



Istituto d'Igiene *Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma*  
(Nuova Serie) fasc. III.

Pisa

# RICERCHE BATTERIOLOGICHE

NELLA DEGENERAZIONE AMILOIDEA

## DELLA CONGIUNTIVA UMANA

PER IL

DOTT. GIACOMO KRUCH



Estratto dagli *Annali dell'Istituto d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma*  
Vol. IV (Nuova Serie) fasc. III

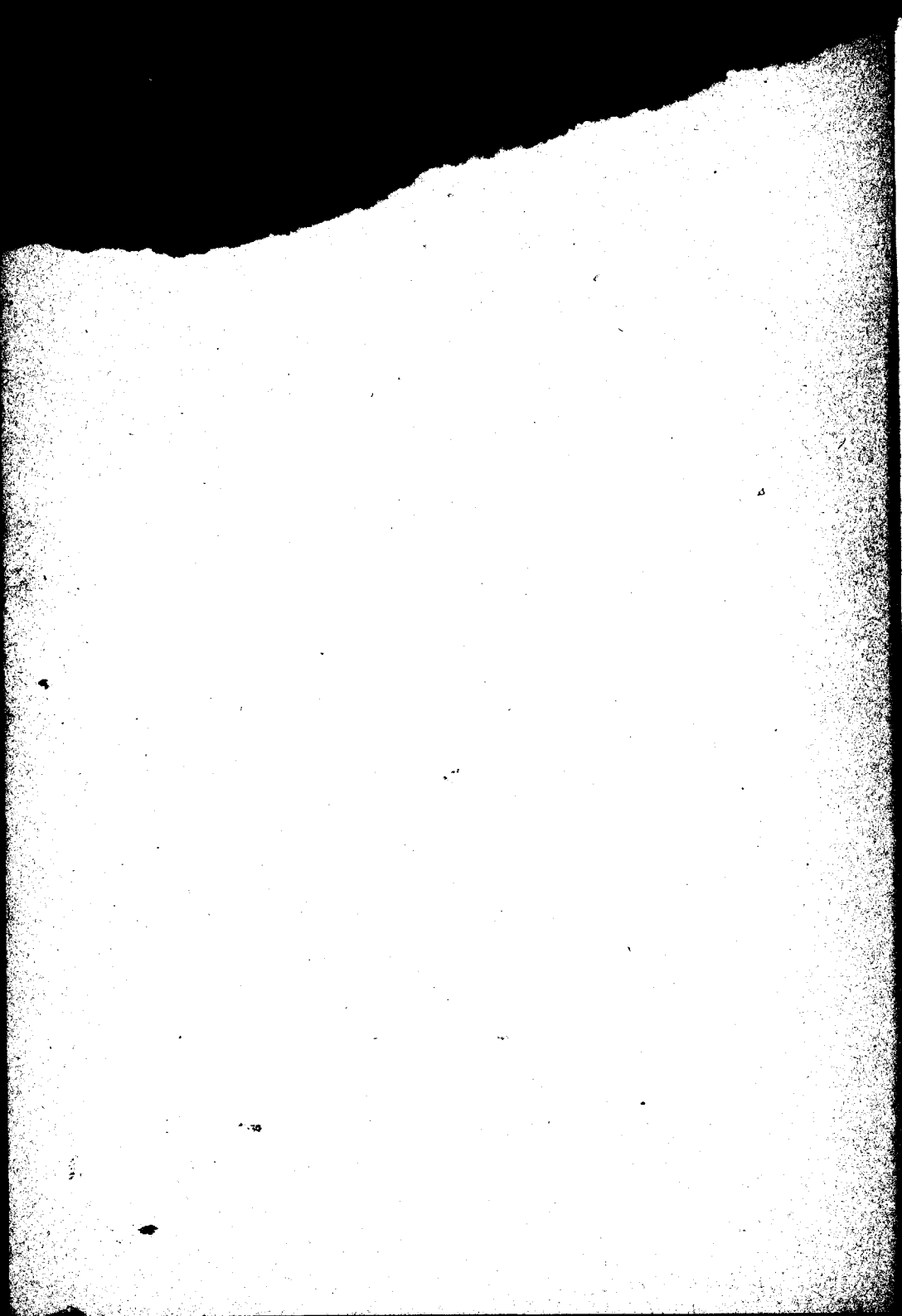


ROMA

ERMANNO LOESCHER & C.<sup>o</sup>

Via del Corso, 307

1894



Istituto d'igiene sperimentale della R. Università di Pisa

## RICERCHE BATTERIOLOGICHE

NELLA DEGENERAZIONE AMILOIDEA DELLA CONGIUNTIVA UMANA

PER

di **il dott. GIACOMO KRUCH**



La opportunità di fare le ricerche, oggetto di questa nota, mi venne offerta nello scorso anno 1893, da una malata degente nella clinica oftalmoiatrica, diretta dal prof. Manfredi, il quale diede a me ed al collega D. A. Fumagalli il materiale per uno studio clinico e anatomo-patologico di contribuzione alla conoscenza di una forma morbosa, tanto raramente osservata, specialmente in Italia, dove il nostro rappresenterebbe il quarto caso, salvo errore. Tale studio è pubblicato indipendentemente da questa nota, che si riferisce solo all'esame batteriologico da me eseguito.

Ho creduto di non poco interesse studiare il caso da tale punto di vista, essendo che non trovo fatto cenno alcuno di simili tentativi di studi nella letteratura, già abbastanza numerosa, specie di quest'ultimo decennio.

È risaputo in qual modo strano ci si presenta questa forma morbosa tanto rara. Essa si localizza quasi sempre nei tessuti della palpebra, esclusa la cute, e comprende tutt'al più nel processo degenerativo la congiuntiva ed il tessuto sottocongiuntivale del bulbo oculare, e più raramente ancora gli strati superficiali della cornea; tiene un decorso cronico, nè mai si complica a fatti infiammatori acuti; solo talvolta si accompagna o sussegue alla congiuntivite traumatica, che ne rappresenta, secondo alcuni, la causa.

Non avendo io trovato, nella nostra ammalata, traccia alcuna di fatti generali nè locali, invocati dai diversi patologi come momenti etiologici della degenerazione amiloide, e, punto soddisfatto delle



