei vetri che abbiano la stessa qualità e intensità di colore di una data soluzione di sangue. Si è per questa difficoltà che in metodi e strumenti recenti, p. es., in quelli di RAJEWSKY, di MALASSEZ, di QUINCKE e di GROWEERS si è pensato di giungere allo scopo usando di soluzioni di picrocarminato di ammoniaca. Senonchè esse hanno due difetti: è raro che abbiano precisamente il vero tono di colore del sangue (ed io me ne sono persuaso tanto in un istrumento di MALASSEZ, quanto in due di QUINCKE, che ho esaminato), poi hanno lo svantaggio, coll'andar del tempo, di impallidire. — Perciò io mi sono messo all'impegno di colorare i miei vetri colla stessa ossiemoglobina del sangue, per nulla scoraggiato delle difficoltà che si sono incontrate finora per preservare l'ossiemog-

globina dalla decomposizione. Dopo parecchie prove ho trovato che il metodo che meglio corrisponde allo scopo, è di conservare l'ossiemoglobina essiccata, a bassa temperatura, nella gelatina, e preservata dall'umidità ed altre azioni atmosferiche col chiuderla in vernice Damar sotto un coprogetti, come s'usa per le ordinarie preparazioni microscopiche. Ecco il metodo dettagliato, che mette in grado chicchessia di ottenere vetri colorati come i miei, e, ad un dipresso, della stessa intensità di colorazione. Faccio tagliare dei dischetti (tolti ad una lastra di vetro comune, ma scevro di difetti) di un centimetro di diametro. Poi preparo la soluzione nel seguente modo: Sciolgo 0,4 Cc. di sangue di coniglio in 4 Cc. di acqua resa leggermente alcalina con una frazione di goccia di ammoniac; fatta la soluzione, vi faccio sciogliere un pezzettino di carbonato di soda, per meglio conservare l'ossiemoglobina. D'altra parte preparo a bagno maria una tenue soluzione di gelatina di Parigi; quando questa è sciolta, lascio raffreddare la soluzione stessa a dolce tepore, poi, con una pipetta leggermente tepida ne misuro 2 Cc. che aggiungo alla preparata soluzione di sangue. Siccome la gelatina è in piccola quantità, la soluzione risultante dalla mescolanza rimane ancora liquida; di questa assorbo in una pipettina tiepida 20 mmc. che soffio e lo distendo diligentemente su uno dei dischettini di vetro già preparati puliti. In pochi minuti la soluzione gelatinosa si solidifica; ed in poche ore, evaporata l'acqua, rimane uno strato abbastanza uniforme di gelatina colorata e secca. Su questo si versa una goccia di vernice Damar, e il tutto si copre con un vetrino piccolo da microscopio. Dopo qualche giorno, essiccata la vernice, il vetro colorato è pronto a servire pel cromometro.

Allorchè la gelatina è ancora umida, esaminato lo strato allo spettroscopio, le due striscie di assorbimento dell'ossiemoglobina appaiono più spiccate che quando, più tardi, essa secca. Succeduta, però, questa primitiva modificazione, l'ossiemoglobina pare non continui a decomorsi. Almeno io non mi posso accorgere di alcuna variazione dell'aspetto spettroscopico in preparati che conservo da 5 mesi e mezzo (dalla fine di Novembre). Non posso garantire che per l'avvenire non succeda qualche modificazione della colorazione, benchè nulla me lo faccia, per ora, presagire. Ove anche, però, ciò accadesse, si potrebbe, col confronto fra il valore citometrico e il cromometrico di un sangue sano, calcolare la differenza fra i loro rapporti e modificare la tabella. — Del resto, una decomposizione dell'ossiemoglobina ridotta a soluzione così tenue in uno strato così sottile parmi non possa modificare notevolmente le intensità e il tono di colore del vetro-campione.

### **Modo d'usare l'istrumento.**

#### **CITOMETRO**

1° Per mezzo della pipetta si misura con precisione mezzo centimetro cubico di soluzione sodica e la si versa nella provettina.

2° Con una lancetta si pratica una piccola ferita (lunga un 2 o 3 millimetri) sulla punta di un dito, preferibilmente nel rilievo cutaneo che limita lateralmente le unghie. Colla pratica facilmente si acquista l'abitudine di far ferite nè troppo grandi nè troppo piccole, in modo,

2 G. BIZZOZERO.

che senza bisogno di legare il dito, semplicemente col pigliarlo *dolcemente*, si ottenga una bella goccia di sangue.

3° Colla pipetta piccola si assorbono e si misurano *esattamente* 10 mill. cubici di sangue. Per assorbire si adatta alla parte tronca della pipetta il tubo di caoutchou, si immerge la punta di essa nella goccia di sangue e si aspira leggermente colla bocca all'estremità libera del tubo. Per esser più precisi nella misura si aspira una colonna di sangue un po' più lunga del tratto dei 10 millimetri cubici, poi si asciuga la punta della pipetta, e, ciò fatto, si colpisce leggermente colla punta medesima il polpastrello di un dito; ad ogni colpo una minima quantità di sangue aderisce alla pelle, e conseguentemente l'altezza della colonna nella pipetta si abbassa; si danno così 3, 4, 5 colpettini, fino a che il limite superiore della colonna corrisponde precisamente alla linea incisa sul vetro.

4° Si mescolano i 10 mm. cubici col mezzo centimetro di soluzione sodica. Per far ciò si immerge la punta della pipetta nella soluzione sodica, e si soffia leggermente nel tubo di caoutchou; il sangue, così, passa dalla pipetta nella soluzione. Per due o tre volte si aspira, e si espira dal tubo un po' di soluzione a fine di pulire bene la pipetta, la quale poi viene lavata con acqua.

5° La sospensione del sangue viene resa omogenea col rimescolarla per mezzo del bastoncino di vetro di cui l'estremità appiattita si immerge nel liquido, mentre la cilindrica si fa rotolare fra le dita.

6° La sospensione del sangue si versa nel semi-canale del citometro, i cui vetri sono a reciproco contatto.

7° Si svita il cilindro interno; con ciò l'un vetro si allontana dall'altro, e nello spazio risultante viene aspi-

rato il liquido. Si continua a ritrarre finchè lo strato liquido abbia lo spessore di qualche millimetro. A questo punto l'istromento è pronto per l'osservazione.

L'operazione si fa in una camera buia nella quale possibilmente non vi sieno correnti d'aria che facciano oscillare troppo la fiamma della candela. L'osservatore si pone ad un metro e mezzo dalla fiamma, dà di piglio all'istromento colla mano sinistra e porta la visuale del tubo in corrispondenza dell'occhio destro. Colla mano destra, poi, svita ed avvita il cilindro onde modificare lo spessore dello strato di sangue.

