

BIBLIOTECA MEDICA
ISCELL.
B 60
47
ROMA

ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
CLINICA TISIOLOGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

Prof. B. BESTA

L'USO DEL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA NELLA RICERCA DEL BACILLO DI KOCH

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno III, N. 11-12, Pag. 904-912



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 17

1939-XVIII



ISTITUTO « CARLO FORLANINI »
CLINICA TISIOLOGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

L'USO DEL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA NELLA RICERCA DEL BACILLO DI KOCH

BRUNO BESTA, aiuto e libero docente.

Si deve ad HAGEMANN (1) la proposta di colorare i bacilli di Koch (b. K.) con colore fluorescente, l'auramina (*), in maniera che i microorganismi, colpiti da un fascio di luce U. V. invisibile, acquistano una luminescenza giallo-oro particolare (fluorescenza) la quale permette l'emissione di luce visibile, a lunghezza d'onda maggiore, tanto che ne è consentita la loro osservazione con un microscopio normale.

HAGEMANN osservò subito che delle prove culturalmente positive in espettore solo il 35 % dava positività con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN, mentre con la fluorescenza si otteneva una positività superiore al 70 %; nel restante materiale si arrivò persino a un aumento del 100 %. Con l'arricchimento per mezzo dell'antiformina HAGEMANN ottenne l'80 % di maggiore positività per l'espettore e del 90 % per restante materiale. Confrontando le prove culturali dei casi positivi allo ZIEHL e alla fluorescenza la crescita su provette apparse abbondante mentre fu scarsa in quelli positivi solo alla fluorescenza e scarsissima in quelli positivi solo culturalmente. In questi casi la crescita si iniziò anche dopo 6 settimane.

Il metodo che si era già visto praticarsi anche per la colorazione dei bacilli della Lebbra (2) fu usato anche per i bacilli differici (3).

La microscopia fluorescente che l'A. sperimentò nella ricerca del micobatterio della tubercolosi nell'espettore, liquidi purulenti, urina e altri materiali patologici si rivelò immediatamente molto più sensibile dei metodi comuni di ricerca diretta del b. K. e fu ampiamente provata, soprattutto in Germania, onde studiarne la reale portata pratica nel campo della diagnostica tubercolare e microbiologica in genere.

In una seconda nota lo stesso HAGEMANN (4) comunicava al congresso tedesco di microbiologia di aver ricercato il b. K., col metodo della fluorescenza in più di 1000 casi senza alcun errore: i casi positivi microscopicamente risultarono tutti positivi anche alla prova culturale. Il metodo alla

- (1) HAGEMANN P. K. H. — « Munch. Med. Woch. », 1938, **28**, 1066.
- (2) HAGEMANN P. K. H. — « Deut. Med. Woch. » 1937, **13**, 514.
- (3) HAGEMANN P. K. H. — « Wien. Med. Woch. », 1939, **89**, 329.
- (4) HAGEMANN P. K. H. — « Zbl. Bakt. Orig. », 1938, **140** Tag. d. D. Ver. Mikrobiol. **184**.

(*) Da principio è stato usato il solfato di Berberina, in seguito si è usata l'auramina che, secondo i vari sperimentatori, si è rivelata essere migliore.

fluorescenza si dimostrò inoltre assai più positivo (in una grande percentuale di casi che l'A. peraltro non identica) in raffronto alla colorazione di ZIEHL-NEELSEN e questo non solo perché si aumenta il campo visivo (il microscopio a fluorescenza si può usare già a 200 ingrandimenti), ma anche perché si colorano più bacilli che con la fucsina.

KELLER (5) resosi conto dell'enorme risparmio di tempo che l'uso del microscopio a fluorescenza consentiva (su circa 100 espettorati più o meno negativi, la ricerca diretta con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN richiese 126 minuti mentre ne furono necessari solo 15 con il metodo della fluorescenza), modificò l'apparecchiatura per la visione, semplificandola in maniera da renderla accessibile all'acquisto di molti laboratori specializzati. Egli facilitò le manualità di ricerca e di osservazione con l'uso di una luce visibile, ad onda corta, proveniente da una lampada a filamento di piccolo voltaggio, con l'aggiunta di un apposito filtro.

