



Pincherle

ISTITUTO DI CLINICA PEDIATRICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Direttore: Prof. MAURIZIO PINCHERLE

Alcune osservazioni sul ciclo evolutivo del bacillo tubercolare

Dott. MARIO SCARZELLA - Assistente volontario

Estratto dal *Bollettino dell' Istituto Sieroterapico Milanese*

Fascicolo III-IV — Marzo-Aprile 1931

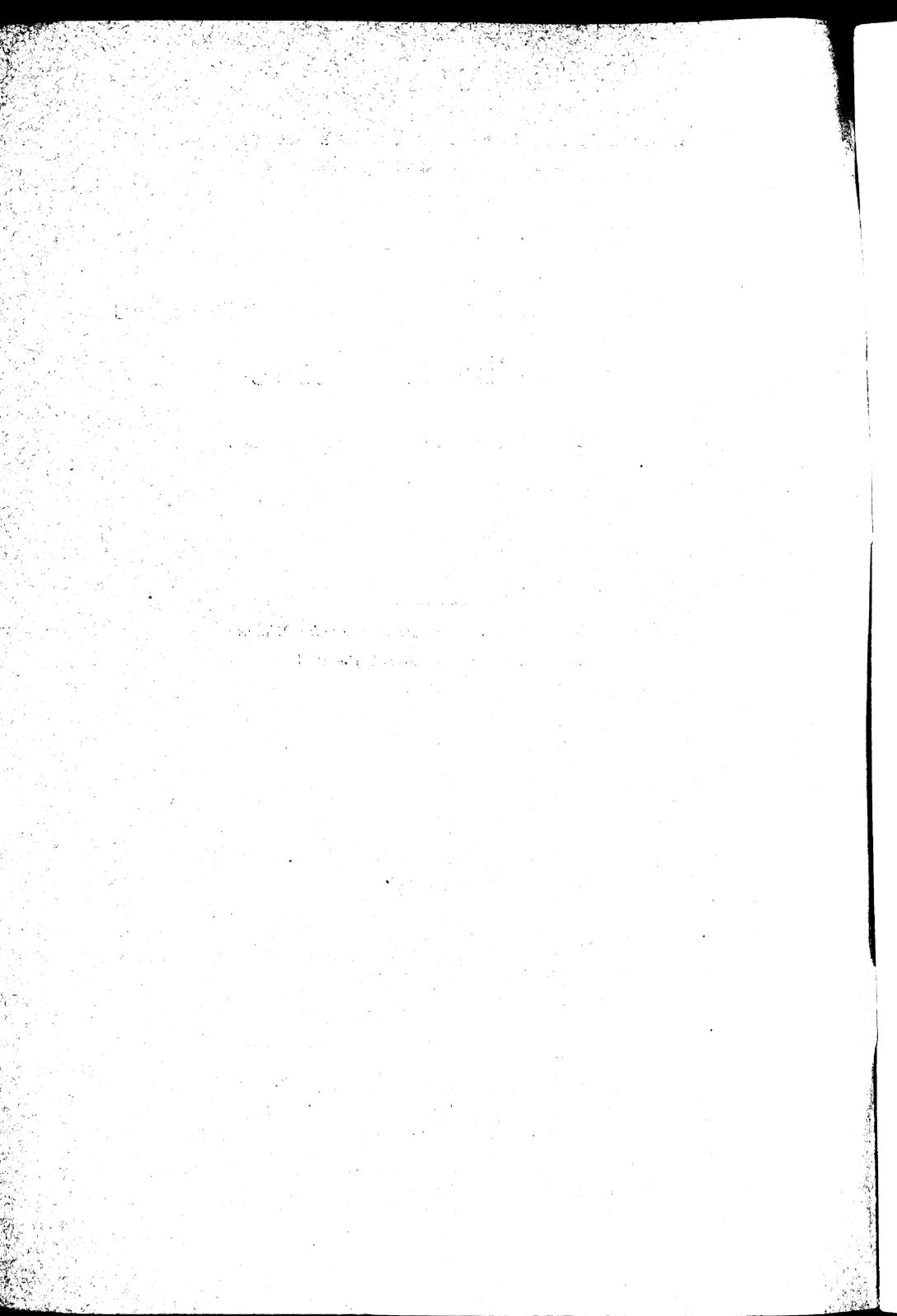


(I.G.I.S.) Industrie Grafiche Italiane STUCCHI (Soc. An.)

