

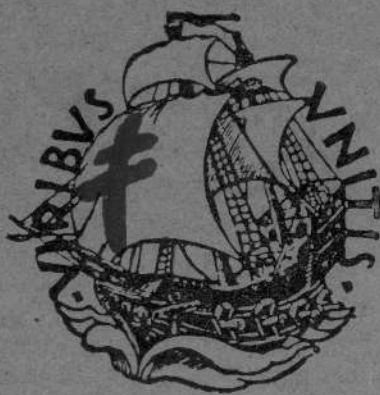


R. UNIVERSITA' DI PADOVA - SCUOLA D'IGIENE PUBBLICA
Direttore: prof. O. CASAGRANDI
SANATORI PROVINCIALI MILANESI
Direttore dott. M. BERTOLINI

Dott. RODOLFO CENTO
Primo assistente

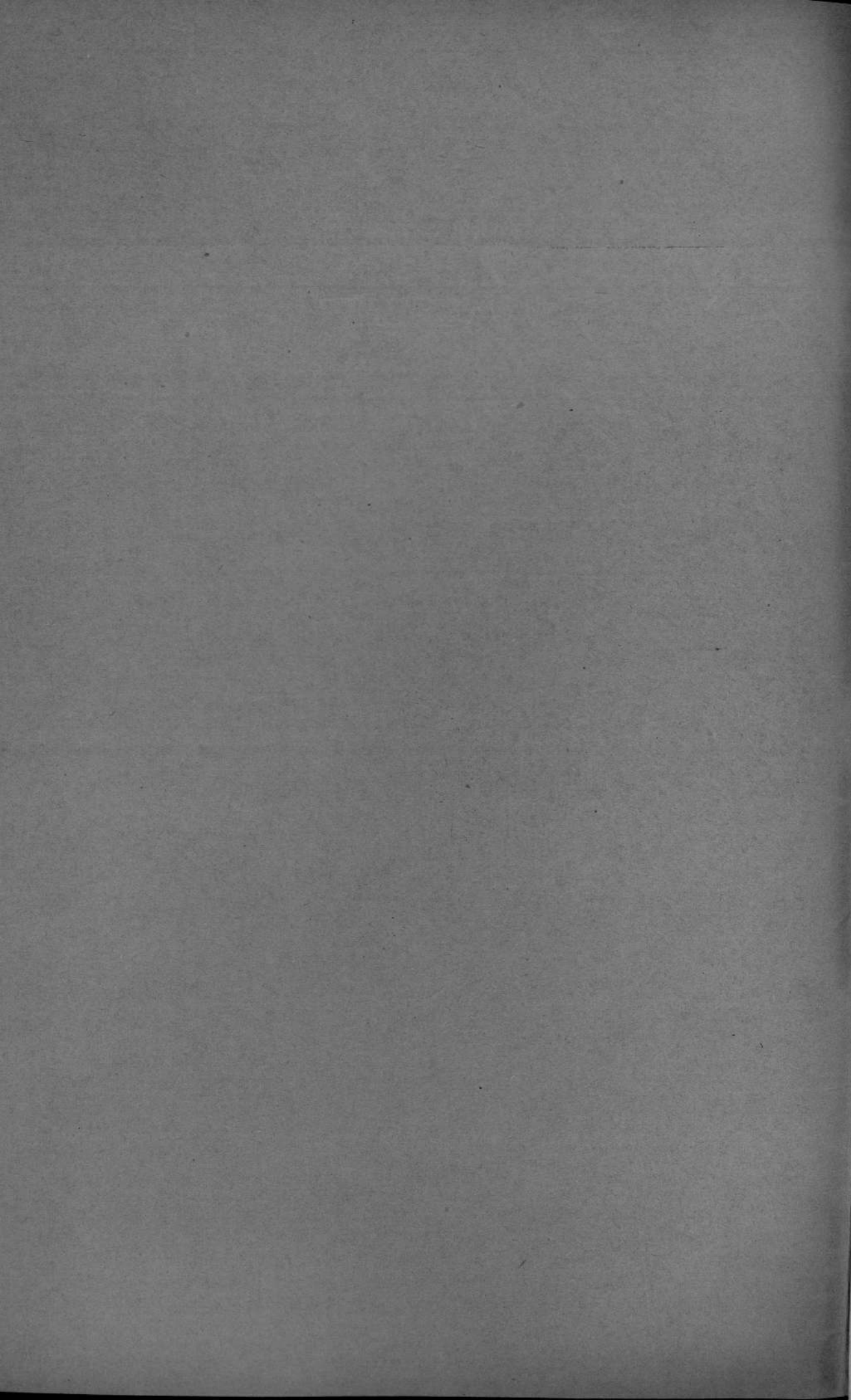
Ricerche sulla bacillemia nella tbc. polmonare

Estratto dalla Rivista «La lotta contro la tubercolosi» - Anno VIII, n. 8 - agosto 1937-XV



STABILIMENTO TIPOGRAFICO «EUROPA» - ROMA

Handwritten notes:
He
B
54
36



R. UNIVERSITA' DI PADOVA - SCUOLA D'IGIENE PUBBLICA
Direttore: prof. O. CASAGRANDI
SANATORI PROVINCIALI MILANESI
Direttore dott. M. BERTOLINI

Dott. RODOLFO CENTO
Primo assistente

Ricerche sulla bacillemia nella tbc. polmonare

Estratto dalla Rivista «La lotta contro la tubercolosi» - Anno VIII, n. 8 - agosto 1937-XV



STABILIMENTO TIPOGRAFICO «EUROPA» - ROMA



Malgrado la notorietà dell'argomento, non sarà inopportuno riassumere gli estremi prima d'illustrare i risultati di queste ricerche; pertanto mi limiterò a ricordare soltanto ciò che riguarda la bacillemia tubercolare studiata con il metodo culturale.

E' noto che il LOEWENSTEIN, sin dal 1905, applicava il metodo culturale per la ricerca del micobatterio tbc., oltre che negli espettorati, anche nel sangue, previo trattamento emolisante con acido solforico al 15%, consecutivo lavaggio e centrifugazione; con tale sistema egli, in collaborazione con i suoi allievi, riusciva nel 1921 ad isolare, su patata glicerinata, il b. di Koch anche dal sangue di animali infettati sperimentalmente. Pur essendosi questo metodo dimostrato ottimo per la ricerca del b. di Koch nei prodotti tbc. e nel sangue di animali sottoposti all'infezione sperimentale, esso dava risultati completamente negativi per l'isolamento nel sangue umano e il LOEWENSTEIN si dava allo studio per trovare sia un procedimento adatto per svelare il b. di Koch nel sangue umano, sia un terreno culturale particolarmente clettivo per il micobatterio tubercolare.