Sono seguite, in questi ultimi due anni, molte ricerche che hanno, almeno in parte, confermato gli esami precedenti; in genere gli AA. si accordano nel riconoscere che il nuovo metodo di ricerca rappresenta un risparmio di tempo e di fatica mentre appare essere più sicuro dei processi colorimetrici normali: non tutti però concordano nel ritenere il metodo di fluorescenza superiore ad alcuni metodi di colorazione, mentre più discordi ancora sono i pareri per quanto riguarda i rapporti di percentuale tra la positività alle prove di cultura e inoculazione in animale recettivo e la ricerca con la fluorescenza.

HERRMANN (6) controllò per primo il metodo di HAGEMANN aggiungendo al trattamento con l'auramina una colorazione di contrasto con il bleu di metilene dopo lavatura con permanganato di potassa all'1%_{oo}. Su 1424 prove la colorazione fluorescente si dimostrò di molto superiore alla colorazione di ZIEHL NEELSEN.

Egli conclude affermando di aver elevato la positività media annuale degli espettorati da 19-20 % (massimo 23 %) con il metodo di ZIEHL-NEELSEN a 26,2 % (fluorescenza).

KÜSTER (7) riferisce su 168 ricerche su campioni di espettorato con risultato di 31 positività con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN e di 53 positività con la fluorescenza (più del 40 % di vantaggio). L'A. non riferisce sull'esito delle prove biologiche di controllo che sono state fatte, perché eseguite troppo recentemente. KÜSTER ritiene che il metodo della fluorescenza rappresenti indubbiamente un grande vantaggio: si presta anche per la colorazione dei bacilli della Lebbra, mentre poco o nulla si presta per la colorazione di altri bacilli acido resistenti.

DABELSTEIN (8) riferisce su 900 esami con solo il 17 % di positività, senza che i risultati della fluorescenza fossero superiori al vecchio metodo di ZIEHL col quale invece hanno sempre collimato. Su 3 casi anzi di dubbia positività con la fluorescenza, la cultura di controllo risultò negativa. Ammette di avere avuto un notevole risparmio di tempo nell'osservazione dei preparati.

BOCK e OESTERLEIN (9) avendo usato il microscopio a fluorescenza per l'osservazione di plasmidi e altri protozoi confermano l'uso del metodo per la ricerca dei b. K. per la colorazione dei quali è indicata, soprattutto, l'auramina.

(5) KELLER Ch. — « J. Munch. Med. Woch. », 1938, 52, 2024.

(6) HERRMANN W. — « Deut. Med. Woch. », 1938, 38, 1354.

(7) KÜSTER H. — « Deut. Med. Woch. », 1939, 3, 92.

(8) DABELSTEIN H. — « Zbl. Bakt. Orig. » 1939, 143, 242.

(9) BOCK E. e OESTERLEIN M. — « Zbl. Bakt. Orig. » 1939, 143, 306.

CLAUBERG (10) afferma pure di aver ottenuto, su 500 esami, il 18 % in più di positività con l'uso del microscopio fluorescente (sempre in confronto al metodo di ZIEHL-NEELSEN) e asserisce che le prove culturali e di inoculazione in animale dei casi positivi solo alla fluorescenza confermarono ognora la diagnosi pur riscontrandosi, d'altro canto, una maggiore positività totale delle prove biologiche.

Non fu possibile usare il metodo per la diagnosi differenziale dei diversi stipi bacillari, aviaro, bovino, umano. Anche la diagnosi differenziale con altri germi non diede mai luogo a difficoltà alcuna : le difficoltà per lo scambio dei b. K. con germi alcol-acido-resistenti, saprofitti, sono le stesse che si hanno con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN. Secondo CLAUBERG il metodo fluorescente deve essere quello di scelta, oggi, per la sua facilità d'uso e per la sua eccellente sensibilità.