MILANO

16 - Via S. Damiano - 16

1931



Alcune osservazioni sul ciclo evolutivo del bacillo tubercolare

Dott. MARIO SCARZELLA - Assistente volontario

ISTITUTO DI CLINICA PEDIATRICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Direttore: Prof. MAURIZIO PINCHERLE

Secondo il concetto classico, germe specifico della tubercolosi è ritenuto un bacillo, il bacillo di Koch; esso ha la forma di un sottile bastoncino, immobile, la cui lunghezza di solito varia da 1,5 a 3,5 micron, talvolta da 0,5 a 8 micron (Eastwood) (1) mentre lo spessore è di circa 3 micron; il bacillo può trovarsi isolato oppure in gruppi di due o tre, talvolta in piccoli ammassi irregolari; la maggioranza dei bacilli è libera, la loro forma è ben visibile solo quando sono colorati e si mostrano allora, spesso, ricurvi e granulosi.

La colorazione li fa apparire più voluminosi, perchè il loro protoplasma fissa i colori con molta intensità, benchè in modo ineguale, di modo che certe parti del bacillo restano trasparenti, mentre altre rimangono opache; le parti trasparenti rassomigliano a granuli che sono stati in passato considerati come spore (Spengler) (2), Koch (3).

La membrana che avvolge il bacillo è in parte costituita da materie grasse e da una specie di cera, a cui il bacillo deve la doppia proprietà di non essere che difficilmente impregnabile a freddo, da parte di alcuni colori di anilina, e di non lasciarsi decolorare, quando, fissato un colore, lo si sottomette alle azioni di reattivi decoloranti.

Ehrlich (4-5) il quale, come è noto, rese popolare la colorazione di questo microrganismo, spiega tale speciale comporta-

mento del bacillo della tubercolosi ammettendo la presenza di una capsula che permetta il passaggio agli alcali e non agli acidi. La resistenza della capsula veniva dedotta da lui dal fatto che, se si esegue una colorazione con fuxina basica disciolta in acqua di anilina e si differenzia il preparato immergendolo in una soluzione di acido nitroso, il bacillo mostra uno spessore maggiore che se non colorato con altri metodi.

FORME RAMIFICATE E CLAVATE. — Il germe della tubercolosi, sia nelle colture che nei tessuti, oltre che il tipico aspetto del bacillo di Koch, può assumere forme diverse, da alcuni considerate come regressive, da altri come forme di sviluppo. La prima osservazione in proposito è dovuta a Petrone (6), il quale trovò in un caso di meningite tubercolare, nell'«essudato», forme del bacillo di Koch allungate e con rigonfiamenti terminali, nonchè forme ramificate ed avanzò l'ipotesi che il bacillo della tubercolosi non appartenesse in senso stretto ai batteri, ma che dovesse essere invece collocato fra gli schizomiceti ed i micomiceti.

Nocard e Roux (7) confermarono la presenza, nelle vecchie colture di bacilli della tubercolosi su agar glicerinato, di forme provviste di appendici laterali distaccantisi ad angolo retto e terminanti a bacchetta di tamburo.



Metschnikoff (8) fu il primo a riprendere di proposito lo studio della morfologia del germe della tubercolosi aviaria, coltivato in agar glicerinato e siero di sangue, a 49 gradi, e del germe della tubercolosi dei mammiferi, coltivato in siero di sangue di cane. L'autore riferisce di aver osservato in esse, come anche nelle vecchie culture (un anno e sette mesi) in brodo glicerinato, forme di bacilli tubercolari rassomiglianti a bacchette di tamburo, aventi alle estremità corpiccioli rotondi, chiaro spendenti, che ricordano le spore del carbonchio.