Nel 1930 infatti il LOEWENSTEIN comunicava di essere riuscito, mediante lo speciale procedimento cui aveva sottoposto il sangue prima della semina e mediante la semina in substrato culturale di speciale composizione, ad ottenere il 100% di positività nelle forme di tbc. miliare, il 50% in quelle di tbc. ossea e renale, il 55% nella tbc. cutanea e laringea, il 37% in quella articolare, il 75% nella tbc. oculare. Questo reperto iniziale, basato su 5000 insemnamenti, sembrò veramente sorprendente e richiamò l'attenzione di tutti i ricercatori. In ricerche successive ed in collaborazione con REITER e KREN, il LOEWENSTEIN comunicava di avere ottenuto risultati positivi per il b. di Koch oltre che nel sangue, anche nel liquido cefalo-rachidiano ed articolare in diverse affezioni d'insospettata natura tbc., quali la demenza precoce, la

sclerosi multipla, il reumatismo articolare acuto e la corea. A parte quest'ultimo reperto, che esula dall'argomento di questo lavoro, le ricerche del LOEWENSTEIN, sulla bacillemia tbc., oltre a indicare un nuovo indirizzo sullo studio dell'emocultura, venivano a creare concetti nuovi nel campo dell'etiopatologia della tbc. polmonare, ponendo la batteriemia come base dell'infezione stessa, quale fatto primitivo passibile di complicarsi in un secondo tempo con localizzazioni in uno o più organi.

Avendo tale questione sollevato grande interesse, si susseguirono ininterrotte le ricerche di controllo, da parte di numerosi AA., i cui risultati sono molto discordi da quelli del LOEWENSTEIN. Infatti con la ricerca emoculturale del B. K. promulgata dal LOEWENSTEIN, i vari AA. (le vaste citazioni bibliografiche di PERRAULT, KALLOS e KALLOS-DEFFNER, LENTI, mi dispensano dal citarli singolarmente), hanno ottenuto i risultati più disparati che vanno dal 100 % di positività del LOEWENSTEIN e collaboratori sino al 0 % di altri AA., con tutta una gamma di percentuali intermedie. Il SAENZ, che dopo il LOEWENSTEIN ha fatto il maggior numero di emoculture, su 936 campioni di sangue (circa 6000 tubi) esaminati sino al maggio 1935, ha trovato solo 12 casi positivi per micobatterio tbc. (1,2 %).

In complesso bisogna riconoscere che, parallelamente ai perfezionamenti della tecnica, va aumentando il numero dei ricercatori che trovano bacillemia positiva; però le percentuali di queste restano sempre molto basse e in forte contrasto con quelle altissime comunicate dal LOEWENSTEIN e collaboratori (KONRAD, VALLGREEN, JERUSALEMN e URGOITI, KREN, RUSSEF, WESSELY, ecc.). Il LOEWENSTEIN giustifica queste divergenze affermando che occorre attendersi rigorosamente alla tecnica da lui comunicata; egli infatti dà grande importanza alla scelta di un terreno particolarmente elettivo per l'isolamento e la moltiplicazione del B. K. ed all'allontanamento totale dell'emoglobina, previa emolisi del sangue da seminare, in quanto l'emoglobina nuocerebbe allo sviluppo del bacillo stesso; d'altra parte in questa guisa si verrebbe a ridurre al minimo volume la massa di sangue prelevato. Per questa ragione egli avrebbe dovuto più volte perfezionare il suo metodo sostituendo, nella emolisi dei globuli rossi, la saponina all'acido acetico in un primo tempo e poi l'acqua distillata alla saponina.

Proprio questo tempo del metodo del Loewenstein è stato molto discusso e criticato; infatti molti AA. hanno potuto dimostrare che il siero di sangue ed i costituenti ematici, lungi dall'avere potere antibacillare o dall'ostacolare lo sviluppo del B. K., ne favoriscono invece la crescita. Per primo il RONDONI (1924) poteva osservare che non solo il sangue *in toto* ed il siero di cavia, ma anche i filtrati di vecchie culture hanno un potere eccitante sullo sviluppo del micobatterio tbc., al contrario di ciò che avviene per altri batteri (cocchi piogeni, gonococco, ecc.). L'anno dopo anche lo SCHMIDT riscontrava questo fenomeno, che fu battezzato col nome di Rondoni-Schmidt e più tardi PETRAGNANI e poi BINGOLD riuscivano a coltivare il micobatterio tbc. umano in terreni diversi, previa aggiunta di sangue *in toto* o dei vari suoi costituenti

(plasma, gl. rossi, siero), in diversa percentuale; anche il BARELLI riscontrava un'azione favorente dei costituenti ematici sullo sviluppo culturale del B. K. ed ottenevano identici risultati KIRCHNER e LI lavorando sul terreno sintetico di Kirchner liquido e solidificato.

Il KIRCHNER ed in seguito KALLOS e NATHAN, avendo saggiato il potere battericida del siero di sangue, portando il B. K. nel suo terreno liquido a composizione sintetica, dove il siero era diluito in proporzioni convenienti, concludono che nè il siero di sangue di ammalati di tbc., nè quello di individui normali, possiede potere inibitore rispetto al micobatterio tbc.; anche CORPER e VIDAL, HOHN, POPPER, NINNI e BETREY, DI MAURO e GENTILE, GRAZIOSI, BARSINI, DADDI, LENTI, giungevano alle medesime conclusioni ed il PETRAGNANI avendo studiato in collaborazione con MAZZETTI il potere battericida del sangue di cavia vaccinate col B. K. (*in vitro*) proponeva di adottare come terreno di cultura per il micobatterio tbc. il sangue defibrinato, addizionato con eguale volume di soluzione fisiologica, brodo di Loeffler o di liquido di Sauton.