GÄRTNER (11) partendo dalle osservazioni negative o quasi di DABELSTEIN e da quelle compiute nell'Istituto ove egli lavorava da GROTHUES (12) (GROTHUES confrontando fra di loro i metodi di JÖTTEN-HAARMAN e della fluorescenza in 392 casi ha riscontrato un'eguale positività del 28,3 %) torna a fare un paragone fra il metodo a fluorescenza e la colorazione di JÖTTEN-HAARMANN (13) e ZIEHL-NEELSEN (*). Su 530 casi esaminati 110 diedero esito positivo con la fluorescenza (20,7 %) e 100 (18,9 %) con gli altri due metodi (press'a poco equivalenti). GÄRTNER ha osservato anche che i bacilli della smegma, sino a che appartengono a culture giovani, hanno i caratteri di fluorescenza eguali ai b. K., nelle vecchie culture appaiono più grossi e di altra forma ; se coltivati su terreno di LONG a volte conservano l'acido-resistenza senza, peraltro, lasciarsi colorare dell'auramina, il che fa pensare a BACHMANN (14) che la proprietà di rendersi fluorescenti e l'acido-resistenza abbiano cause diverse.

GÄRTNER, paragonando anche i differenti risultati dei diversi ricercatori ritiene, in conclusione, che anche i metodi colorimetrici, se usati bene e con sufficiente pazienza e attenzione, diano risultati pressoché eguali alla fluorescenza ; in un ampio materiale quest'ultimo può dare un guadagno di circa il 20 % ma non più.

DIDION (15) su 702 campioni di materiale patologico trova 129 casi positivi con la colorazione ZIEHL-NEELSEN (18,37 %) e 137 col metodo della fluorescenza (19,5). DIDION pone in particolare rilievo il fatto che la prova culturale diede 149 positività e quella di inoculazione in animale recettivo 157. Paragonando le sensibilità degli opposti metodi di ricerca del b. K. secondo WAGNER (16), e cioè calcolando a 100 la sensibilità del metodo di inoculazione in cavia, egli ritiene che la prova culturale abbia il valore 92 ; 82,2 la colorazione con lo ZIEHL e 87,2 la prova della fluorescenza.

(10) CLAUBERG K. W. — « Klin. Woch. » 1939, **18**, 632.

(11) GÄRTNER H. — « Z. Tbk. » 1939, **83**, 27.

(12) GROTHUES cit. e GÄRTNER. — « Inaug. Dissert. », Münster 1939.

(13) JÖTTEN e HAARMANN. — « Münch. Med. Woch. », 1920, 991.

(14) BACHMANN cit. e GÄRTNER. — « Münch. Med. Woch. », 1939, **16**, 637.

(15) DIDION H. — « Klin. Woch. », 1939, **40**, 1315.

(16) WAGNER G. F. — « Z. öff. Gesdh. dienst. », 1938, 515.

(*) Colorare il b. K. con una soluzione di violetto cristallizzato in alcool asciutto o metilico al 3 %; decolorare pochi secondi con acido nitrico diluito in acqua al 10 % e poi con alcool a 95° sino ad ottenere un colore bleu pallido; lavare rapidamente con acqua distillata; colorare a fondo con una soluzione acquosa di eosina all'1 % o bruno Bismarck, o saffranina. I bacilli e i corpi granulosi sono colorati omogeneamente in bleu intenso ; il fondo è rosso o bruno, a seconda del colore.

DIDION ha visto però che numerose volte (e precisamente 27) si osservano, col metodo della fluorescenza, dei bacilli giallo-oro senza che le prove biologiche di controllo (negative) permettano un sicuro riconoscimento in essi, del b. K. il che lo porta a ritenere che il metodo della fluorescenza può dare solo il sospetto di b. K. e non la sicurezza.