ipotesi messe in campo per spiegare questa forma morbosa, mi venne il sospetto trattarsi di una forma infettiva locale. E confortato in questo sospetto dal fatto, ormai con certezza stabilito, della presenza, nel cul di sacco congiuntivale, di numerose e varie forme di microrganismi anche patogeni, istituii le mie ricerche.

Trovo inutile di qui riferire dettagliatamente i risultati delle osservazioni microscopiche fatte in collaborazione del mio collega. Mi limiterò a citare qualche fatto che abbia relazione colle mie speciali ricerche batteriologiche.

Dalla paziente presentatasi alle nostre cure abbiamo levato dei pezzetti di tessuto degenerato mediante incisioni della superficie cutanea praticate in diverse sedute, e questo materiale raccolto servì in parte per l'esame batteriologico, in parte per l'esame anatomico. Durante gli atti operativi, noto qui per incidente, dopo la disinfezione della superficie cutanea, corrispondente al campo operatorio, con sapone al sublimato corrosivo e una soluzione di sublimato corrosivo all' 1 : 4000, per le lavande si fece uso di acqua distillata e di cotone idrofilo asettico; di più, gli strumenti, sterilizzati previamente con alcool assoluto, furono poi immersi in un bagno d'acqua distillata e sterilizzata.

Nelle mie ricerche usai i metodi indicati dalla tecnica batteriologica: culture in agar, in gelatina, in brodo, ecc., con risultati però un po' diversi. Il metodo migliore che devo consigliare per queste osservazioni è la cultura in agar glicerinato (3 per cento) o in siero di sangue a piano inclinato, innesto per strisciamento, così come venne indicato da Roux e Jersin per l'isolamento del bacillo della difterite, adoprando per materiale d'innesto la parte di tumore non completamente degenerata, pestandola prima finemente in un bicchiere con un bastoncino di vetro accuratamente sterilizzati.

Le culture in gelatina furono lasciate alla temperatura di 18°-22° e le altre nel termostato a 37°.

Già dopo 24 ore nelle culture in siero di sangue si svilupparono rigogliose colonie, rotonde, di aspetto biancastro, abbastanza grandi; fra queste altre colonie, appena visibili a occhio nudo, trasparenti, che non raggiunsero mai la grandezza delle prime.

Anche nelle culture in agar glicerinato si ebbe sviluppo rapido della prima categoria di colonie, ma lo sviluppo delle colonie piccole si fece assai più lentamente, impiegando cinque giorni a rendersi distinta la presenza loro.