La DE SANTIS, avendo studiato ampiamente il potere battericida del sangue dei tubercolosi sul B. K., lavorando su terreno liquido di Kirchner, previa aggiunta di siero in varie proporzioni, conclude che il siero di sangue nei tubercolosi (omologo ed eterologo), si mostra capace di un'azione decisamente favorevole allo sviluppo del B. K. e ciò non solo a somiglianza del siero normale, ma in grado molto superiore a questo. Quest'azione eccitante lo sviluppo del micobatterio tbc. è stata osservata anche nei vari terreni ove erano state aggiunte piccolissime quantità di essudato pleurico od articolare (ERBA, VIDOLI, AGNELLO, ecc.) ed il RONDONI infine spiega questa azione ammettendo « che nell'organismo infetto circolino sostanze bacillari reperibili nel siero, le quali possono essere facilmente ingranate nei processi sintetici del protoplasma batterico e condizionino così la più rapida crescita dei germi ».

Un'altra causa delle differenze circa i risultati ottenuti nelle ricerche di controllo sulla bacillemia tbc., va ricercata nel criterio d'interpretazione dei risultati stessi; infatti è noto che il LOEWENSTEIN considera positive l'emoculture anche soltanto in base al reperto di bb. acido-resistenti (colonie microscopiche) ottenuto col raschiamento del terreno di cultura ed anzi egli consiglia di ricercare detto reperto anche nei terreni inquinati da funghi; secondo il LOEWENSTEIN questi bb. acido-resistenti sarebbero l'esponente di un particolare stadio di sviluppo iniziale (*Anfangstadium*) del micobatterio tbc. e possono dare talvolta, se trapiantati, delle colonie normali macroscopiche, mentre generalmente non danno luogo a sviluppo alcuno; il LOEWENSTEIN perciò, in base a queste microcolonie formula senz'altro giudizio di cultura positiva. Bisogna notare che sopra 1600 esami culturali, eseguiti nel Laboratorio del LOEWENSTEIN, solo in 8 campioni di sangue vi fu sviluppo di germi trapiantabili e dotati di potere patogeno per la cavia, mentre 56 volte i bb.

acido-resistenti risultarono non trapiantabili e privi di potere patogeno; escludendo questi ultimi, i risultati del LOEWENSTEIN rientrano quasi nella percentuale data dai ricercatori di controllo, la quale si aggira intorno al 6%.

Il TIEDEMAN pensa che detti germi acido-resistenti non siano altro che BB. K. aviari preesistenti nelle uova adoperate per la preparazione del terreno culturale; se si pensa però che il LICHTENSTEIN su 525 uova di galline di ignota provenienza, ha trovato soltanto 2 volte bb. tbc. e che il raschiamento della superficie di cultura, non ancora seminata, non dà mai reperto di bb. acido-resistenti, bisogna concludere che l'evenienza prospettata dal TIEDEMAN deve considerarsi almeno come molto rara.

Il SAENZ, isolate alcune di queste microcolonie ed avendole trovate prive di qualsiasi potere patogeno, propende a credere che si tratti di saprofiti paratubercolari banali a lentissimo sviluppo o di semplici ammassi di cadaveri di bb. acido-resistenti presenti nel sangue seminato sol perchè giuntivi con i vari liquidi impiegati nel trattamento; in questo senso starebbe la grande diffusione di tali germi nell'ambiente dimostrata da molti AA. (SAENZ, BINGOLD, LANGE, DE BENEDETTI e MAGGIA). Questa interpretazione però non convince molto quando queste figure bacillari acido-resistenti si trovano nel sangue insemnato, anche quando vennero impiegati liquidi bidistillati e filtrati per candela e recipienti lavati e sterilizzati accuratamente (VERDINA, ecc.). Il BIANCHI invece interpreta queste figure bacillari acido-resistenti quali prodotti artificiali della colorazione o quali residui acido-resistenti di provenienza ematica (emazie, granuli di leucociti, o lipidi); anche questa ipotesi, se in taluni casi è ammissibile, talvolta mal si accorda con l'osservazione microscopica di germi acido-resistenti troppo caratteristicamente ed uniformemente bacillari e raggruppati a mo' di colonia sì da far pensare a bacilli che ad un certo momento del loro sviluppo non abbiano più trovata la capacità o le condizioni necessarie per la crescita.

Date appunto le diversità e le difficoltà d'interpretazione in proposito, alcuni AA. nelle loro esperienze pronunciano giudizi di negatività, per il B. K., quando siano presenti colonie microscopiche che non abbiano effetto patogeno nella cavia o che non sieno trapiantabili, mentre altri AA. prendono in considerazione unicamente le colonie microscopiche a sviluppo normale, tralasciando il successivo studio sulle colonie microscopiche.

Se si pensa che gli AA. sopracitati hanno lavorato attenendosi rigorosamente alle prescrizioni del LOEWENSTEIN e che d'altronde alcuni AA. (HORSTER, BIANCHI, SAENZ, HOLM, TORRI, ecc.), dopo aver imparato personalmente la tecnica dell'emocultura nella clinica di Loewenstein, non sono riusciti a riprodurre risultati simili a quelli del LOEWENSTEIN stesso, se si pensa infine che molti AA., lavorando con altri metodi sono riusciti ad ottenere risultati positivi che si avvicinano più o meno alla media sopra data, bisogna concludere che malgrado le innumerevoli ricerche di controllo, il problema della bacillemia tbc. è sempre molto intricato e che non sia inopportuno avviarsi in queste ricerche anche con altri metodi e criteri differenti.

RICERCHE PERSONALI

TECNICA DI LAVORO. — Ho esaminato la bacillemia tbc. in rapporto ad alcuni momenti meno studiati, da questo punto di vista, nel corso della malattia tbc. e precisamente dopo l'instituzione del pnx., durante, dopo una delle manifestazioni più gravi della tbc.: l'emottisi, durante complicazioni tbc. extra-polmonari in soggetti già affetti da lesioni polmonari ed in soggetti affetti da adenopatia tracheo-bronchiale (fanciulli).

Complessivamente ho preso in osservazione 47 ammalati degenti nei sanatori provinciali milanesi, di cui 27 adulti e 20 fanciulli non oltre il 12° anno di età.