Per rendersi conto della maggiore positività ottenuta col metodo della fluorescenza, fatto questo che, secondo HAGEMANN (corroborato da R. MÜLLER) (17) è dovuto alla possibilità che con l'auramina si colorino più bacilli che con il metodo di ZIEHL, egli ha contato — col metodo di BREED — il numero dei bacilli in sospensioni titolate di bacilli della fleola e di Koch colorati con i due metodi senza avere una differenza in vantaggio dell'un metodo o dell'altro. Ritiene anch'egli, per altro, che il metodo rappresenta un guadagno di tempo almeno doppio e che sia utile anche per la ricerca del b. K. nei preparati istologici : il che è confermato anche da BACHMANN e FINKE (18).

In Italia solo STORTI e ALLEGRI (19) si sono occupati brevemente dell'argomento indicando l'utilità della ricerca del b. K. in luce fluorescente ; ritengono che il metodo sia destinato ad entrare nell'uso corrente.

Dal rapido sguardo dato alla bibliografia si può trarre, a guisa di riasunto, la tabella che segue, in cui sono elencati i risultati ottenuti, sino ad oggi, dai diversi autori.

AUTORE	NUMERO dei casi osservati	POSITIVITÀ		% POSITIVITÀ		OSSERVAZIONI
		metodi colori- metrici	metodo della fluo- rescenza	metodi colori- metrici	metodo della fluo- rescenza	
HAGEMANN	non indicato	—	—	—	100	Positiva almeno nel 70% delle p. biol.
KELLER.....	non indicato	—	—	—	—	Notevole superiorità.
HERRMANN	1424	—	—	19-20	26,2	
DABELSTEIN.....	90	—	—	circa 17	circa 17	
BOCK e OESTERLIN	non indicato	—	—	—	—	
CLAUBERG	500	76	90	15,2	18	
GROTHUES	392	109,2	111	28,3	28,3	
GÄRTNER.....	530	100	110	18,9	20,7	
BACHMANN	non indicato	—	—	—	—	Modica superiorità.
DIDION	702	129	137	18,3	19,5	Alcune prove dubbie.
STORTI e ALLEGRI	non indicato	—	—	—	—	Modica superiorità.

(17) MÜLLER R. — « Lehrbuch der Hygiene », II vol. Berlin 1939, Lehmanns ed., pag. 212.

(18) BACHMANN W. e FINKE L. — « Deut. Med. Woch. », 1939, 38, 1474.

(19) STORTI E. e ALLEGRI A. — « Soc. Med. Chir. », Pavia 4-5, 1939.

* * *

Si è già detto sopra che KELLER ha recentemente apportato, alla ricerca dei bacilli Koch col metodo della fluorescenza, una semplificazione notevole che permette la visione dei b. K. colorati con auramina con l'uso di un microscopio normale e l'aggiunta di una speciale lampada (Lux G. di REICHERT) a filamento breve di piccolo voltaggio, munita di appositi filtri della luce. In possesso dell'apparecchiatura proposta da KELLER semplice per l'uso, e di costo modesto, (la Direzione del nostro Istituto ha immediatamente accolto la proposta d'acquisto del materiale occorrente in modo da mettersi, come sempre, in prima linea nelle ricerche che riguardano la tubercolosi) ho voluto subito rendermi conto della vera utilità del metodo della fluorescenza nella diagnostica della malattia tubercolare, per informarne quanti, cultori di tisiologia o di ricerche batteriologiche, in Italia non hanno avuto modo di conoscere, dalla letteratura straniera, le interessanti ricerche su menzionate.

TECNICA

Il metodo usato è quello indicato da KELLER; ta tecnica di colorazione è la seguente: il materiale da studiare viene strisciato nel modo solito sui porta oggetti, il più finemente possibile, e fissato alla fiamma e poi colorato con la soluzione di auramina per 10 minuti. Indi va lavato con acqua di fonte e poi trattato, per 3 minuti (2 se il preparato è molto sottile), con la colorazione alcoolica di acido cloridrico, infine lavato nuovamente e asciugato.