Come si disse, per apprestare l'istromento all'osservazione s'era già dato allo strato lo spessore di alcuni millimetri, sicchè al primo applicare l'occhio all'istromento la fiamma non riesce visibile. Man mano, però, che si assottiglia lo strato, essa compare sotto la forma di un punto splendente a contorni sfumati che va spiccando sempre più ed acquistando contorni più decisi. Si continua ad avvitare il tubo finchè i tre quarti superiori della fiamma appaiono a contorni netti. A questo punto, si gira in senso inverso la vite; la fiamma va man mano riacquistando i contorni sfumati. Si rigira nel senso di prima ed i contorni riappaiono. Ripetendo così un due o tre volte, si giunge a trovare quel punto in cui i contorni dei tre quarti superiori della fiamma *sono spiccati, ma non tanto che svitando leggermente il tubo non tornino a farsi diffusi; la fiamma stessa, poi, non appare lucente, ma è come velata, e di colore rossigno.* È questo il punto giusto; non resta che a leggere su l'istromento lo spessore dello strato di sangue.

1° All'istrumento si applica la lastra metallica col vetro-campione.

2° Colle stesse precauzioni indicate per l'esame citometrico si misurano 10 mm. c. di sangue, e si versano in mezzo grammo di acqua distillata. Rimescolando, in pochi istanti si ha una soluzione perfetta di emoglobina.

3° Questa soluzione si versa nel semi-canale dell'istrumento, e, svitando il tubo interno, la si aspira fra i due vetri paralleli, fino a che si formi uno strato di alcuni millimetri.

4° A questo punto s'innalza lo strumento, lo si dirige contro una superficie bianca bene illuminata, od anche direttamente verso il cielo (naturalmente, non verso il sole) e si paragona il colore del vetro campione col colore dello strato di sangue. Siccome a quest'ultimo s'era dato uno spessore di alcuni millimetri, così il suo colorito sarà più intenso. Si avvita quindi il tubo dell'istrumento (e per questo si assottiglia lo strato di sangue) fino a che il colore sia eguale a quello del vetro campione. Nel fare questo paragone, per avvertire anche le minime differenze che ci potessero essere, gioverà precludere la via ai raggi luminosi che non passano attraverso al vetro ed allo strato di sangue; il che si ottiene parzialmente applicando anteriormente allo istrumento il cartone annerito (annesso all'istrumento), che porta due fori, ai quali si fanno corrispondere lo strato di sangue ed il vetro-campione.

5° Quando sembra che il colore del vetro-campione e quello dello strato sanguigno siano d'uguale intensità, non si ha che a leggere sulla scala lo spessore che si è dovuto dare a quest'ultimo per ottenere quest'effetto, e

ricontrare sulla tabella la quantità di emoglobina che corrisponde al grado ottenuto.

6° Nei casi di forte anemia può darsi che la soluzione sanguigna sia così scolorata che uno spessore di 6 mill. (che è il massimo dato dall'istrumento) non basti a dare allo strato un colore eguale a quello del vetro-campione. In questo caso si scioglieranno (invece di 10) 20 mm. c. di sangue nel mezzo grammo d'acqua. Questa avvertenza vale anche per il citometro.

Di uno stesso sangue si può fare contemporaneamente l'esame citometrico e cromometrico. A questo scopo si comincia a versare in una provetta la soluzione sodica, nell'altra, l'acqua; poi si versa nell'una e nell'altra la richiesta dose di sangue; infine si passa all'esame col- l'istrumento, avendo cura:

1° Che, mentre si fa un esame, il liquido che servirà per l'altro sia coperto per impedirne l'evaporazione;

2° Che fatto un esame, l'istrumento sia ben lavato ed asciugato.

#### **Lavatura dell'istrumento.**

1° Si svita il tubo interno e lo si immerge nell'acqua in modo che in questa peschino il vetro e tutta quella parte di tubo che è bagnata di soluzione sanguigna. Non lo si deve immergere tutto, affinché l'acqua non penetri nel tubo stesso, e vada a bagnare la superficie posteriore del vetro, di cui riuscirebbe difficile l'asciugamento. Poi con un pannolino o col fazzoletto si asciuga bene tanto la superficie anteriore del vetro, quanto la vite e la parte bagnata dal tubo.

2° Colla grossa pipetta si schizzetta dell'acqua nel lume del tubo esterno, in modo da lavarne la superficie interna ed eziandio la superficie posteriore del vetro. Altra acqua si schizzetta nel semi-canale. Poi queste parti accuratamente si asciugano. Così l'istrumento è pronto per una nuova osservazione. Usando di queste precauzioni, non si bagnano che ben di rado e per sbaglio la superficie anteriore del vetro anteriore, e la posteriore del vetro posteriore; il che abbrevia di molto la pulitura dell'istrumento.

### Graduazione del citometro.

Uno dei vantaggi principali dello strumento si è questo, che la sua graduazione non poggia su di una scala arbitraria, quale sarebbe una scala colorata (HAYEM) o soluzioni colorate di diversa concentrazione (QUINCKE) o in strati di diverso spessore (MALASSEZ), ma si fonda su di un principio fisso e determinato: lo spessore dello strato della diluzione sanguigna. La quantità dell'emoglobina viene desunta dallo spessore che si deve dare a questo strato per ottenere un determinato effetto ottico: il rendere appena visibile la fiamma d'una candela. Quanto maggiore è lo spessore che si esige, tanto minore è la ricchezza emoglobinica, e viceversa.

Così stando le cose, una volta che sia conosciuto il grado che corrisponde alla media del sangue normale, è agevole dedurre il valore e la significazione di tutti gli altri. Per verità, la maggiore esattezza s'avrebbe determinando il grado citometrico di un sangue di cui s'è colt'analisi chimica constatato direttamente la ricchezza in

emoglobina, e servendosi di questo dato come di base della scala. Ma, anche attualmente, la determinazione quantitativa esatta dell'emoglobina incontra tanto gravi, per non dire insuperabili difficoltà, e, d'altra parte, la quantità di questa sostanza varia tanto anche nello stato fisiologico, ch'io ho creduto bene di limitarmi ad esaminare il sangue di buon numero di giovani sani e robusti, dedurne il grado citometrico medio, e, supponendo corrisponda a quest'ultimo una quantità di emoglobina = 100, servirmene per punto di partenza per assegnare la ricchezza in emoglobina agli altri gradi dell'istrumento.