Per queste ricerche mi sono servito dei terreni culturali di Loewenstein e di Petragnani e di quelli sintetici liquidi di Model e di Kirchner; ho voluto adoperare questi due ultimi substrati culturali liquidi, parallelamente ai classici terreni all'uovo, per potere stabilire un confronto di sensibilità, prendendo lo spunto dalle ricerche della DE SANTIS e da quelle di POPPER; quest'ultimo A. infatti avendo seminato campioni di sangue, trattati secondo la tecnica di Loewenstein parallelamente in terreno di Loewenstein ed in un terreno liquido di sua composizione, ha avuto un risultato positivo in entrambi i terreni. Inoltre ho voluto seminare parallelamente sangue soltanto citratato e sangue trattato secondo il metodo di Loewenstein, per stabilire se i due metodi si equivalgono.

Non essendo scopo di questo lavoro compiere la duplice ricerca culturale e biologica, a scopo di accertamento ho proceduto alla prova biologica soltanto nei casi positivi ed in quelli dubbi, inoculando nella cavia per via endovenosa cc. 5 di soluzione di Ringer in cui erano sospesi frammenti di colonie positive microscopicamente o il sedimento del materiale di dubbia positività previamente omogeneizzato con antiformina. Circa la composizione di questi terreni, mi sono attenuto strettamente alle formule prescritte dagli AA. premettendo che in tutte le operazioni ho adoperato liquidi filtrati e sterilizzati nonchè recipienti perfettamente lavati e sterilizzati.

In ciascuno di questi terreni culturali (essendo i terreni liquidi molto soggetti agli inquinamenti, ho aggiunto, nella soluzione madre, della soluzione acquosa di verde malachite al 2% ed in proporzione del 3%), mi sono preoccupato che alla fine di tutte le varie manipolazioni il pH. si aggirasse intorno a 6,8-7,0, essendo questo l'*optimum* per lo sviluppo del micobatterio tbc. Per la determinazione di detto pH. mi sono servite del metodo colorimetrico ed ho adoperato il bleu di bromo-timolo secondo il metodo di Conn. Dopo aver controllato la sterilità dei terreni ponendoli in termostato per tre giorni consecutivi dopo la preparazione e poi in luogo fresco, man mano che preparavo una nuova serie di terreni mi assicuravo delle buone capacità culturali di essi, seminando in alcuni tubi di ciascun terreno, parallelamente alle semine sperimentali, alcune gocce di centrifugato di essudato pleurico già no-

toriamente bacillifero; inoltre tenevo alcuni tubi sterili di ciascun terreno in termostato, insieme a quelli seminati come controllo; per il sangue mi sono attenuto alla tecnica seguente: prelevati sterilmente a digiuno 20 cc. di sangue, li raccoglievo in un provettonne dove vi erano 6 cc. di citrato di sodio al 10% e dopo aver tappato ermeticamente con tappo di gomma sterile, agitavo energicamente per impedire che si formassero coaguli; dopo aver lasciato il provettonne a sedimentare per 24 ore in termostato, decantavo il plasma, con una pipetta sterile munita di filtro alla quale avevo attaccato una pera aspiratrice, curando di non intaccare lo strato superficiale ove si raccolgono i leucociti; indi mescolavo questi con la massa dei gl. rossi e a questo punto procedevo alla semina in tubo di Kirchner, in uno di Model, in uno di Petragnani ed in uno di Loewenstein, insemenzando $1/2$ cc. per ogni tubo e curando che il materiale fosse distribuito ugualmente e regolarmente sulla superficie dei terreni solidi. Finita questa prima operazione procedevo al trattamento della restante quantità di sangue secondo il metodo di Loewenstein ed ossia riempivo il provettonne con acqua distillata e dopo averlo tappato ermeticamente e sterilmente, agitavo ancora energicamente affinché l'emolisi avvenisse in modo completo; quindi centrifugavo a 2000 giri per 30 minuti. Dopo aver ripetuti i lavaggi emolisanti e centrifugato più volte sino ad avere un sedimento grigiastro completamente privo di emoglobina, lo raccoglievo con una pipetta sterile da 1 cc., lavavo il tubo della centrifuga con poche gocce di acqua distillata, riempio con questa la pipetta sino ad 1 cc. avendo cura di capovolgere più volte la pipetta stessa, perchè il sedimento si mescolasse uniformemente e quindi seminavo in un tubo di Petragnani, in uno di Loewenstein, in uno di Kirchner ed in uno di Model, insemenzando $1/4$ di cc. per ciascuno.

Non ho praticato l'ultimo tempo facoltativo del metodo di Loewenstein (l'aggiunta di 1-2 cc. di H_2SO_4 al 15% al sedimento per distruggere gli eventuali germi che non siano b. di Koch) in quanto ho lavorato con la massima sterilità ed anche per evitare eventuali dispersioni del sedimento.

Complessivamente per ogni campione di sangue venivano seminati 8 tubi di cui 4 solidi e 4 liquidi; dopo la semina ponevo i tubi di Loewenstein e Petragnani in posizione obliqua, affinché il materiale restasse uniformemente adagiato sulla superficie del terreno, per poi paraffinarlo accuratamente dopo 24 ore e porli verticalmente in termostato a $37^{\circ} 1/2$; i tubi di Kirchner e Model invece, dopo averli paraffinati, li ponevo subito in termostato a $37^{\circ} 1/2$ e li agitavo sistematicamente ogni due giorni per i primi 15 giorni, sia per stabilire un intimo contatto tra il substrato culturale e gli eventuali bacilli presenti e sia per assicurare le condizioni di ossigenazione favorevoli allo sviluppo del b. di Koch. Dopo il 15° giorno dalla semina controllavo macroscopicamente l'eventuale sviluppo di colonie e solo dopo 40 giorni dalla semina procedevo all'esame microscopico; a riguardo, dopo aver allestito due vetrini indifferentemente per ogni tubo, nei terreni solidi procedevo al raschiamento totale della superficie, inquinata o sterile che fosse e trattavo il mate-

riale ottenuto con antiformina al 20 % per due ore a 37°, per poi centrifugare ed allestire un'altra serie di preparati microscopici con il sedimento; nelle culture liquide invece aggiungevo senz'altro antiformina al 20 % in quei tubi ove avevo seminato sangue citratato o dove vi era inquinamento, mentre nei tubi sterili, seminati secondo il metodo di Loewenstein, procedevo all'allestimento dei preparati solo dopo semplice centrifugazione. Ogni volta mi sono preoccupato di conservare il resto del sedimento, perchè dopo attento esame microscopico, nei casi positivi o dubbi procedevo al trapianto delle colonie e del sedimento in terreni freschi, nonchè all'inoculazione in cavia.