La soluzione di auramina si prepara sciogliendo, preferibilmente a caldo, 2 gr. di auramina in polvere in 1000 di acqua distillata aggiungendo 5 cc. di fenolo: la soluzione va conservata al buio. La soluzione alcoolica di acido cloridrico si ottiene aggiungendo a 1000 cc. di alcool a 96°, 4 cc. di acido cloridrico e 4 cc. di cloruro di sodio.

I preparati vanno osservati, entro breve tempo, e conservati allo scuro poichè, dopo un pò di tempo, specie se esposti alla luce, i bacilli di Koch perdono la caratteristica fluorescenza.

La messa a punto dell'apparecchio è, specie pei principianti, non sempre semplice. Consiglio di usare una camera buia, o un angolo particolarmente buio di essa, ponendo in tal caso uno schermo di riparo alla luce per mezzo di cartoni neri: ivi il microscopio con il suo corredo va installato ponendo la sorgente luminosa a 15 cc. circa dal microscopio. Accesa la lampada, prima di tutto consiglio di centrare bene il fascio di luce sullo specchio del microscopio il che si può vedere agevolmente levando l'oculare e osservando quando il fascio di luce riflesso dallo specchio giunge nitido e uniforme all'occhio. Conviene inoltre sollevare il tubo dell'oculare in maniera da rendere, con l'impicciolimento del fascio luminoso, tale fascio sempre più centrato sullo specchio. Si pone allora a posto l'oculare (serve ottimamente il n. 10) con il filtro apposito (fornito dalla casa) e si mette il preparato sul tavolino. Consiglio, non solo ai principianti, di tenere a portata di mano dei preparati ricchi di b. K. colorati con la fluorescenza (anche da culture) che servono molto bene a mettere a punto definitivamente l'apparecchio. Quando col preparato di prova si osservano nettamente i bacilli, con la loro caratteristica luce giallo-oro, rifrangente, si può cominciare la ricerca dei bacilli di Koch nei preparati sospetti. La luce viva della fluorescenza stanca l'osservatore e, però, dato l'adattamento visivo che si richiede, è bene compiere numerose osservazioni in una sola seduta. Si risparmia così notevole quantità

di tempo. È bene, da principio, dare uno sguardo d'insieme al preparato con l'obiettivo a 20 ingrandimenti. La luminescenza caratteristica dei bacilli si impone immediatamente, anche a piccolo ingrandimento, nel fondo scuro e permette poi, mediante centratura del preparato, di osservare con sufficiente chiarezza e sicurezza i b. K. stessi al successivo ingrandimento (obiettivo a 60 ingrandimenti) senza spostamento del preparato. Non occorre mai l'uso dell'immersione. Con l'uso dei 2 ingrandimenti si ottiene immediatamente un grande vantaggio che è quello di poter scorrere, in breve tempo e facilmente, tutto il vetrino porta-oggetti, cosa pressoché impossibile a farsi quando, come nei metodi colorimetrici normali, si deve far uso della immersione.

* * *

Gli esami da me fatti si possono dividere in due serie. In una *Prima Serie* mi sono studiato di rendermi padrone del metodo e ho esaminato per tanto tutto il materiale patologico che mi capitava in laboratorio e nel reparto, soprattutto espertorato, scegliendo all'inizio, i campioni su cui, la ricerca del b. K. aveva già dato esito positivo con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN. Man mano si andava affinando la mia tecnica ho lasciato da parte i campioni più positivi per scegliere invece quelli scarsamente positivi. In tali esami (200 e più) il risultato dei due metodi — colorimetrico e alla fluorescenza — ha dato esiti perfettamente sovrapponibili con la differenza che per il secondo — fluorescente — il tempo impiegato è sempre stato molto inferiore.