Nelle culture in gelatina a piatto, fatte prima direttamente con materiale tolto dalla neoplasia, e dopo, con trasporti dalle culture

in brodo glicerinato, si ebbe lo sviluppo di colonie identiche a quelle grandi osservate nelle culture per strisciamento in agar glicerinato e siero di sangue, non fluidificanti le gelatine; mancavano le colonie piccole.

All'esame microscopico le colonie grandi appaiono a bordi netti a contenuto granuloso e aspetto grigiastro; le colonie piccole hanno bordi sinuosi e contenuto più finemente granuloso in modo uniforme.

I preparati microscopici fatti con materiale tolto dalle colonie grandi dimostrarono la presenza di cocchi che si colorarono anche col metodo di Gram.

I trasporti successivi fatti in brodo ed in gelatina, contribuirono a rilevare esattamente i caratteri fissati allo *stafilococco piogene albo*; e l'esperimento sugli animali fatto con la inoculazione di un centimetro cubico di cultura pura in brodo, nel tessuto connettivo sottocutaneo del coniglio, diede luogo alla formazione di un ascesso che si riassorbì dopo pochi giorni. Nei preparati microscopici fatti con pus tolto dall'ascesso era evidente la presenza dei micrococchi tra le cellule del pus.

L'esame microscopico fatto con materiale tolto dalle colonie piccole dimostrò l'esistenza di germi di forma bacillare della lunghezza di 0.5-1  $\mu$  e della larghezza di 0.1-0.5  $\mu$ , associati a elementi ancora più piccoli di prima formazione.

Lo sviluppo del germe di cui constano le colonie piccole, nelle culture in gelatina, innesto per infissione, presenta i caratteri che ricordano l'aspetto, nel medesimo substrato, dello streptococco della erisipela e del bacillo del colera dei polli; formano cioè una serie di piccole colonie a rosario lungo l'infissione, e, mentre lo sviluppo manca alla superficie del substrato nutritivo, si fa via via più abbondante negli strati più profondi, donde è lecito inferire che il microbio in parola si adatta meglio alla vita anaerobica.

Le culture in agar glicerinato, innesto per infissione, non differiscono gran fatto da quelle fatte in gelatina, soltanto presentano le colonie a rosario più rigogliose e più confluenti.

I trasporti in agar glicerinato a piano inclinato, innesto per strisciamento, diedero luogo allo sviluppo di colonie piccolissime rotondeggianti, trasparenti, puntiformi, che non mostrarono mai tendenza ad aumentare nè in estensione, nè in volume. Le colonie all'esame microscopico ed anche ad occhio nudo quando sono bene sviluppate, si presentano a bordi leggermente sinuosi come nella figura IV della tavola annessa.

Lo sviluppo è assai più rigoglioso e rapido nel siero di sangue; invero le culture fatte in tale mezzo nutritizio presentano delle co-

lonie di grandezza alquanto superiore a quelle sviluppate in agar e assumono un colore bianco.

La forma dei bacilli e la loro grandezza varia nei vari substrati: nelle culture in siero di sangue nelle quali, a giudicare dello sviluppo, si ha una condizione più favorevole, le forme bacillari si sviluppano meglio fino a misurare 0.5-4  $\mu$ . di lunghezza e 0.5 di larghezza, con protoplasma granuloso, in punti più colorati, separati da spazi chiari, simile in tutto al bacillo della difterite.

Nel brodo la cultura pura forma come una polvere, che si adagia sul fondo e sulle pareti del tubo, lasciando limpidi gli strati superiori del liquido nutritizio. Anche nel brodo lo sviluppo è piuttosto scarso e la nubecola sul fondo del tubo risulta più evidente nelle culture a metodo anaerobico.

Questo bacillo è immobile. Si colora col metodo di Gram; più facilmente col metodo di Löffler, e coi comuni colori d'anilina, specialmente la fucsina.

Quest'anno esportai dalla medesima ammalata altri pezzetti di tumore e col medesimo procedimento nelle culture isolai gli stessi germi, osservando inoltre che nella parte completamente degenerata del tumore prevalgono i cocchi, mentre le forme bacillari son quasi esclusivamente limitate alla periferia dello strato di degenerazione nella zona intermedia fra questa e la parte sclerosata del tessuto circostante.