CASI ESAMINATI - RISULTATI DELLE RICERCHE

SOGGETTI SOTTOPOSTI A ISTITUZIONE DI PNX. — Partendo dal concetto che il gas introdotto nel cavo pleurico possa, per azione meccanica, determinare disturbi di circolo o consecutiva penetrazione in esso di germi localizzati nei focolai collassati, alcuni AA. hanno studiato la bacillemia tbc. prima e dopo la istituzione del pnx. Con questo sistema WOLF ha esaminato 12 casi e VERDINA 15, entrambi con esito negativo; uguale reperto ebbe il WONKEN in 11 casi, mentre DADDI, in 20 casi studiati, ebbe 4 risultati positivi alla prova biologica.

Recentemente BRUNO, avendo studiato la bacillemia dopo l'istituzione pneumo-terapeutica, conclude che la bacillemia, rara negli individui affetti di tbc. polmonare, diventa più frequente dopo il suddetto intervento, sia per azione meccanica e sia per uno stimolo dovuto ad assorbimento di sostanze tipo tubercolina.

Io ho studiato la bacillemia in 18 soggetti sottoposti ad intervento pneumo-toracico istituito per forme di tbc. essudativa post-primaria a tendenza ulcerosa od ulcerosa senz'altro in taluni casi e di questi 18 pazienti, 12 erano adulti e 6 fanciulli sotto il 12° anno di età.

Nella scelta dei casi mi regolavo così: scartando quei pazienti dove la quantità di gas introdotto era minima, prendevo in considerazione solo quei casi dove la quantità di gas garantiva una buona istituzione di pnx.; in questi casi prelevavo il sangue un'ora dopo la prima introduzione e un'ora dopo il successivo rifornimento; il prelievo di sangue antecedente all'istituzione del pnx. l'ho eseguito soltanto nei bambini, 24 ore prima dell'intervento.

Di questo gruppo, in 14 soggetti la bacillemia risultò assolutamente negativa, in 3 soggetti invece (2 adulti e 1 bambino), si riscontrarono delle figure bacillari acido-resistenti e questo reperto fu trovato complessivamente in 9 tubi. Queste figure bacillari acido-resistenti però diedero risultato nettamente negativo sia al controllo biologico, sia nei successivi trapianti.

In un solo caso l'emocultura risultò nettamente positiva in 3 tubi; si trattava di un bambino di 8 anni sottoposto ad intervento pneumotoracico per un infiltrato parailare di formazione recente con tendenza evolutiva; pra-

ticata l'emocultura si è avuto sviluppo macroscopico di colonie di *bb.* di Koch, due volte nel campione di sangue prelevato un'ora dopo il primo rifornimento, mentre risultò negativo il campione prelevato 24 ore prima dell'intervento. Dei tre tubi positivi due contenevano Kirchner liquido insemenzato con sangue citratato ed il terzo tubo invece conteneva terreno di Petragrani alla cui superficie era stato seminato sangue citratato.

Al 30° giorno, prelevate delle ansate, furono allestiti alcuni vetrini, col metodo Ziehl-Neelsen, sui quali si potevano notare facilmente grovigli di bastoncini acido-resistenti uniformi come dimensioni e colorabilità ed un po' incurvati come si riscontra sui vetrini allestiti da culture fresche di *b.* di Koch.

Furono eseguiti diversi trapianti sul Loewenstein e Petragrani e dopo circa 20 giorni si ebbe lo sviluppo di belle colonie rugose caratteristiche, alcune delle quali diluite in Ringer ed inoculate in cavia per via endovenosa, risultarono positive per il *b.* di Koch anche alla prova biologica.

In questo gruppo di pazienti quindi la bacillemia *tbc.* è riuscita positiva nel 5,55% dei casi presi in esame, mentre nel complesso dei tubi la percentuale discende a 0,9% (3 tubi su 336).

SOGGETTO IN CORSO DI EMOTTISI. — A questo gruppo appartengono 7 pazienti adulti, nei quali ho prelevato il sangue poco dopo l'inizio di una emottisi grave. In questo gruppo, in un caso non si è avuto alcun reperto bacillare, in due casi si sono riscontrate delle figure bacillari acido-resistenti in due tubi per ciascuno, mentre in 3 casi risultarono positivi per il *b.* di Koch diversi tubi con colonie macroscopiche. Da notare che uno di questi casi era già in corso di trattamento pneumotoracico e intervenuta l'emottisi, il sangue fu prelevato dopo un rifornimento a scopo emostatico.

Su 24 tubi seminati in questi tre casi, hanno dato reperto positivo macroscopicamente ben 11 tubi di cui, 5 contenenti substrato culturale solido, e 6 contenenti terreno liquido. Dei 5 terreni solidi 3 erano Loewenstein di cui 2 insemenzati con sangue citratato ed 1 con sangue trattato secondo il metodo di Loewenstein; gli altri 2 tubi invece erano Petragrani seminati uno con sangue citratato e l'altro con sangue trattato secondo il metodo di Loewenstein. Dei 6 tubi contenenti terreno liquido, 5 tubi contenevano Kirchner liquido dei quali 3 insemenzati con sangue citratato e 2 con sangue trattato secondo il metodo di Loewenstein; il 6° tubo conteneva substrato liquido di Model seminato con sangue citratato e questo è stato l'unico caso di positività su terreno di Model. In questi tubi le culture erano molto più rigogliose nei terreni liquidi e più numerose nei terreni solidi che non nei tubi positivi appartenenti al caso del gruppo precedente e dette colonie riuscirono sempre positive per il *b.* di Koch sia nei numerosi preparati microscopici allestiti, sia nei successivi trapianti culturali ed alla prova biologica.

Volendo fare un raffronto clinico fra i casi di emocultura negativa e quelli ad emocultura positiva, dirò che in questi ultimi vi fu un peggiora-

mento progressivo con fatti tossiemici febbrili e con disseminazioni, in parte certamente di origine ematogena, dopo la cessazione della emottisi; invece nei pazienti ad emocultura negativa, oltre alla breve durata dell'emottisi, vi fu una rapida ripresa dello stato generale senza complicazioni postume.

Considerando questo gruppo di pazienti a parte, la bacillemia è risultata positiva nel 42,85% dei casi presi in esame (3 casi su 7), mentre nel complesso dei tubi seminati è riuscita positiva nel 22,91% (11 tubi su 48).