Il modo di comportarsi di queste forme verso le sostanze coloranti ed il presentarsi di esse, sia in colture vecchie, che in colture relativamente giovani, per effetto di una sostanza stimolante contenuta nel terreno nutritivo, gli fecero supporre che tali forme fossero in rapporto con la fruttificazione del germe e che potessero avere il significato di conidi; egli conclude che il germe della tubercolosi è un germe saprofito polimorfo, che, nell'organismo animale, per la costanza delle condizioni di nutrizione, prende sempre una stessa forma. Sul posto che gli spetta in sistematica, l'Autore dice che esso, a ragioni di termini, non è un bacillo, non un cladotrix, è invece un organismo simile all'Actinomyces.

Maffucci (9) in un importante lavoro, nel quale, per primo, stabilì una netta distinzione fra tubercolosi umana ed aviaria, rilevò queste forme ramificate e formulò l'ipotesi che il germe della tubercolosi non sia un bacillo, nel senso stretto della parola, ma un microrganismo più complesso, vicino all'actinomyces, che, nello stadio di vita parassitaria, assume la forma bacillare e, in speciali condizioni, più vicine a quelle della vita saprofitica, ripresenta la forma originaria della specie. Dopo il Maffucci, altri autori: Fischel (10), Coppen Jones (11), Hajo Bruns (12), Babes (13), Klein (14), Semmer (15), Dixon (16), Marpmann (17), Otto Schultze (18), Arloing (19), Pehu e Rajot (20), D. Pane (21), D'Arrigo (38), hanno compiute ricerche su questo argomento: dall'insieme dei loro lavori risulta che il bacillo della tubercolosi può presentare forme di lunghezza superiore alla norma (sino a 10 volte), forme allungate con ingrossamento terminale a forma di bacchetta di tamburo ed a clava, e forme con una,

due, tre ramificazioni laterali ad angolo retto, constatabili con sicurezza in condizioni nelle quali si può escludere la confusione con eventuali sovrapposizioni, ad angolo, di germi distinti (Sander) (163).

Friederich (23) estendendo l'esperienza, di cui sopra, agli animali, poté osservare, come Petrone aveva già illustrato nella meningite tubercolare, che il germe della tubercolosi può dar luogo, nei tessuti, a focolai molto simili, nell'aspetto d'insieme, a quelli dell'actinomyces, costituiti da una massa centrale di bacilli addossati gli uni agli altri, con note degenerative, e di una zona periferica formata da elementi allungati, spesso ramificati, con le estremità distali ingrossate a clava, disposti regolarmente come una raggiera. Questo reperto fu confermato negli esperimenti su animali, con diverse modalità, da Babes e Levaditi (24), Schultze (25), Lubarsch (26), Moeller (27), D. Pane (21), D'Arrigo (38). Dai lavori di questi Autori, si apprende che i focolai su descritti, spesso, sono in parte inglobati dentro il corpo di cellule giganti o circondati da gruppi di cellule epitelioidi; più di rado si trovano in rapporto con elementi di infiltrazione: linfociti o plasmazellen.

Le forme ramificate e clavate sono ammesse da tutti quelli che si sono occupati della morfologia del bacillo tubercolare, ma non vige però l'accordo sulla natura di esse. Metschnikoff (8), come già vedemmo, crede, in base alle sue ricerche, che il germe della tubercolosi sia da considerarsi come affine all'actinomyces e con lui concordano Fischel (10), Coppen Jones (11) e Babes (13); Bruns (12), crede che sia una cladotrix; altri autori ritengono che le forme clavate siano manifestazioni degenerative del germe, e pongono questo fra le batteriacee; vi è infine chi lo colloca addirittura fra gli ifomiceti (Neumann e Lehmann (29)). Bostroem (30), invece, basandosi sui risultati negativi delle sue esperienze, mette in dubbio la esistenza di tali forme ed avanza la ipotesi che dette produzioni non abbiano alcuna relazione col bacillo della tubercolosi; Sander (66) ritiene le forme ramificate dovute alla sovrapposizione di diversi individui.