Per caratterizzare meglio i germi riscontrati ho aggiunto la prova negli animali, inoculando cavie e conigli con pezzetti di tessuto degenerato e con culture pure in siero di sangue. Inoculai a due conigli un pezzetto della neoplasia sotto la congiuntiva dei fornici, e a due altri nella camera anteriore. Il risultato fu negativo per ambedue le prove; il materiale innestato sotto la congiuntiva si riassorbì nel periodo di un mese, e dopo due mesi anche quello inoculato nella camera anteriore. Invece l'inoculazione di piccolissima quantità di cultura nel tessuto congiuntivale e nella camera anteriore nel coniglio dà luogo alla formazione di un ascesso con pus filante. L'esame microscopico dimostrò la presenza di numerosi bacilli fra le cellule del pus. L'infiammazione circostante al punto di inoculazione scompare dopo otto giorni.

L'inoculazione fatta con 0.1-0.2 di centimetro cubico di cultura pura in brodo, nel tessuto sottocongiuntivale delle cavie, dà luogo del pari alla formazione di un piccolo ascesso seguito da guarigione. Le inoculazioni intraperitoneali e nelle vie sanguigne diedero risultati negativi. Una dose maggiore di 2 centimetri cubici uccide la cavia dopo 10 o 12 giorni, con fenomeni di intossicazione.

Per la ricerca del germe nel tessuto esportato, fissato e indurito parte in liquido di Müller, parte in alcool, colorai le sezioni più fine in una soluzione acquosa molto diluita di fucsina, per mezz'ora circa, come pure nel liquido di Löffler, lasciandovele immerse persino un'ora. Serve anche il metodo di Gram, ma meglio si presta quello di Löffler, decolorando con acido acetico (mezzo per cento) e tropeolina, e così pure la colorazione semplice con la soluzione già nominata di fucsina.

L'esame dei preparati rivelò la presenza di numerosi cocchi e piccoli bacilli in tutto simili a quelli che risulterono isolati nelle culture.

Osservando attentamente i bacilli, si trovarono sparsi qua e là nel tessuto, ma prevalentemente raggruppati intorno alle masse di tessuto in via di degenerazione o fra le cellule del connettivo esistente fra le masse stesse.

Tale corrispondenza tra il reperto delle sezioni microscopiche del tumore e il risultato delle culture dimostra evidentemente che le due varietà di microbi isolati preesistevano nel tessuto ammalato ed esclude l'eventualità di un accidentale inquinamento, così nelle manovre degli atti operativi come nelle pratiche di coltivazione.

Risulta adunque da questo mio studio dimostrata in un caso di degenerazione amiloide della congiuntiva umana, la presenza, nello spessore del tessuto ammalato di due microrganismi; l'uno noto e identificato per *stafilococco piogene albo*; l'altro rappresentato da un bacillo, che, indipendentemente dalla sua esistenza in un tessuto ammalato, e pel modo di presentarsi nella coltivazione artificiale — sviluppo più rigoglioso nel siero di sangue, predilezione della temperatura elevata e della vita anaerobica — e per gli effetti che produce negli animali da esperimento si deve annoverare nella categoria dei patogeni. Inoltre pei suoi caratteri microscopici, messi insieme con quelli biologici, non posso escludere che si tratti piuttosto di una modificazione del bacillo di Löffler, dovuta a condizioni speciali di sviluppo, che di una propria e vera forma di un nuovo microrganismo, benchè per molti caratteri sia distinto da quello di Löffler e specialmente per la sua poca resistenza nella vita saprofitica. Le culture del germe da me osservate, anche trasportate successivamente nel siero di sangue, dopo tre mesi perdono ogni vitalità, ma i bacilli conservano la loro forma tipica senza presentare caratteri di degenerazione.

Per risolvere questo dubbio dell'identità del mio bacillo con quello della difterite, considerando che le lesioni per intossicazione,

provocata nelle cavie con dose abbondante di culture del germe, non presentavano le note caratteristiche dell'infezione difterica, ma che ciò poteva dipendere dalla diminuita virulenza del germe, inoculati in una serie di animali il bacillo associato allo stesso micrococco piogene, riscontrato nel tessuto patologico, ed in seguito anche associato allo streptococco piogene, che, come è noto, aumenta l'attività patogena del bacillo difterico: tanto nell'uno che nell'altro caso gli esperimenti furono finora negativi. Inoculando il bacillo associato a questi germi si ha la formazione di un ascesso o di una infiltrazione flemmonosa del tessuto nel punto dell'inoculazione, ed è visibile all'esame microscopico la presenza simultanea nel pus dei due germi; ma gli animali raramente muoiono, nè presentano le note caratteristiche conseguenti alla inoculazione del virus difterico tipico.