PAZIENTI AFFETTI DA LESIONI TUBERCOLARI EXTRA-POLMONARI. — Ho esaminato la bacillemia tbc. anche in 8 pazienti affetti contemporaneamente da lesioni polmonari ed extra-polmonari (4 di orchiepididimite tbc., 3 di tbc. ossea ed 1 di tbc. renale); in questo gruppo l'emocultura risultò sempre negativa malgrado che uno di questi, dopo circa un mese dal prelievo di sangue, presentasse nuove metastasi ossee d'origine ematogena. In un tubo appartenente a quest'ultimo caso ed in altri due appartenenti ad un altro caso, vi fu il solito reperto di bb. acido-resistenti non trapiantabili ed innocui per la cavia.

PAZIENTI AFFETTI DA ADENOPATIA TRACHEO-BRONCHIALE. — Ho voluto anche studiare la bacillemia tbc. in 14 bambini affetti da adenopatia tracheo-bronchiale con scarsi fatti infiltrativi parailari in qualche caso; i risultati furono costantemente e completamente negativi.

CONSIDERAZIONI. — Le indagini compiute con la tecnica riferita sulla bacillemia tbc. in 47 pazienti, hanno dato colonie macroscopicamente positive per il b. di Koch nell'8,55% dei casi, mentre sul complesso di 568 tubi si è avuto risultato positivo nel 2,82%; inoltre nel gruppo di soggetti in corso di emottisi la percentuale di positività è stata molto alta (42,85%). Premettendo che in queste percentuali non sono state calcolate le microcolonie di bb. acido-resistenti ad esito negativo nelle sub-culture ed in cavia, i risultati sopra riportati si prestano a numerose considerazioni generali d'ordine clinico e batteriologico.

Anzitutto nei pazienti colpiti da emottisi, l'alta positività riscontrata dimostra che, forse per le comunicazioni più o meno ampie stabilitesi durante il fenomeno emoftoico tra il focolo ed il vaso usurato, o per la congestione sopravvenuta, si può avere molto spesso una immigrazione di bb. di Koch nel sangue circolante ed in quel numero sufficiente (20 per cc. secondo SAENZ) per dare buoni risultati culturali; tenendo inoltre presente il peggioramento post-emoftoico verificatosi nei casi ad emocultura positiva, l'esame culturale della bacillemia eseguita metodicamente in questi casi, può aiutare nel giudizio prognostico e talvolta anche nell'indirizzo terapeutico.

Quanto alla bacillemia tbc. studiata dopo l'istituzione pneumo-terapeutica, pur non avendo avuto una forte percentuale di positività (5,55%, sui casi in esame ed il 0,9% su 336 tubi esaminati), bisogna tener conto che al

contrario dei casi studiati dal DADDI (positività nei campioni di sangue prelevati prima dell'instituzione del pnx.), nell'unico caso positivo il risultato è stato tale nei tubi seminati con il sangue prelevato dopo l'instituzione del pnx., mentre la bacilleemia tbc. è riuscita nettamente negativa nel campione di sangue prelevato prima dell'intervento stesso; in questo caso positivo sarebbe stato interessante studiare dopo quanto tempo la bacilleemia risultava negativa, ma mi è stato impossibile perchè seguì il trasferimento del bambino a causa del cattivo stato generale. Comunque la percentuale di positività ottenuta in questo gruppo è già sufficiente per far pensare che il collasso polmonare possa determinare la dispersione di alcuni germi nel sangue circolante, spiegando le disseminazioni ematogene seguenti le prime introduzioni, descritte da CULOTTA e dal CINQUEMANI e spiegando altresì i rialzi termici consecutivi alle prime introduzioni; la negatività degli altri casi in esame può darsi sia dovuta al non aver sorpreso il « momento » saltuario corrispondente al maggior numero di bb. circolanti nel sangue; ciò vale anche per i soggetti affetti da lesioni polmonari con manifestazioni extra-polmonari, mentre per i bambini affetti da adenopatia tracheo-bronchiale con scarsi fatti infiltrativi, bisogna ammettere con LIEBERMEISTER che la ricerca emoculturale sia stata praticata troppo tardi ed ossia quando i germi sono già annidati nei tessuti.

Passando ad un'altra considerazione d'ordine batteriologico, la semina del sangue, praticata parallelamente e con lo stesso campione a sangue soltanto citratato ed a sangue trattato secondo il metodo di Loewenstein sia nei terreni liquidi che in quelli solidi, ha dato risultati migliori con il primo metodo che con il secondo; infatti con il sangue citratato complessivamente si sono avuti 10 tubi positivi per il b. di Koch (3,52 %) mentre in quelli seminati con sangue emolisato secondo il metodo di Loewenstein si è avuto l'1,43 per cento ed ossia 4 tubi su 280 seminati con tale tecnica. Questa constatazione ribadisce l'opinione dei numerosi AA. già citati a suo tempo, che l'emoglobina ed i costituenti ematici in genere favoriscono lo sviluppo del b. di Koch anzichè ostacolarlo; per ricerche quindi di questo genere, la semina con sangue citratato, oltre alla maggior praticità che permette di evitare quasi totalmente gli inquinamenti, dà anche una maggiore positività a paragone del metodo del Loewenstein.

Altra considerazione molto importante concerne l'uso dei terreni liquidi; traslasciando il terreno di Model, che oltre a dare un solo risultato positivo, si è dimostrato inadatto perchè dopo un certo tempo cambia colore e presenta al fondo dei precipitati cristallini, prenderò in considerazione il terreno di Kirchner; questo substrato liquido infatti su 14 tubi complessivamente positivi, ha dato ben 7 tubi positivi contro lo stesso numero di tubi positivi dati da tutti gli altri terreni messi insieme ed inoltre ha dato risultati positivi in ogni campione di sangue positivo sugli altri terreni, mentre quest'ultimi invece non hanno corrisposto ugualmente in tutti i 4 casi positivi.

Questo fatto potrebbe spiegarsi ammettendo col Bousson, che il terreno di Loewenstein non sia tanto appropriato per il b. di Koch quanto si crede, specie quando si tratta di bb. a scarsa vitalità.