Più recentemente Sanfelice (31) isolava, a temperatura ambiente, dalla milza di cavie morte per tubercolosi, in seguito all'inocu-

lazione di bacilli tubercolari virulenti, culture, che, esaminate al microscopio, con preparati a striscio colorati con lo Ziehl-Gabbet, si mostrarono costituiti da filamenti, con rare ramificazioni, in parte acido-resistenti, in parte non acido-resistenti; alcuni dei filamenti terminali erano leggermente rigonfiati a clava. Da queste colonie, trapiantate in agar, si sviluppavano, in seguito, colonie tipiche di streptotrix con orlo costituito da un fitto intreccio di filamenti; queste streptotrix inoculate ad animali da esperimento non dimostrarono però poteri patogeni. Maggiore ed Ilvento (32) in ceppi di bacilli della tubercolosi umana, conservati per otto mesi, di trapianto in trapianto, in terreno di Lubenau, hanno osservato forme bacillari lunghe, acido resistenti, con accenno alla ramificazione, che essi considerano come involutive.

CORPI FUXINOFILI. — Negli strisci di espettorati allestiti con i soliti metodi di Ziehl-Nielsen, Ziehl Gabbet, per la ricerca del bacillo di Koch, compaiono spesso dei corpuscoli speciali, i quali assumono intensamente la fuxina basica e resistono allo scoloramento con gli acidi. Questi corpi precederebbero la comparsa del bacillo di Koch, si accompagnerebbero talvolta ad esso ed apparirebbero spesso in espettorati che in seguito riveleranno la presenza del bacillo.

In un lavoro del 1914, Mircoli (39) accenna a forme frammentarie, più o meno colorabili con lo Ziehl, ma molto scarse, senza alcun bacillo tipico della tubercolosi, rintracciate in un caso di tubercolosi ossea; Lopresti-Seminario (35), in un caso di linfogranuloma maligno, nota la presenza di inclusioni che si riscontrano per lo più nelle cellule tipo Sternberg e raramente in cellule endoteliali vasali; tali inclusioni sono rappresentate o da nuclei assunti per fagocitosi in varia fase degenerativa, o da speciali corpuscoli i quali si rendono particolarmente evidenti col metodo di Ziehl Nielsen e col metodo di Gram e Much, mentre con i comuni metodi non sono apprezzabili.

La grandezza e la distribuzione di queste forme escludono la possibilità che possa trattarsi di granuli di Much. Più recentemente, in un reperto di biopsia, in un caso di linfogranuloma maligno descritto da

Brusa (36), il mio compianto Maestro Prof. Francioni, ha notato speciali formazioni extra ed intracellulari, talora numerosissime, rotondeggianti od ovali, del diametro da 2 a 5 micron, che Francioni giudicò con ogni probabilità di natura protozoaria.

Pietro Maria Franco (33) che si è occupato a lungo dei corpi fuxinofili, su 607 espettorati diversi, di cui alcuni anche dello stesso infermo, in varia evoluzione del male, ha potuto, soltanto in 103 casi, cioè nel 16,20 % metterli in evidenza, talvolta in numero assai esiguo e soltanto con pazienti e prolungate ricerche. Dei 103 casi, in 65, i corpuscoli si accompagnavano con bacilli di Koch, per lo più di piccola forma, lisci, di rado grosso granulari, in altri 38 non vi era accenno di bacilli. Di queste 38 osservazioni 23 presentarono granuli fuxinofili vari mesi o qualche anno prima che apparissero bacilli; 15 presentarono granuli fuxinofili dopo che i bacilli erano completamente scomparsi anche all'osservazione di preparati omogeneizzati con antiformina.