Con questo metodo, ai gradi del citometro corrispondono delle quantità *relative* (relative alla quantità che ne possiede l'uomo sano) d'emoglobina. — Con ciò non si toglie, però, che i risultati ottenuti con esso non possano venire per l'avvenire tradotti in quantità *assolute* (in rapporto, cioè, all'unità di peso o di volume del sangue). A ciò basta che in ulteriori ricerche venga con precisione determinato qual grado segni un sangue di cui si sia conosciuto coll'analisi chimica il contenuto emoglobinico: acquistato questo dato, esso potrà essere applicato ad ottenere la quantità assoluta di emoglobina sia nelle ricerche successive, sia in quelle fatte prima che questo dato l'avesse.

Da numerose osservazioni fatte in Marzo ed Aprile in individui sani dai 20 ai 40 anni mi risultò, che il sangue normale segna in media 110 al citometro (cioè corrisponde ad uno strato sanguigno dello spessore di centodieci centesimi di millimetro). Ammesso, ora, che 110 corrisponda a 100 di emoglobina, è facile desumerne la quantità di questa corrispondente agli altri gradi. Designiamo con *g* il grado segnato dal sangue normale, con *g'*

quello del sangue in esame, con  $e$  la ricchezza in emoglobina del primo, con  $e'$  la ricchezza (ancora ignota) in emoglobina del secondo. Ammesso che il prodotto della ricchezza in emoglobina per lo spessore dello strato liquido sia una quantità costante, ossia che sussista la relazione

$$eg = e'g' \quad (*)$$

si avrà la seguente formola

$$e' = \frac{eg}{g'} \quad \dots [1].$$

Supponiamo che il sangue dell'individuo segni 180, coi dati suesposti del sangue normale la formola si tradurrà così

$$e' = \frac{100 \times 110}{180} = \frac{11000}{180} = 61.1 .$$

Il sangue, cioè, conterrà 61.1 di emoglobina.

Dalla formola [1] se ne può ricavare un'altra per sciogliere il quesito: qual numero corrisponderà ad una data quantità di emoglobina, supposto che sia conosciuto il numero che corrisponde ad una quantità parimente nota di emoglobina?

$$g' = \frac{e \times g}{e'} \quad \dots [2].$$

Supponiamo che la quantità di emoglobina sia = 50, la formola si tradurrà come segue

$$g' = \frac{100 \times 110}{50} = \frac{11000}{50} = 220 .$$

---

(\*) Questa formola si deduce dalla legge dell'assorbimento della luce, nella supposizione che la costante di assorbimento delle varie diluzioni sia direttamente proporzionale (stando pari le altre circostanze) alla ricchezza in emoglobina. (V. Mousson, *Die Physik auf der Grundlage der Erfahrung*. Bd. II, s. 472).

Il sangue, contenendo 50 di emoglobina, segnerà al citometro 220.

Si è applicando queste due formole, che sono fatte le seguenti due tabelle: in esse non sono, naturalmente, segnati i gradi che a certi intervalli; chi vorrà precisare i gradi intermedi potrà facilmente applicare la formola da sè. Nel calcolo dell'emoglobina è supposta la quantità normale =100.

TABELLA 1<sup>a</sup>

Grado del citometro	Emoglobina
110	— 100.0
120	— 91.6
130	— 84.6
140	— 78.5
150	— 73.3
160	— 68.7
170	— 64.7
180	— 61.1
190	— 57.9
200	— 55.0
210	— 52.4
220	— 50.0.

TABELLA 2<sup>a</sup>

Emoglobina	Grado del citometro
100	— 110
90	— 122
80	— 137
70	— 157
60	— 183
50	— 220
40	— 275
30	— 366
20	— 550.

Ancora più chiara la scala citometrica appare nella annessa tavola grafica. — E in questa, e nelle due tabelle risulta evidente, che un singolo grado del citometro non ha sempre lo stesso valore; quanto più si sale nella scala, tanto più il valore suo diminuisce. Infatti, mentre, p. es., il grado da 109 a 110 vale  $\frac{100}{110}$  di emoglobina,

il grado da 219 a 220 vale la metà, cioè  $\frac{100}{220}$ . Si è per questa ragione che mentre, p. es. (V. Tabella 1<sup>a</sup>) la differenza di 10 gradi citometrici fra 110 e 120 equivale a 8.4 di emoglobina, la stessa differenza fra 210 e 220 equivale soltanto a 2.4 di emoglobina. E, d'altra parte, mentre (V. Tabella 2<sup>a</sup>) la differenza di  $\frac{10}{100}$  di emoglobina, fra 100 e 90 equivale a 12 gradi citometrici, la stessa differenza di emoglobina, ma fra 30 e 20, equivale a 184 gradi dello strumento. — Un'idea più complessiva s'avrà gettando l'occhio sulla tavola grafica (V. Tav. fig. 5').

### Graduazione del cromometro.

Sullo stesso principio è graduato il cromometro. Per questo, però, il punto di partenza è dato dal rapporto suo col citometro; il quale rapporto, a sua volta, dipende dall'intensità di colorazione del vetro-campione.

Per graduare il citometro non si ha, quindi, che a trovare sperimentalmente per la prima volta, esaminando un sangue qualunque, quale grado del cromometro corrisponda al grado segnato da questo sangue al citometro. Supponendo, ad es., che il sangue segni 110 al citometro e 140 al cromometro; siccome noi sappiamo che un sangue che segna 110 al citometro contiene una quantità d'emoglobina = 100, così ne dedurremo, che il grado 140 del cromometro corrisponde del pari ad una quantità di emoglobina = 100. Avuto questo dato, applicando le formole [1] e [2] si potrà rapidamente completare la tabella.

## Errori dell'istromento.

Gli errori che si connettono alle osservazioni fatte col cromocitometro si dividono in due classi: in quelli comuni a tutti gli stromenti finora usati per l'esame del sangue, e in quelli proprii del mio. Tratterò degli uni e degli altri.

### a) Errori comuni a tutti gli stromenti.

1° *Errori nel fare le diluzioni di sangue.* Per quanto si cerchi di esser precisi nel misurare le quantità di sangue e di soluzioni che devono essere mescolate fra loro, si ha generalmente qualche variazione che non di rado è avvertita dall'istromento. Gli errori possono dipendere da varie cause: dall'aver lasciato evaporare un po' la goccia di sangue onde si fece uso, dall'altezza che si dà alla colonna liquida, dall'aver adoperato p. es. non abbastanza asciutta la pipetta misuratrice del sangue. La dimostrazione di questi errori io l'ho fatta pungendo un punto della pelle, ed esaminando successivamente due o più prese del sangue che ne esce; oppure esaminando successivamente diverse prese tolte ad una certa quantità di sangue defibrinato. Nel primo caso gli errori sogliono essere piccoli, come dimostrano i seguenti esempi, in cui riferisco le medie ottenute da 4 determinazioni citometriche per ciascuna presa

	Uomo di 33 anni	Uomo di 32 anni	Coniglio
1 <sup>a</sup> presa	122	122	131
2 <sup>a</sup> presa	121	119	133.