Così mancando il carattere della virulenza dovevasi ritenere questo germe piuttosto come un bacillo *pseudo-difterico*, analogo a quello riscontrato da Hoffman <sup>1</sup> nelle membrane difteriche, e studiato in seguito anche da Loeffler, <sup>2</sup> Zarniko, <sup>3</sup> Kolisko e Paltauf <sup>4</sup> Escherich, <sup>5</sup> Beck <sup>6</sup> ed altri. Ne veniva quindi la necessità di confrontare le culture nei mezzi liquidi con quelle del *bac. pseudo-difterico* e del *bac. difterico* vero, per la ricerca comparativa del grado di acidità sul quale è basato secondo Zarniko e Fränkel un altro carattere differenziale fra il *bac. pseudo difterico* e il *bac. di Loeffler*. Come è noto il *bac. pseudo-difterico* non ha la proprietà di produrre acidi nelle colture, mentre questo carattere è assai marcato pel *bac. difterico*.

Veramente la proprietà acidificante che il *bac. difterico* manifesta nelle colture in brodo comune è assai variabile; e anche dalle mie osservazioni risulta che è molto attivo appena isolato, e va poi rapidamente diminuendo colla vita saprofitica e in presenza di sostanze idrocarbonate (glicerina, glucosia) si mantiene abbastanza evidente anche nelle vecchie colture, mentre il *bac. pseudo difterico* si dimostra assolutamente inattivo. Per le mie osservazioni di confronto adoperai diverse colture di origine svariata, alcune mandatemi con squisita cortesia dal dott. Selavo, Capo del laboratorio della Sanità pubblica in Roma. I due bacilli *pseudo-difterici* provenivano

<sup>1</sup> *Wien. med. Woch.*, 1888, n. 3-4.

<sup>2</sup> *Centralt. f. Bakt. d. Parasit.*, 1887, Bd. II, S. 105.

<sup>3</sup> *Centralt. f. Bakt. d. Parasit.*, 1889, Bd. VI, S. 224.

<sup>4</sup> *Zeit. f. Hygiene*, Bd. VIII, 1890.

<sup>5</sup> *Berl. Klin. Woch.*, 1893, n. 21-22-23.

<sup>6</sup> *Zeitsch. f. Hygiene*, Bd. VIII, 1890.

dalle colture originali di Hoffmann e di Escherich. Nella presente tavola ho riassunto le cifre medie di una lunga serie d'osservazioni:

Colture di 48 ore	Provenienza	Acidità in Hce per 1 cmc.			
		Brodo comune	Brodo con glicerina 3%	Brodo con glucosio 3%	
Colture di differite	I . . . . .	0.000166	0.000876	0.000890	
	II . . . . .	traccie	0.000642	0.000876	
	III . . . . .	traccie	0.000642	0.000876	
	IV . . . . .		0.000192	0.000759	
	V . . . . .	Id., vecchia coltura.	0.000145	0.000759	0.000876
	VI . . . . .	(Verniche). . . . .	0.0000584	0.000642	0.000952
	VII . . . . .	Vecchia coltura del laboratorio. . . . .	0.000157	0.000673	0.000864
	VIII . . . . .	Recentissima coltura isolata da un caso di differite a Massa	0.004	0.000759	0.001168
Pseudo-differite I . . . . .	(Hoffmann) . . . . .	0.0000584	neutra	neutra	
Pseudo-differite II . . . . .	(Escherich). . . . .	neutra	alcalina = 0.000064 di Na OH	0.000029	
Bacillo X . . . . .	Dalla degenerazione amiloide della congiuntiva . . . . .	0.000370	0.001720	0.001295	

Come si vede, il bacillo da me isolato produce acidi nelle colture a parità di quelle della differite vera; diversifica quindi assai in questo carattere dal *bac. pseudo-difterico*. Esso ha, si può dire, caratteri intermedi e comuni fra questo e il *bac. della differite*; ma si differenzia molto da ambedue per la debole resistenza nella vita

*saprofittica, anche se coltivato in siero di sangue e tenuto a conveniente temperatura (37° c.).*

Circa i possibili rapporti di dipendenza della lesione caratteristica della congiuntiva dall'azione isolata del bacillo o dall'associazione sua col micrococco piogene, io non ho ragioni sufficienti per pronunciarmi in alcun senso. Credo però non sia senza interesse l'aver richiamato l'attenzione degli studiosi sull'opportunità di considerare tale rara malattia anche dal lato batteriologico, e sono lieto di aver, per primo, apportato in questo senso un contributo, che potrà essere termine di confronto nello esame di altri casi.