Nei suddetti tubi di Kirchner la caratteristica maggiore è stato l'inizio dal fondo di un intorbidamento granulare (colonie sommerse del Kirchner) cui si aggiungeva, dopo l'ultimo scuotimento, una patina superficiale tendente a risalire sulle pareti del tubo ed a diventare rugosa. Data la sua grande praticità d'impiego e sensibilità rispetto al b. di Koch, questo terreno merita di entrare sistematicamente nell'uso comune per le ricerche sulla bacilleemia tbc., parallelamente agli altri terreni, anche perchè permette di diagnosticare il b. di Koch talvolta già dopo 10-14 giorni dalla semina.

Quanto ai terreni di Loewenstein e di Petraghani, pur avendo dato ciascuno lo stesso numero di tubi positivi, nel secondo si è avuto uno sviluppo più numeroso di colonie e più rigoglioso che nel primo.

Volendo esaminare anche i risultati dati dalle microcolonie, questi si sono riscontrati nel 14,85% con 7 casi positivi per bb. acido-resistenti su 47, mentre nel complesso dei tubi la percentuale discende a 2,82% con 16 tubi positivi su 568.

Naturalmente questi reperti non sono stati presi in considerazione perchè i successivi trapianti in terreni freschi e l'inoculazione in cavia diedero sempre esito negativo. Bisogna notare però che queste microcolonie 9 volte furono riscontrate sui vetrini allestiti con sedimento ottenuto dal materiale omogeneizzato con antiformina al 20% per due ore, mentre le altre 7 volte furono riscontrati nei vetrini ottenuti nel raschiamento della superficie culturale; ora, a prescindere dall'uso fatto di liquidi e recipienti sterilizzati, l'aver ottenuto queste figure bacillari nel sedimento del materiale omogeneizzato, dovrebbe far escludere trattarsi di bb. acido-resistenti paratubercolari se, come affermano SPINDELER ed ENGELSEEN, detti bb. vengono distrutti dall'antiformina al 15% per mezz'ora. Non avendo inoltre mai trovato tali reperti nel materiale raschiato dalle superfici culturali dei tubi di controllo, escludo anche che si trattasse di bb. di Koch aviari, giunti con le uova nella preparazione dei terreni, anche perchè tali figure bacillari si trovavano egualmente al fondo dei terreni liquidi nella cui confezione non entravano a far parte le uova; escludo anche, tranne in qualche caso, che si trattasse di residui ematici o di artifici di colorazione; infatti sulla maggior parte dei vetrini si potevano notare al microscopio bastoncini così tipicamente bacillari ed aggruppati, da non far dubitare sulla diagnosi chi non ne sapesse la provenienza; data piuttosto la minor acido-resistenza ed alcool-resistenza di questi bb. al confronto dei bb. di Koch trovati nelle colonie macroscopiche, si potrebbe pensare col COURMONT che si tratti di bb. di Koch giovani ed ancora non rivestiti o poco rivestiti del rivestimento cirograssoso ed incapaci, per questa scarsa vitalità, a produrre emoculture od inoculazioni positive. Non escludendo che questi «bacilli nudi» del Courmont non rappresentino altro che



lo stadio iniziale del micobatterio tbc. (*Anfangstadium*) ammesso dal LOEWENSTEIN, comunque sulla etiologia di queste microcolonie è ancora aperta la discussione e certamente ulteriori ricerche chiariranno il problema.

CONCLUSIONI

I. — La bacillemia tbc. nei malati di tbc. polmonare costituisce un riscontro raro; però può verificarsi dopo la istituzione di pnx. (1 su 18 nei pazienti presi da me in esame).

II. — In corso di emottisi invece è facile riscontrare bacillemie positive (3 su 7 casi da me presi in esame e cioè nel 42,85%), ed in questi casi l'emocultura può anche servire quale giudizio prognostico, come ebbi a verificare nei casi ad emocultura positiva dove vi fu un peggioramento clinico in contrasto con la rapida ripresa dei pazienti ad emocultura negativa.

III. — Nel complesso dei miei casi presi in esame, la bacillemia è risultata positiva nell'8,55% dei casi (4 su 47), mentre sulla totalità dei tubi è riuscita positiva nel 2,46% (14 su 568 tubi insemenzati).

IV. — La bacillemia tbc. costituisce un fenomeno assolutamente eccezionale in pazienti affetti da adenopatia tracheo-bronchiale con scarsi fatti infiltrativi.

V. — Pur dovendo ammettere clinicamente la bacillemia tbc. in pazienti affetti da tbc. polmonare o manifestazioni extra-polmonari, essa non è facilmente dimostrabile, il che si può ritenere dovuto alla sua saltuaria intermittenza.

VI. — Stante il maggior numero dei tubi positivi da me avuti mediante la semina con sangue soltanto citratato (3,52%), in confronto dei tubi insemenzati secondo la tecnica del Loewenstein (1,43%), lungi dall'inibire l'accrescimento del b. di Koch debbo affermare che i costituenti ematici si mostrano capaci di favorirne lo sviluppo. Questo metodo quindi per la sua sensibilità e per la sua maggiore praticità può essere fiduciosamente sostituito alla lunga tecnica proposta dal LOEWENSTEIN per la disemoglobinizzazione del sangue.

VII. — Il substrato liquido di Kirchner, oltre alla sua praticità di impiego, si mostra perlomeno altrettanto idoneo alla cultura del micobatterio tbc. dei terreni solidi e per questa sua qualità dovrebbe entrare nell'uso comune per lo studio della bacillemia tbc. da solo o quale controllo degli altri terreni.

VIII. — Il terreno di Petraghani, per la sua sensibilità per nulla inferiore a quella del Loewenstein, e per la sua facilità di preparazione, resta sempre il migliore tra i terreni solidi per ricerche sul b. di Koch.

IX. — Nelle ricerche surriferite sono state riscontrate microcolonie non trapiantabili ed innocue per la cavia in 7 casi su 47 (14,85 %), mentre nel complesso dei tubi sono stati riscontrati 16 volte su 568 tubi insemenzati (2,82 %); pur non potendo considerare questi reperti fra quelli positivi per il b. di Koch, la natura di queste microcolonie merita di essere ulteriormente studiata.