Nel 2° caso gli errori sogliono essere maggiori, ed io credo che la ragione sia la seguente: nel sangue in riposo i globuli, tendendo a precipitare al fondo, si distribuiscono in diverso numero nei vari strati del liquido; ora, anche agitando accuratamente quest'ultimo, è difficile ridurlo sufficientemente omogeneo; sicchè tra una presa e l'altra di sangue possono occorrere errori di parecchi gradi. Naturalmente gli errori sono minori quando il sangue è stato più a lungo rimescolato. Di ciò si deve tener conto quando si voglia determinare l'esattezza dell'istromento facendo successive determinazioni di una stessa qualità di sangue.

2° *Errori dipendenti da modificazioni del sangue estratto.*

La quantità di emoglobina nel sangue estratto di uno stesso individuo può variare a seconda del punto da cui venne estratto il sangue, e a seconda del modo con cui venne estratto. Per quanto spetta al 1° caso trascrivo qui parte di una tabella data da LEICHTENSTERN, nella quale vengono dati i *coefficienti di estinzione* del sangue di varie parti (diluito ad  $\frac{1}{100}$ ) esaminato col metodo spettroscopico di VIERORDT.

Polpa del medio della mano sinistra . . . . .	1, 2007
» del mignolo » » destra . . . . .	1, 1601
Punta del dito grosso del piede sinistro . . .	1, 2076
Punta del 5° dito del piede destro . . . . .	1, 1373
Regione sopraspinata destra . . . . .	1, 2252.

Come si vede, le differenze sono abbastanza notevoli. E più notevoli ancora vennero osservate da LEICHTENSTERN in altre regioni del corpo dello stesso individuo; p. es. la parte esterna del braccio sinistro dava 1, 0934, la nuca, invece, 1, 2578; il che egli attribuisce all'aver dovuto in

alcune parti della pelle comprimerla fortemente, od applicarvi una ventosa, affine di ottenerne la necessaria quantità di sangue.

Nelle mie ricerche ho trovato io pure che, quando si deve comprimere molto per far uscire la goccia di sangue, questo appare spesso al citometro meno ricco di emoglobina che nel caso opposto; probabilmente perchè la pressione fa escire insieme ad esso anche una variabile quantità di linfa. È quindi precetto di fare colla lancetta l'incisione della pelle di tal modo, che la goccia di sangue, dopo 10 o 15 secondi, esca spontaneamente dalla ferita, o, al più, richieda una leggerissima compressione. — Queste incisioni, del resto, non sono più dolorose di una puntura di spillo, non offrono alcun pericolo, e non passano mai a suppurazione. Io ne ho potuto far la prova in larga scala su me e sugli altri, anche d'inverno, nella stagione, cioè, in cui i tagli più stentano a guarire.

3° *Errori dipendenti dall'occhio (stanchezza).* L'occhio, in queste osservazioni, si stanca più presto di quello che comunemente si creda. E questo fatto appare, non tanto pel senso di stanchezza che prova l'osservatore, quanto per gli errori, pei salti strani, altrimenti inesplicabili, che si verificano nei risultati di successive osservazioni. Appena ciò si avverta, sarà bene cessare dal lavoro. — Anche durante un'unica determinazione citometrica, quando si tratta di determinare se i contorni della fiamma sono o no distinti, è utile chiudere per qualche secondo l'occhio, in modo che, al riaprirlo, esso sia riposato, e però più sensibile alle impressioni luminose.

## b) Errori propri del citometro.

1° Siccome i globuli sanguigni, per la prova citometrica, stanno soltanto in sospensione nella soluzione sodica, così si potrebbe credere che essi, tendendo rapidamente a cadere al fondo, debbano alterare la precisione dell'istrumento. Questa obbiezione avrebbe valore ove l'esame citometrico durasse lungo tempo; invece, una singola determinazione non richiede che pochi secondi. Sicchè il precipitare dei globuli non ci può esercitare influenza alcuna. Ciò, del resto, viene confermato anche dall'osservazione diretta; infatti, è necessario continuare per parecchi minuti l'osservazione collo stesso strato di sangue lasciato in perfetto riposo nel recipiente dell'istrumento per vederne variare il valore citometrico.

Del precipitare dei globuli, invece, va tenuto conto quando (come si dovrebbe sempre fare), della sospensione ottenuta col sangue di un individuo, si vogliono fare successivamente due o più determinazioni, onde stabilirne la media. In questo caso, dopo ogni determinazione si verserà il liquido già adoperato nella provetta, e non lo si adopererà di nuovo che dopo averlo ben agitato col rimescolatore.

2° Non è ancora dimostrato che nelle diverse malattie, o nei diversi individui, i globuli rossi si comportino tutti allo stesso modo nelle soluzioni di una stessa concentrazione. Potrebbe darsi, che in dati casi vi si raggrinzassero o gonfiassero più che non in altri; e si potrebbe supporre, che questa diversità della forma che essi assumono valesse ad alterare l'esattezza del citometro. Se p. es. i globuli dei clorotici si raggrinzassero più che i globuli normali, e questo cambiamento di forma aumentasse o diminuisse

la facoltà che posseggono di riflettere o trattenere la luce, il grado citometrico da essi dato non corrisponderebbe con precisione alla quantità in cui essi si trovano nel sangue; poichè il grado citometrico viene calcolato nei globuli *normali*.

A fine di determinare il valore di questa eventuale obiezione, io determinai di esagerare quelle condizioni in cui potrebbero trovarsi i globuli di un sangue supposto anormale nel senso sopradetto, e di studiare se ciò valesse ad alterare il risultato della determinazione. A questo fine esaminai uno stesso sangue in soluzioni di cloruro sodico di diversa concentrazione; naturalmente i globuli nelle soluzioni più concentrate erano assai più raggrinzati e spinosi che nelle meno; e, quindi, si avevano qui in grado esagerato quelle alterazioni che si supposero possibili in un sangue malato. Ecco alcuni degli esperimenti fatti tutti col sangue diluito in 50 parti di soluzione:

## I.

*Sangue defibrinato di vitello.*

Soluzione 0.75 ‰			Soluzione 1 ‰		
1 <sup>a</sup> presa	{ 120 121	} Media 119	1 <sup>a</sup> presa	{ 120 123	} Media 123.
2 <sup>a</sup> presa	{ 117 119		2 <sup>a</sup> presa	{ 124 124	

## II.

*Sangue umano ottenuto per puntura.*

Soluzione 0.75 ‰		Soluzione 2 ‰	
140	} Media 139	155	} Media 153.
139		152	
138		152	
141			

*Sangue di altro individuo.*

Soluzione 0.75 ‰

118	} Media
118	
120	

Soluzione 2 ‰

125	} Media
126	
127	

Appare da queste prove, che anche quando la differenza di forma dei globuli è assai grande, il risultato delle determinazioni citometriche varia, ma di poco: di una quantità veramente trascurabile quando si considerino gli errori inerenti ad ogni metodo di determinazione dell'emoglobina, e le variazioni continue di quest'ultima nello stesso individuo.