Secondo P. M. Franco (33-37) i corpi fuxinofili avrebbero i seguenti caratteri: 1° forma quasi sempre rotonda, o solo lievemente ovoidi; 2° grandezza variabile da quella di un gonococco a quella di una piccolissima emazia; questa grandezza li distingue, a parte le reazioni cromatiche, dai granuli di Schron-Mireoli Much, i quali sono molto più piccoli; 3° si presentano quasi sempre isolati, raramente possono anche ritrovarsi intatti o in via di disfacimento nell'interno di grossi macrofagi; 4° non presentano mai fenomeni di gemmazione nè assumono le speciali colorazioni per i blastomiceti; non devono quindi essere confusi con questi; 5° non rispondono alle reazioni per i grassi neutri (acido osmico, Sudan III) e probabilmente nulla hanno di comune con questi. Sembra che reagiscano con l'acido osmico e rosso mogano con il Sudan III, dopo cromizzazione, al pari dei granuli lipoidi; 6° non assumono i colori acidi di anilina, il rosso delle soluzioni alla Romanowsky e non devono venir confusi con residui granulari di emazie, che, in seguito a speciali modificazioni, sogliono resistere anche allo scoloramento con gli acidi; 7° oltre ad essere acido-resistenti, sono alcool-resistenti. Si vedono sempre nei preparati scolorati con alcool (Ziehl-Heubner-Nielsen;

Ziehl-Nielsen, ecc.); 8° resistono all'antiformina, sebbene molto meno dei bacilli di Koch. Per le altre note di alcool ed acido-resistenza, devono considerarsi, se non affatto simili, almeno analoghi ai bacilli di Koch, almeno in quanto concerne le reazioni fisico-chimiche; 9° perchè spesso precedono e seguono i bacilli di Koch, di cui non si riesce a trovare traccia neppure nei preparati sottoposti ad arricchimento antifornico, acquisterebbero un grande valore diagnostico e prognostico.

I GRANULI DI SCHRÖN, MIRCOLI, MUCH. — Nel 1886, al Congresso dei Naturalisti e medici di Berlino, von Schrön annunciava che il bacillo della tubercolosi, oltre che con la forma nota di bacillo acido-resistente, può presentarsi sotto forma di granuli o di catene di granuli colorabili con il metodo di Gram, partecipanti attivamente ai fenomeni di riproduzione del bacillo.

Un suo allievo, il D'Arrigo (38), nel 1900, estendendo le ricerche dello Schrön a quasi tutti gli organi e tessuti umani, nelle diverse età e nelle più svariate forme morbose tubercolari, metteva in evidenza, oltre alla diversità di forma del bacillo di Koch, anche il diverso comportamento della colorazione, a seconda dell'età dell'infezione, del decorso della malattia e della sede anatomica.

Contemporaneamente a queste ricerche della scuola napoletana, Mircoli (39) nel 1900 descriveva, in un suo lavoro «le modificazioni morfologiche streptococciformi del bacillo di Koch ed il loro significato prognostico».

Ma queste ricerche, per la prevalenza del concetto Kochiano della unicità e semplicità di forma del bacillo tbc., rimasero quasi del tutto sterili e dimenticate.

Nel 1907 Much (40-41) illustrava una speciale forma di virus tbc., costituita da granuli Gram-positivi, non colorabili con lo Ziehl-Nielsen che poteva da sola rappresentare l'agente della tubercolosi in tessuti ed organi affetti da tbc. perlacea, e che, attraverso fasi di passaggio, riusciva a riacquistare la forma bacillare acido-resistente. Tali forme poté in seguito constatare anche in tre casi di tbc. umana.

Bastò la voce di Much per incitare a tali ricerche, e numerosi autori Italiani e stra-

nieri si occuparono di studiare «i granuli di Much», denominazione con cui non si esitò ad accogliere le forme descritte dall'A. Tedesco, senza por mente che esse erano già state descritte anni prima da autori Italiani.

Mentre dalla maggioranza degli AA. si ammette ora la presenza, in particolari condizioni, di granulazioni nel corpo del bacillo tubercolare, la discussione rimane aperta sulla natura e sul significato dei granuli stessi. Secondo Much la forma granulata rappresenterebbe una varietà particolare del virus tbc., tale forma sarebbe inoltre assai virulenta. Questa opinione che ha ottenuto il favore di Wirths (42), Schottmuller (43) e di altri AA., fu invece contraddetta dal Mircoli (39) che, giustamente rivendicando a sé la paternità della scoperta dei granuli, sostenne che il virus granulato deve essere considerato come una forma di bacillo attenuato.