Una volta acquistata pratica l'esame si eseguisce celermente e con sicurezza: io non ho elementi sufficienti per ritenere, come da altri è stato detto, che si tratti di una colorazione di maggior numero di elementi bacillari; ritengo invece che il maggior guadagno sia dovuto più che altro alla possibilità di osservazione di un più grande campo microscopico dovuto all'uso di obbiettivi di minor ingrandimento.

In una *Seconda Serie* di ricerche, a differenza degli altri osservatori, ho scelto soltanto quei casi nei quali precedenti ricerche — eseguite nei reparti clinici — avevano dato esito negativo per la ricerca del b. K. col metodo di ZIEHL-NEELSEN e che venivano inviati in laboratorio per la prova di inoculazione in cavia e per la cultura. È questo un materiale che mi è parso particolarmente adatto alla ricerca per la sicura scarsità del reperto bacillare e per le considerazioni — d'ordine diagnostico e pratico — a cui si presta e delle quali dirò dopo i risultati.

Sono stati esaminati 241 campioni di materiale così divisi: 185 tra espertorati (la grandissima maggioranza) e succhi gastrici, 26 essudati pleurici, 26 liquidi di aspirazione endocavitaria, 2 urine. Tutti i campioni, dopo l'esame con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN e con la fluorescenza sono stati seminati sui terreni all'uovo (metodo e terreno di Petragnani) e inoculati in cavia. Tali prove dovevano servire da controllo alla ricerca diretta e dare un'esatta valutazione delle possibilità diagnostiche del metodo della fluorescenza. Nella letteratura citata infatti pochi autori danno dati precisi sui controlli biologici fatti al metodo: di questi dati alcuni sono incompleti, altri sono (come in DIDION) talvolta contrastanti, tal'altra, (come in HAGEMANN) non del tutto convincenti.

Mi pareva invece fosse molto importante stabilire esattamente quale fosse il guadagno in positività che si poteva ottenere col metodo della fluorescenza con risparmio di tempo e di denaro (in confronto delle prove biologiche).

I risultati degli esami si possono così riassumere.

Su 241 campioni di materiale furono positivi:

con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN . . .	18 =	7,04 %
con il metodo della fluorescenza	46 (+ 13?) = 18,	7 %
con le prove biologiche	81 =	34,02 %

Con le prove biologiche si rivelò insolitamente più sensibile la prova culturale (con 81 positività su 73) della prova di inoculazione in cavia: la cosa può mettersi in relazione con la prevalenza, nei campioni in esame, di materiale purulento pei quali la prova culturale si è rilevata particolarmente sensibile (BLECHMANN, HOHN); tale positività si avvicina inoltre — quasi si sovrappone — a quella già accertata altra volta nel materiale del nostro Istituto da DADDI (20), del 36,6%.

Un inconveniente di non poco conto rappresentano i 13 esami dubbi ottenuti con la colorazione all'auramina. Già DIDION ha richiamato l'attenzione su questo fatto segnalando 27 casi del genere cui non ha corrisposto il controllo biologico. Che si tratti, come egli accenna, di saprofitti che prendono il colore giallo-oro dell'auramina piuttosto che di bacilli di Koch morti, la cosa non ha grande importanza, certo è che obbliga ad essere molto oculati nell'interpretazione del reperto. Però mi pare esagerato quanto asserisce il DIDION che il metodo della fluorescenza consenta solo una diagnosi di dubbio che venga ulteriormente controllata con le prove biologiche perché allora, a questo dubbio, non si sottraggono neppure le altre colorazioni (ZIEHL-NEELSEN compresa) in quanto che la stabilità, se così possiamo chiamarla, del preparato colorato, non garantisce affatto la dinamicità del micro-organismo che può benissimo essere un b. K. ucciso. È ben noto infatti e PETRAGNANI (21) lo ha ripetutamente ricordato, che nettamente differenziandole è la morte del b. K. dalla lisi del suo corpo batterico, generalmente successivo alla prima, potendosi questa avverare con la conservazione perfetta dei caratteri morfologici e cromatici degli elementi bacillari. Il fatto poi che il reperto dei bacilli si sia verificato solo col metodo alla fluorescenza e non con la colorazione di ZIEHL-NEELSEN si può benissimo mettere in rapporto al già citato aumento del campo visivo che consente una ricerca più estesa.