3° Generalmente nel sangue la quantità dei globuli bianchi di fronte a quella dei rossi è così scarsa, ch'essa, nelle determinazioni fotometriche, può essere trascurata. Nella leucemia e nelle leucocitosi di un certo grado, invece, essa aumenta di tanto, da influenzare sensibilmente i dati forniti dagli strumenti. LEICHTENSTERN ha già dato la dimostrazione di questa influenza nel dosaggio spettroscopico dell'emoglobina. Lo stesso deve succedere nelle determinazioni per mezzo del citometro, in quanto che in tali casi la luce che passa attraverso allo strato sanguigno è arrestata non soltanto dai globuli rossi, ma sì ancora dai numerosi leucociti che vi stanno sospesi; di conseguenza l'istrumento segna una quantità di globuli rossi superiore alla reale. È facile accertarsene facendo artificialmente delle miscele di sangue e di pus, come nel seguente esperimento, in cui nella solita quantità di cloruro sodico venne diluita non soltanto la solita quantità di sangue defibrinato di coniglio, ma eziandio eguale

quantità di pus proveniente da un ascesso della mammella:

<i>Sangue defibrinato solo</i>	<i>Pus solo</i>	<i>Sangue e pus a parti uguali</i>
142	358	100.

Appare da questo esperimento, che l'aggiunta del pus ha fatto scendere il grado citometrico da 142 a 100; o, con altre parole, ha reso il sangue *apparentemente* più ricco di globuli rossi. — In questo caso ho voluto determinare a quale grado di leucemia avessi ridotto il sangue. Coll'oculare quadrettato feci due numerazioni di parecchie centinaia di globuli per constatare il rapporto fra globuli bianchi e rossi; nella prima il rapporto risultò 1:6.73; nella seconda 1:6.09; corrispondente quindi ad un grado abbastanza elevato di leucemia.

Questo sperimento mi servi anche a confermare la esattezza delle determinazioni ottenute col citometro. Infatti, supposto che un sangue che segna 142 contenga 5.000.000 di globuli, un pus che (come il suesposto) segna 358 corrisponde a seconda della formola [1] ad un sangue che contenga 1,984,000 globuli. Se ora, imitando quanto abbiamo fatto nell'esperimento, aggiungiamo questo numero di globuli ai 5 milioni, avremo 6,984,000 globuli, i quali, diluiti nella solita quantità di cloruro sodico, dovrebbero, secondo la formola [2], segnare al citometro all'incirca 102. Ora, sperimentalmente, la miscela di sangue e pus segnò 100; dando così un errore di appena 2 %.

Un'influenza eguale a quella dei globuli bianchi esercitano le goccioline adipose sospese nel plasma nei rari casi di lipemia dell'uomo. Ciò si può provare sperimental-

mente aggiungendo al sangue del latte; così, mentre un sangue defibrinato di agnello segnava 155 in media, allorchè nel grammo di cloruro sodico oltre ai soliti 20 mm. c. di sangue vennero sospesi altrettanti mill. cubi di latte di eccellente qualità, segnò 139.

Nullameno, come già feci osservare, gli errori cui il citometro darebbe luogo nella leucemia e nella lipemia vengono avvertiti dal paragone coi dati forniti dal cromometro. Quando nel sangue non sono copiosi nè i globuli bianchi, nè le goccioline adipose, le soluzioni che si fanno del sangue stesso nell'acqua per l'esame cromometrico riescono trasparenti; e forniscono dati corrispondenti a quelli del citometro. Nella leucemia e nella lipemia, invece, le soluzioni riescono torbide per i leucociti o le goccioline adipose che, indisciolte, vi rimangono sospese; ed il sangue al cromometro risulta più povero di emoglobina. — Aggiungendo alla soluzione una minima quantità di soluzione di potassa caustica, se si tratta di leucemia l'intorbidamento scompare, perchè i leucociti si sciolgono; mentre se v'ha lipemia l'intorbidamento perdura. L'aggiunta della potassa, perciò, ci permette di distinguere fra leucemia e lipemia. Ed, oltracciò, rende più esatto anche il risultato cromometrico; poichè, quando la soluzione è torbida, appare più colorata, e, di conseguenza, le si attribuisce un grado cromometrico superiore di alquanto al vero.

Questa inesattezza venne notata anche dal LEICHTENSTERN nell'esame spettroscopico e da lui corretta parimente coll'aggiunta della potassa (1).

È agevole comprendere, che quanto maggiore è il nu-

---

(1) L. c., pag. 21.

mero dei globuli bianchi e delle goccioline adipose nel sangue, tanto maggiore sarà la differenza fra i risultati dati dal citometro e quelli forniti dal cromometro. Sicchè dalla misura di questa differenza si potrà desumere il grado di alterazione del sangue. — Riassumendo, senza il microscopio, noi possiamo, controllando il citometro col cromometro, ed aggiungendo la potassa, determinare quando esista leucemia o lipemia, precisare se si tratti dell'una o dell'altra, e, fino ad un certo punto, anche determinarne il grado.

4° Già dissi come, adottando per le determinazioni citometriche la luce artificiale, si sfugga a tutte le cause d'inesattezza dipendenti dalle variazioni infinite della luce naturale, sieno esse dipendenti dallo stato del cielo, dall'esposizione, dall'ampiezza delle finestre, e via dicendo; e come, adottando, fra le diverse fonti di luce artificiale, la fiamma di una candela stearica, s'abbia un termine di confronto facile ad aversi dappertutto, e non soggetto a variar tanto di intensità quanto le fiamme di gas, olio e petrolio. Tuttavia, anche fra le candele steariche v'hanno diversità dipendenti specialmente dalla fabbrica e dalla qualità. Ora, queste differenze possono esercitare influenza sui risultati citometrici? E se sì, son desse tali da render necessarie speciali cautele per avvertirle e tenerne il dovuto calcolo? A questo riguardo io esaminai le candele delle fabbriche dei Fratelli Lanza di Torino e di C. Veratti e C. di Milano. I risultati che ne ottenni mi parve bastassero ad esonerarmi da ulteriori prove; ecco due determinazioni fatte colla stessa diluizione di sangue, ma con candele di diversa qualità; la fiamma della candela di qualità inferiore, benchè lucente, aveva un color giallognolo.