In questi ultimi tempi Utoff Fraenkel,<sup>1</sup> Moritz,<sup>2</sup> Deyl<sup>3</sup> ed altri dimostrarono la presenza di bacilli simili a quello della difterite in speciali affezioni oculari; così diverse malattie, che prima si ritenevano affatto distinte nella eziologia, si trovano ora collegate e dipendenti da germi affini fra di loro, che presentano nei caratteri di cultura il tipo del bacillo di Löffler. Deyl, in un accurato studio sulla etiologia del calazio, descrive, come proprio di questa malattia, un germe che ha i caratteri di quello da me studiato. Senza volere identificare assolutamente il germe da me descritto con quelli di Deyl e degli altri osservatori, mancandomi il materiale per uno studio di confronto, rilevo l'affinità di carattere fra tutti questi germi ed il bacillo difterico, che rappresenta già tanta parte nella patologia oculare. Soltanto da ulteriori ricerche si potrà stabilire se realmente le affezioni, caratterizzate dalla presenza di questi germi, dipendano da un medesimo agente specifico, e quali condizioni influiscano a modificarne i caratteri biologici e la diversa attività patogena.

Per quanto riguarda la degenerazione amiloide e la genesi della sostanza amiloide nei tessuti, fra le varie ipotesi messe in campo debbesi tener presente quella di Dickinson,<sup>4</sup> il quale ritiene che la degenerazione amiloide abbia origine da una notevole sottrazione di sali alcalini in conseguenza di estese suppurazioni. Questa teoria riceve una nuova conferma dagli studi del Terni,<sup>5</sup> dai quali risulta che le alterazioni gravi consecutive a suppurazione sono causate dai prodotti acidi degli stafilocchi piogeni.

<sup>1</sup> *Berl. Klin. Wochenschrift*, 1893, n. 11.

<sup>2</sup> *Beiträge der Augenheilkunde*, IX.

<sup>3</sup> *Q. Aetiologii chalazia*. Praga, 1893.

<sup>4</sup> *Traité de médecine*. (Charcot, Bouchard, Brisson), t. III, p. 938.

<sup>5</sup> *Rivista d'igiene e sanità pubblica*, 1893.

Ora anche il bacillo da me isolato presenta un grado di acidità assai elevata. Il bacillo e la simultanea presenza anche dello stafilococco *piogene albo*, mi autorizza in relazione colla teoria di Dickinson e col reperto di Terni, ad affermare l'ipotesi che da questa simbiosi dipenda la degenerazione amiloide della congiuntiva nel caso da me studiato.

Sento il dovere di ringraziare il prof. Di-Vestea, direttore dell'Istituto d'Igiene, per i consigli prodigatimi con tanta cortesia e gentilezza durante il mio lavoro.

#### Spiegazione della Tavola.

Fig. I. *a* zolle amiloidee - *b* cellule in degenerazione - *c* bacilli (Oc. 3, obb. imm. omog.  $\frac{1}{125}$ , Koristka).

Fig. II. *a* masse di sostanza amiloide - *b* cellule connettive in via di degenerazione.

Fig. III. Bacilli in coltura pura (48 ore in Agar) (Oc. 2, obb. imm. omog. Koristka).

Fig. IV. *a* colonie dopo 24 ore - *b* colonie a completo sviluppo (Oc. 3, obb. a secco, Koristka).



Fig. I.

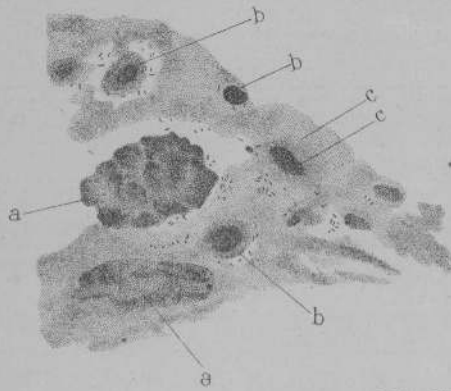


Fig. III.



Fig. IV.

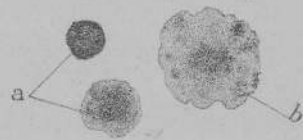


Fig. II.