X. — Di pari passo al perfezionamento della tecnica, va aumentando il numero degli AA. che riescono a dimostrare bacille mie tbc. positive pur non raggiungendo le alte percentuali del LOEWENSTEIN, alte percentuali che, ove non si computino le microcolonie non trapiantabili, quasi rientrano nella media percentuale data dagli altri ricercatori. I dati sperimentali quindi, unitamente ai dati clinici, dimostrano che la bacille mia tbc. può essere reperibile microscopicamente ed i risultati contraddittori dei vari ricercatori non fanno che confermare la grande difficoltà di sorprendere il momento fugace ed intermittente in cui i bb. di Koch sono circolanti nel sangue.

SOMMARIO

L'A. ha ricercato culturalmente la presenza del b. di Koch nel sangue di pazienti affetti da tbc. in corso d'emottisi, dopo la prima introduzione pneumo-terapeutica, in pazienti affetti da tbc. polmonare con manifestazioni extra-polmonari ed infine in un gruppo di bambini affetti da adenopatia tracheo-bronchiale; parallelamente egli ha effettuato la semina con sangue soltanto citratato e con sangue trattato secondo il metodo di Loewenstein, sia sui terreni solidi di Petriagnani e di Loewenstein e sia in quelli sintetici liquidi di Kirchner e di Model. La bacille mia è risultata positiva nell'8,55 % sul totale dei casi esaminati con un massimo di positività nei pazienti in corso di emottisi (42,85 %); inoltre rispettivamente la bacille mia è risultata positiva nel 2,46 % sulla totalità dei tubi insemenzati, nel 3,52 % nei tubi insemenzati con sangue solo citratato e nell'1,43 % dei tubi insemenzati con sangue trattato secondo la tecnica di Loewenstein; da tale computo furono escluse le microcolonie non trapiantabili riscontrate nel 2,82 % rispetto ai tubi seminati e nel 14,85 % rispetto ai casi studiati.

BIBLIOGRAFIA

- AGNELLO: «Lotta contro la Tbc.», 1935, n. 8.
 BARSINI: «Atti R. Acc. Fisiocritici di Siena», 23 luglio 1934.
 BARELLI: «Boll. I. S. M.», 1931, n. 5.
 BIANCHI: «Boll. Soc. Med. Chir. Pavia», 1932, n. 2.
 BINGOLD: «Beitr. Klin. Tbk.», 1928, n. 68.
 BOUSSON: «Wien Klin. Woch.», 1934, n. 29.
 BRUNO: «Comunicaz. alla Sez. Reg. Sic. della Fed. It. Naz. Fasc. per la lotta contro la Tbc.», 31 maggio.
 CINQUIMANI e CULOTTI: «Riv. Sanit. Sic.», 1932, n. 4.
 CIARLA e TORRE: «Boll. I. S. M.», 1935, n. 11.
 CONN: «Bacteriologie», Baltimore, 1924.
 CORPHER e VIDAL: «Ann. Rev. Tub.», 1933, vol. 33.
 COUKMONT: «Journ. de Méd. de Lyon», 29 ottobre 1933.
 DADDI: «Lotta contro la Tbc.», 1935, n. 9-10.
 DE BENEDETTI e MAGGI: «Boll. I. S. M.», 1935, n. 11.
 DE SANTIS: «Boll. I. S. M.», 1935, n. 1.
 ERBA: «Bioc. e Ter. Sper.», 1933, n. 1.

- GRAZIOSI: « Riv. di Pat. e Clin. della Tbc. », 1934, n. 2.
 HOHN: « Dtsch. Med. Wochr. », 1934.
 HOLM: « Acta Tub. Scandinavica », 1932, n. 6.
 HOERSTER: « Klin. Woch. », 1931, n. 52.
 JERUSALEM e URGOTTI: « Med. Clin. », 1931, n. 21.
 KALLOS e NATHAN: « Zentr. für Tbk. », 1933, n. 73.
 KALLOS e KALLOS DEFFNER: « Zentr. für Tbk. », 1936, n. 45.
 KIRCHNER: « Zentr. », 1932, n. 124.
 KIRCHNER e LI: « Beitr. Klin. Tbk. », 1932, n. 80.
 KONRAD: « Wien Klin. Woch. », 1932, n. 14.
 KREN e LOEWENSTEIN: « Wien Klin. Woch. », 1931, n. 13.
 LANGE: « Il Policlinico Prat. », 1935, n. 2.
 LENTI: « Atti dell'Istituto d'Igiene », Padova, 1935.
 LICHTENSTEIN: « Zentr. für Tbk. », 1932, n. 67.
 LOEWENSTEIN: « Dtsch. Med. Woch. », 1930, n. 1.
 — « Journ. de Méd. de Lyon », 20 ottobre 1933.
 — « Zentr. für Tbk. », 1934, n. 1-2.
 NINNI e BETREY: « Lotta contro la Tbc. », 1934, n. 1.
 PERRAULT: « Le Grand Ed. Paris », 1934.
 PETRAGNANI: « Atti R. Acc. Fisiocritici di Siena », 1926-1932.
 PETRAGNANI e MAZZETTI: « Atti R. Acc. Fisiocritici di Siena », 1934.
 PETRAGNANI e DI MAURO e GENILE: « Atti R. Acc. Fisiocritici di Siena », 1934.
 POPPER: « Wien Klin. Woch. », 1933, n. 31.
 REITTER: « Dtsch. Med. Woch. », 1934, n. 23.
 RONDONI: « Lo Sperimentale », 1924, n. 4-5.
 — « Boll. I. S. M. », 1935, n. 4.
 RUSSEF e LOEWENSTEIN: « Wien Klin. Woch. », 1930, n. 12.
 SAENZ: « Presse Médicale », 1932, n. 50; 1933, n. 97.
 — « Le Journ. Méd. Française », 1935, T. 24.
 SCHMIDT: « Zentr. f. Brekt. », 1925, n. 94.
 SPINDLER ed ENGELSEEN: « Zentr. f. Brekt. », 1915, n. 76, 356.
 TIEDEMANN: « Beitr. Klin. Tbk. », 1932, n. 81.
 VALGREEN: « Arch. für Kind. », 1932, n. 3-4.
 VERDINA: « Riv. di Pat. e Clin. Tbc. », 1933, n. 1.
 VIDOLI: « Boll. I. S. M. », 1930, n. 4-5.
 WESSELY e LOEWENSTEIN: « Wien Klin. Woch. », 1930, n. 36.
 WOLF e SCHWEIZ: « Med. Woch. », 1929, n. 29.
 WONCHEN: « Zentr. Tbk. », 1934, n. 71, 41.

55564

~~220037~~