*Candela di qualità superiore*

142

143

144

*Candela di bassa qualità*

142

144

143.

Come si vede, fra l'una e l'altra non v'ha differenza di risultati. Il che ho comprovato anche mettendo le due candele ad un decimetro l'una dall'altra, e guardandole contemporaneamente collo strumento; le due fiamme cominciarono a comparire al tempo stesso, e, variando lo spessore dello strato sanguigno, presentavano le stesse modificazioni nel loro aspetto.

Quand'anche si supponga che in altre candele possa variare in maggior misura la qualità della fiamma, da quanto ho veduto, non si può credere che ciò possa influire apprezzabilmente sui risultati citometrici. Ne' miei studi io usai di un tipo di candela stearica che consumava gr. 9.410 all'ora.

Piuttosto devesi aver riguardo a ciò, che la fiamma sia regolare, smoccolando di tanto in tanto la punta carbonizzata del lucignolo; ed, inoltre, ch'essa sia immobile, poichè una fiamma oscillante rende incerta l'osservazione. Per un certo tempo io ho usato circondare la fiamma con un tubo di cartone aperto solo dalla parte rivolta verso l'osservatore, e atto a regolare l'afflusso dell'aria alla fiamma ed a sottrarla alle correnti; ma poi l'ho lasciato per non aggiungere alla citometria una complicazione che mi si dimostrò superflua, essendo facile ottenere, colla chiusura degli usci e con altri mezzi comuni, la calma dell'aria dell'ambiente entro cui si fa l'osservazione. Siccome la parte libera del lucignolo è sempre curva, così la fiamma delle steariche non è conica, ma appiattita.

Ha due superficie più larghe e due meno. Ritengo utile far notare, che nelle mie osservazioni ho sempre usato della superficie larga della fiamma, perchè in questa riesce più esatto lo studio dei contorni.

5° Per ultimo devesi notare che, se la soluzione sodica entro cui si sospende il sangue ne rallenta, non ne impedisce la coagulazione, la quale sopravviene dopo  $\frac{3}{4}$  d'ora, 1 ora e più secondo i casi. L'esame citometrico dovrà esser fatto prima della coagulazione, poichè, se fatto dopo, il grado citometrico riesce sempre più alto, trovandosi molti globuli imprigionati dai coaguli fibrinosi.

#### **Grado di esattezza dello strumento.**

Ho provato l'esattezza dello strumento in doppio modo : 1° esaminando successivamente parecchie volte una stessa diluzione sanguigna; 2° allungando un dato sangue con diverse determinate quantità di un liquido indifferente, in modo da ottenere dei sangui rappresentanti diversi e determinati gradi di oligocitemia; poi, determinato collo strumento il contenuto emoglobinico di ciascuno di essi, confrontando i risultati ottenuti sperimentalmente per questa via coi titoli delle diluzioni primitive, e determinando, così, la grandezza degli errori.

Che degli errori ci debbano essere, nessuno può dubitare. Quando noi stabiliamo come termine di paragone la nettezza a cui ci appaiono gli orli della fiamma di una candela, ci assoggettiamo a tutti gli errori che sono propri delle prove fotometriche. Tra l'apparire netti o sfumati non c'è salto brusco, ma sì un passaggio gra-

duato, che trova la sua espressione in un errore di qualche grado dell'istromento; un contorno che può apparir netto in una osservazione, non sembra più tale in un'altra; tale osservatore può accontentarsi di una nettezza, che non soddisfa ad un altro. Si intende da sè, che chi non ha normale la accomodazione deve pensare a correggersela, chè non può pretendere di vedere la fiamma nell'istromento chi non la può vedere ad occhio nudo.

Preoccupato da questi errori di cui ignoravo la gravità, escogitai, per porvi riparo, parecchie aggiunte o modificazioni all'istromento. Affine di avere un termine fisso di paragone per la nettezza della fiamma applicai a lato dell'istromento un vetro smerigliato colorato in rossigno, il quale mi lasciava scorgere la fiamma a contorni appena spiccati, e cercava, nelle determinazioni citometriche, di ridurre la nettezza di contorno della fiamma, veduta attraverso allo strato sanguigno, eguale a quella della fiamma veduta attraverso al vetro smerigliato. — In un'altra serie di esperienze invece di prendere per termine di confronto la fiamma, ideai di sostituirle uno scritto a caratteri di determinata grandezza e grossezza, da leggersi attraverso allo strato sanguigno ad una determinata distanza dalla fiamma della candela. — Ed avrei continuato a modificare il metodo, se l'esperienza non mi avesse dimostrato, che era fatica inutile, e che coll'esame diretto della fiamma i limiti d'errore sono più vicini fra loro che quelli dipendenti dalle altre cause sopramenzionate e comuni a tutti gli strumenti misuratori dell'emoglobina.

A questo riguardo devo notare, che fu appunto un esame comparato della grandezza degli errori dipendenti dai diversi apprezzamenti della nettezza con cui si vede

la fiamma che mi decise ad adottare come termine di paragone il *primo apparire della nettezza de' suoi contorni nei suoi tre quarti superiori*. Io avrei potuto scegliere il primo apparire nel campo dell'istrumento di una *macchia splendente* indicante la fiamma; oppure la limitazione netta di tutta la fiamma e via dicendo. Ma mi sono persuaso, che questi termini di paragone ammettono, per lo stesso occhio, de' limiti di errori più ampi di quelli dati dal termine di paragone da me definitivamente proposto.

Allorchè, per studiare l'esattezza dello strumento, si adopera del sangue defibrinato, è da ricordare, che i globuli rossi nel siero tendono sempre a precipitare. È quindi necessario, prima di aspirare colla pipetta la voluta quantità di sangue, di rimescolare il liquido; e, notiamo, di rimescolarlo molto accuratamente, perchè altrimenti i diversi strati liquidi contengono globuli in varia misura, e danno luogo, di conseguenza, in successivi esami a risultati citometrici discordanti fra loro. Parimente quando si vuol esaminare il sangue di un animale, lo si faccia mentre è ancor vivo; poichè, fermatasi la circolazione, i globuli precipitano nelle parti più declivi dei vasi; sicchè i risultati citometrici variano tante volte quanti sono i vasi da cui vennero tolte le singole prove di sangue.

Ciò premesso, ecco un esempio (preso a caso fra i moltissimi che conservo) dei risultati dati in dieci successive determinazioni da una stessa diluzione di sangue di vitello (diluzione ad  $\frac{1}{50}$  in soluzione 0.75 % di cloruro sodico).