I risultati di questi esami, eseguiti, giova ripeterlo, su un materiale speciale, appartenente a malati divenuti abacilliferi o in osservazione diagnostica, dimostrano dunque, in maniera chiara, l'utilità del metodo alla fluorescenza nella diagnostica della tubercolosi e ne raccomandano l'estensione.

Le percentuali da me ottenute si accostano sensibilmente a quelle rilevate da molti altri OO. (CLAUBERG, GÄRTNER, DIDION) e sono poco dissimili da quelle di HERMANN.

Un paragone con le osservazioni di HAGEMANN e KELLER non è possibile perché nei loro lavori non sono sufficientemente chiariti i rapporti tra il metodo della fluorescenza e le prove biologiche e culturali. Ove esse vengono citate si rileverebbe, nelle osservazioni di HAGEMANN e KELLER una sensibilità assai maggiore di quella da me rilevata. Questo può anche dipendere dal fatto, notissimo, che ogni metodo risponde meglio nelle mani degli AA.; la mancanza però di una precisa documentazione e il fatto che i miei rilievi collimano con quelli di molti altri osservatori che hanno controllato il metodo, mi induce a ritenere che i risultati da me esposti non debbono, con la me-

(20) DADDI G. — «Lotta c. tbc.», 1935, **6**, 577.

(21) PETRAGNANI G. e CITERNI M. — «Lotta c. tbc.», 1937, **4**, 305.

todica attuale, discostarsi di gran lunga dell'effettiva portata pratica del metodo stesso.

È evidente infatti che la prova della fluorescenza (46 positività) dà, di fronte alla colorazione di ZIEHL-NEELSEN (18 positività) un guadagno di 28 casi mentre fa risparmiare 35 prove biologiche e culturali il che, tradotto in percentuale significa una sensibilità, di fronte alla colorazione di ZIEHL di 11,66 volte maggiore e inferiore, a quella biologica, di solo 11,32 volte.

Se si tiene calcolo che la durata media di una prova biologica e culturale vede calcolata in 60 giorni (DADDI) e si tiene presente il notevole consumo di tempo o di denaro che essa richiede, appare ben interessante il rilievo da me eseguito che consente il risparmio di più di metà di dette prove concedendo una diagnosi precoce e un risparmio notevole economico. Soprattutto nei grandi centri sanatoriali, dispensariali e diagnostici ove il quesito della positività o meno del b. K. si affaccia quotidianamente con le sue incognite e richiede spesso, oltre a una diagnosi precisa, quello della celerità, il metodo della fluorescenza è destinato a prender piede e ad affermarsi.

Il metodo della fluorescenza consente di rilevare una positività del b. K. anche quando il bacillo è scarsissimo nel materiale in esame: ne è prova il fatto che moltissime culture corrispondenti agli esami positivi alla fluorescenza hanno dato luogo a crescita di rare colonie. Molto istruttivo, a questo proposito, un caso in cui alla fluorescenza fu visto un solo bacillo e al quale corrispose la crescita di una sola colonna su 6 provetti di terreno Petragnani mentre delle 2 cavie inoculate una sola fu positiva alla ricerca del b. K.

Stanno per il metodo della fluorescenza, in definitiva, la celerità del procedimento (risparmio di tempo), il guadagno in positività riguardo ai metodi normali (maggior finezza diagnostica) e la diminuzione delle prove biologiche (guadagno di tempo, risparmio di denaro).

Contro di e so sta il fatto surricordato di alcuni casi dubbi in cui furono riscontrati, nei preparati dell'auramina, dei bacilli giallo-oro coi caratteri del b. K. senza che le prove biologiche di controllo ne confermassero la sicura diagnosi. Se in questi casi si tratta di fenomeni di battericidio senza batteriosi (PETRAGNANI), il che appare possibilissimo, tale reperto nulla toglie al valore del metodo della fluorescenza in confronto a quelli colorimetrici usuali.