160	}	Media
156		
160		
158		
157		
160		
159		
160		
158		
159		
		158,7 .

1.587.

Supponendo che la media 158,7 corrisponda ad una quantità d'emoglobina = 100, i due numeri massimo e minimo 160 e 156 corrisponderebbero, secondo la formula [1], il primo ad una quantità di emoglobina = 99.2, il secondo = 101.7; avremmo quindi avuto un errore in meno di 0.8 %, un errore in più di 1.7 % (\*).

(\*) Secondo la teoria degli errori, l'errore medio di ciascuna osservazione sarebbe in gradi del citometro eguale a 1.45; ossia 0.9 % all'incirca; e l'errore del valore medio sarebbe 0.46; ossia 0.3 % all'incirca. Nella tabella riferita qui sotto sono indicate nella 1<sup>a</sup> colonna i valori osservati al citometro, nella 2<sup>a</sup> le differenze fra il valor medio e i singoli valori desunti dalle osservazioni, e nella 3<sup>a</sup> i quadrati di queste differenze.

	$\delta$	$\delta^2$
160	+ 1	1
156	- 3	9
160	+ 1	1
158	- 1	1
157	- 2	4
160	+ 1	1
159	0	0
160	+ 1	1
158	- 1	1
159	0	0
1587		$\Sigma \delta^2 = 19 .$

L'errore medio di ciascuna osservazione, come risulta da questa

Ecco, invece, i risultati ottenuti diluendo una stessa qualità di sangue defibrinato con diverse quantità determinate di siero artificiale di MALASSEZ, in modo da ottenerne parecchie qualità di sangue a *diverso e ben precisato* contenuto di emoglobina. Da ognuna di queste qualità si estraeva la solita quantità, che veniva metodicamente sospesa nella soluzione di cloruro sodico: per ognuna di esse si fecero due determinazioni, di cui io non riferisco qui che la media. Aggiungo qui sotto: 1° il valore emoglobinico di ogni sangue quale deriva dalla proporzione in cui venne fatta la miscela, supponendo il valore del sangue puro = 100; 2° il valore emoglobinico ottenuto sperimentalmente, deducendolo colla formula [I] dai numeri medi avuti nelle successive determinazioni.

	Sangue puro	Sangue 9 Siero 1	Sangue 8 Siero 2	Sangue 7 Siero 3	Sangue 6 Siero 4	Sangue 5 Siero 5
Grado citometrico	135	149	166	198	229	280
Emoglob. secondo la titolazione	100	90.0	80.0	70.0	60.0	50.0
Emoglob. secondo la determinazione citometrica	100	90.9	81.3	68.2	59.2	48.3

tabella, è quindi eguale a  $\sqrt{\frac{19}{9}} = \sqrt{2,1111} = 1,4530$ ; ossia calcolando per cento = 0.914. L'errore del medio valore sarebbe poi  $= \sqrt{\frac{19}{10.9}} = 0,4595$ , ossia 0,3 %.

Io ho fatto parecchi di questi esperimenti, ed ho ottenuto risultati consimili. Gli errori sono sempre un po' maggiori di quelli in cui si incorre facendo successive determinazioni di una stessa quantità di sangue. Il che dimostra che l'aumento d'errore è imputabile, non già all'esattezza dello strumento, ma ad altre cause; e specialmente: alla difficoltà di ridurre omogeneo il sangue che s'adopera per l'esperimento, ed alle inesattezze inevitabili nella misurazione del sangue e della soluzione sodica che s'adopera per la diluzione.

Da taluno si potrebbe sospettare che uno stesso sangue possa segnare un diverso grado citometrico quando venga esaminato a diverse ore di distanza; poichè, dipendendo la determinazione del grado dal concetto che in quel dato momento l'osservatore si fa della *nettezza* dei contorni del termine di confronto (fiamma della candela), nulla ripugna ad ammettere che questo concetto possa variare da un momento all'altro. — Il precisare la esistenza ed eventualmente, la gravità di questa possibile fonte d'errore non è facile, poichè se si adopera per l'esame del sangue defibrinato, si sa che la costituzione di questo si altera da un giorno all'altro, se si adopera il sangue d'un animale vivente, si trova un ostacolo nelle variazioni continue a cui il suo sangue è soggetto nei diversi periodi della giornata. Io ho dovuto, perciò, accontentarmi di confrontare le determinazioni della mattina con quelle della sera, in un sangue tenuto al fresco nella stagione invernale, in modo d'impedirne, possibilmente, la decomposizione. Un sangue di bue mi diede (in media) alla mattina 120, alla sera 119; un sangue di vacca anemica mi diede alla mattina 169, alla sera 167. Come da queste cifre appare, c'è una leggerissima differenza; e

nemmeno questa differenza la possiamo senz'altro ascrivere alla supposta causa sovraccennata, perchè anche qui si hanno, come fonti d'errore, le mancanze d'omogeneità del sangue, le inesattezze di misurazione, ecc.

### III.

#### CONCLUSIONI

Dalla relazione fin qui esposta de' miei studi sul cromocitometro si può comprendere facilmente per quali ragioni io preferisca questo strumento agli altri che vennero finora proposti per la determinazione dell'emoglobina del sangue. È da preferire nelle ricerche sull'uomo e in molte sugli animali ai metodi di HOPPE-SEYLER, MÜLLER, PREYER e QUINCKE perchè richiede una minima quantità di sangue, e non esige una soluzione di emoglobina previamente titolata di confronto. È preferibile ai metodi di HAYEM e di MALASSEZ, perchè è assai più preciso. — La parte cromometrica del mio strumento è a un dipresso fondata sullo stesso principio di cui usò MALASSEZ; e, come s'è veduto, io non la adopero che come controllo nei casi di leucemia e lipemia, perchè dà risultati assai meno esatti della parte citometrica.

Io ho posto a confronto il mio strumento coi due succitati, che io mi sono procurato dai fabbricatori primitivi di Parigi, e che ho, quindi, tutta la ragione di credere fabbricati secondo le intenzioni e le indicazioni dei rispettivi inventori. L'istrumento di HAYEM fu quello che mi diede gli errori più notevoli; ad onta che io cercassi di usarlo nelle più svariate condizioni della luce diurna, s'osservava sempre una differenza più o meno grande fra

il tono della soluzione sanguigna e quello delle tinte di confronto. Ora, ognuno sa quanto sia difficile ottenere anche approssimativamente il rapporto fra il valore di due tinte quando ne sia differente il tono.

I risultati del cromometro di MALASSEZ furono migliori; ma, ad onta di ciò, i suoi errori superano generalmente del doppio e del triplo quelli del mio citometro. Anche in esso il colore di confronto non è perfetto; il picrocarminato ha una tinta più gialla della soluzione sanguigna. Sotto questo punto di vista la parte cromometrica del mio strumento è già più perfetta, perchè colorata direttamente coll'ossiemoglobina. — Inoltre il cromometro di MALASSEZ, in confronto col mio, ha gli svantaggi, che va pure soggetto alquanto all'influenza delle variazioni della luce diurna; ha una pipetta graduata facile a guastarsi e relativamente di difficile maneggio; non può servire a luce artificiale, è più voluminoso e costoso.

Resterebbe il metodo spettroscopico di VIERORDT, che viene considerato come esattissimo, e che esige piccolissima quantità di sangue. Riguardo ad esso, però, osservo, che per metterlo in pratica è necessario di possedere uno spettroscopio munito di speciali modificazioni e di saperlo adoperare; il che impedirà certamente che si diffonda fra i medici pratici. Inoltre, se considero alcuni dati forniti da LEICHTENSTERN (1), che pure è grande sostenitore di questo metodo, non trovo che la sua esattezza, tutto considerato, lo raccomandi a preferenza del mio. Infatti, esaminando parecchie volte successivamente una stessa soluzione del proprio sangue, LEICHTENSTERN ottenne i

---

(1) L. c., pag. 19.

corrispondenti coefficienti di estinzione i cui estremi variano fra 1.4378 e 1.4943 e con una media di 1.4711; ebbe quindi un errore massimo, di 2.3 %.

Io spero che il cromo-citometro, anche pel suo poco prezzo e pel facile maneggio, incontrerà favore non solo nelle ricerche scientifiche, ma anche presso i medici pratici. Quando si consideri su quali criteri questi ultimi siano attualmente costretti a fondarsi per diagnosticare le anemie, non deve far meraviglia la speranza, che debba riuscire accetto un istrumento che, con così poco disturbo, permette di constatare l'esistenza dell'oligocitemia, di determinarne il grado, e di tener dietro con esattezza alle modificazioni cui soggiace nel decorso della malattia, e sotto l'influenza della cura. Una serie di ricerche in questo indirizzo si sta ora facendo da uno dei frequentatori del mio laboratorio, il Dott. I. FENOGLIO, a cui debbo cordiali ringraziamenti per lo zelo con cui mi ha assistito ne' miei studi sul citometro.

Anche in ricerche molto delicate il citometro ha corrisposto alla mia aspettativa. In un lavoro sperimentale che, in unione al mio Assistente D. SALVIOLI, sto compiendo sull'anemia, abbiamo potuto constatare (contro quanto si assevera da altri) che la quantità procentuale di emoglobina diminuisce anche quando la sottrazione sanguigna praticata non arriva che all'1 o al 2 % del peso dell'animale. Con un metodo meno esatto non avremmo certamente potuto accertare l'esistenza di variazioni così leggiere della quantità dell'emoglobina.

**Spiegazione delle figure.**

- Fig. 1<sup>a</sup>* Diverse parti del citometro: *ab* tubo esterno, munito del recipiente *r* in cui si versa la diluzione sanguigna, e fissato sul manico *m* che porta un foro *y* destinato a fissarsi la lastra del vetro-campione pel cromometro (fig. 3<sup>a</sup>).
- Fig. 2<sup>a</sup>* I due tubi dell'istrumento immaginati in sezione verticale. Le lettere corrispondono a quelle della figura antecedente. I vetri che limitano lo strato sanguigno sono segnati con *z* e *z'*.
- Fig. 3<sup>a</sup>* Lamina metallica che porta in *f* il vetro colorato campione per l'esame cromometrico.
- Fig. 4<sup>a</sup>* Cromocitometro visto dall'alto. Lettere come nelle figure antecedenti.
- Fig. 5<sup>a</sup>* Tavola grafica dei valori del citometro. I numeri in serie verticale indicano le diverse quantità di emoglobina, ammessa la qualità normale = 100. — I numeri in serie orizzontale indicano i gradi del citometro.

2751



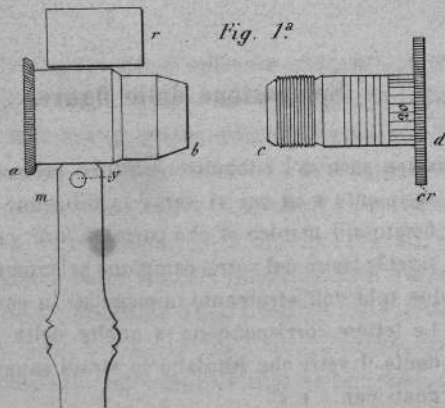


Fig. 1ª

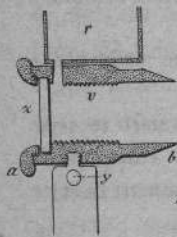


Fig. 2ª

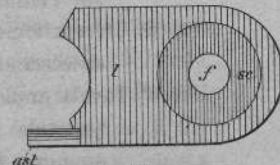
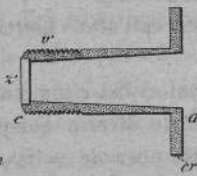


Fig. 3ª

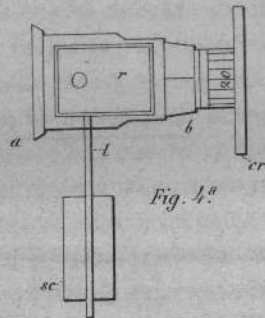


Fig. 4ª

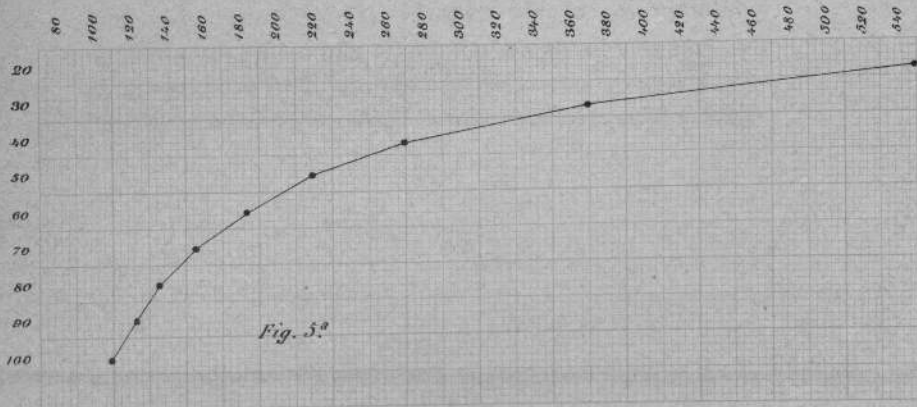


Fig. 5ª