Per ovviare comunque a gran parte di questi inconvenienti io consiglio di fare quanto noi già abbiamo iniziato a fare da tempo in laboratorio, eseguire cioè almeno per 3 o 4 giorni consecutivi la ricerca del b. K. col metodo alla fluorescenza nel materiale sospetto. Se il risultato è sempre eguale negli esami successivi, considerarlo senz'altro definitivo, se si hanno dubbi procedere alla prova biologica e culturale. Così facendo si diminuiranno sempre notevolmente le costose e lunghe prove biologiche a tutto vantaggio della rapidità della diagnosi senza scapito alcuno della sua sicurezza.

RIASSUNTO

L'A. passa in rivista i lavori eseguiti sino ad oggi per la ricerca del b. K. nel materiale sospetto col metodo della fluorescenza. Espone poi i risultati delle sue ricerche nel materiale inviato per le prove biologiche dalle quali risulta un'effettiva maggiore sensibilità del metodo in esame di fronte alla ricerca diretta colorimetrica col metodo ZIEHL-NEELSEN (7,04 % contro 18,70 %), sensibilità che permette un risparmio di più di metà delle prove biologiche stesse (18,70 % contro 34,02 %). Mette infine in guardia contro la possibilità di errore.

RÉSUMÉ

L'A. passe en revue les travaux faits jusqu'a aujourd'hui pour la recherche du bacille de Koch dans du matériel suspect, avec la méthode de la fluorescence. Il expose le résultat de ses recherches sur le matériel envoyé pour les épreuves biologiques dont il résulte une plus grande sensibilité effective de la méthode en question de front à la recherche directe colorimétrique avec la méthode Ziehl-Neelsen (7,04 % contre 18,70 %), sensibilité qui permet une épargne des preuves biologiques de plus de la moitié (18,70 % contre 34,02 %). Il met enfin contre la possibilité d'erreur.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. fasst die Arbeiten zusammen die bis heute zur Untersuchung nach Kochbazillen in verdächtigem Material mit der Fluoreszenzmethode ausgeführt wurden. Er berichtet dann über die Ergebnisse seiner eigenen Untersuchungen an dem, jeweils für die biologischen Proben zugeschicktem Material, aus diesen geht hervor, dass genannte Methode effektiv eine grössere Sensibilität im Vergleich zur direkten kolorimetrischen Untersuchung mit der Methode nach Ziehl-Neelsen (7,04 gegen 18,70 %) besitze. Diese Sensibilität ermöglicht eine Ersparnis von mehr als der Hälfte der biologischen Proben selbst (18,70 % gegen 34,02 %). Zum Schluss warnt Verf. vor einer etwaigen Irrtumsmöglichkeit.

SUMMARY

The author reviews the various research work carried out up to date for the discovery of the Koch bacillus in suspect material by the fluorescent method. He gives the results of experiments on material sent for biological tests, which show the effectively greater sensibility of the method described, compared with the direct colorimetric research with the Ziehl-Neelsen method (7,04 % against 18,70 %), a sensibility that requires less than half the number of biological tests (18,70 against 34,02 %). The possibility of error is to be remembered.

RESUMEN

El autor pasa en revista los trabajos hechos hasta hoy en la sísqueda del bacilo de Koch en el material sospechoso, con el método de la fluorescencia. Expone los resultados de su investigación en el material enviado para las pruebas biológicas de las cuales resulta una efectiva mayor sensibilidad del método en examen en relación a la prueba directa colorimétrica con el método Ziehl-Neelsen (7,04 % contra 18,70 %) sensibilidad que permite en atención de mas de la mitad de las pruebas biológicas mismas (18,70 % contra 34,02 %). Pone, en fin en guardia contra la posibilidad de error.

58769



~~334700~~