Secondo alcuni AA. i granuli di S. M. M. non devono essere considerati come forme bacillari a sé, ma bensì come uno stadio di degenerazione del bacillo tbc. che, attaccato dagli elementi di difesa dell'organismo e specialmente da un fermento lipolitico (Neumann e Matson (44), De Martini (45), Weil-Dufourt-Arloing (46) elaborato da linfociti, perderebbe la forma acido-resistente per assumere quella di granulazione (Bergel (47), Krylow (48), Peter (49), Matozzi e Scafa, Tallo (50). Per altri AA. i granuli non sono altro che forme evolutive del bacillo tbc. In favore di questa ipotesi starebbero le esperienze di Montanari (51), Hauduroy e Vaudremer (52-53) e quelle recenti di Periti (54) i quali riuscirono a mettere in evidenza nella milza e nelle ghiandole di cavie inoculate con filtrati tbc., e nelle culture, ottenute con la semina di detti filtrati, forme tipicamente granulari.

Bezançon e Philibert (55), Trimarchi (56), Knoll (57), Spengler (58), credettero di identificare i granuli di S. M. M. con le spore. Knoll cita in favore di questa ipotesi il fatto che, mediante la doppia colorazione, è possibile riconoscere delle forme costituite da un solo nucleo colorato in bleu, il quale mostra delle piccole porzioni di protoplasma, sia da uno che da entrambi i lati, intensamente colorate in rosa.

Babes (59) considera i granuli di S. M. M. come forme di resistenza aventi proprietà

metacromatiche e sostiene inoltre che esse sono proprie non solo del bacillo tubercolare, ma anche di altri bacilli acido-resistenti, ad es., del bacillo della lebbra.

Meyer identifica i granuli con la cosiddetta *volutina*, di cui sono costituite le sfere dello « spirillum volutans » e le chiama « granuli di volutina » e li ritiene sostanza di riserva di natura probabilmente proteica.

Deyce (61) sostiene che la forma granulata trovata da Much è la primitiva fondamentale del bacillo tbc.; Weil (46), pur ammettendo una forma granulata del bacillo tbc., nega che tali forme esistano in vivo.

Bittoorf e Momose (62) considerano i granuli come corti bacilli ed escludono ogni differenza tra i due tipi, quello bacillare e quello granulato.

Borghese (63), in uno studio sui rapporti tra la tbc. umana e quella aviaria, trovò che in quest'ultima si mettono in evidenza, nei tessuti colpiti, prevalentemente forme granulati e spesso solo queste ultime; basandosi sul fatto che il granulo, quale forma attenuata, è capace di originare il tubercolo, ne trae la conclusione che l'agente della tubercolosi aviaria deve essere considerata non come una forma a sè, ma come il tratto di unione tra la forma descritta da Much ed i bacilli acido-resistenti.

Durante lo scorso anno (64-65), studiando le variazioni delle forme bacillari tubercolari acido-resistenti in rapporto a quelle granulati di Schrön-Mircoli-Much, in vari prodotti patologici contenenti bacilli tubercolari, nei vari stadi della infezione tubercolare, potei osservare: 1° che nella quasi totalità dei bacilli tubercolari si possono mettere in evidenza dei granuli aventi netti i caratteri di quelli di Schrön-Mircoli-Much, i quali scompaiono solo quando il bacillo vada incontro a processi degenerativi; 2° che esiste uno stretto rapporto fra granuli e bacilli, rapporto che si rivela nella indissolubilità dei granuli dal restante corpo bacillare, per cui questi non possono vivere separati da quello; 3° che i granuli non sono acido resistenti. Basandomi sul comportamento del bacillo tubercolare di fronte alla colorazione col May-Grunwald-Giemsa, col semplice Ziehl Neelsen e col Neisser-Gins e sul reperto di granuli di cromatina, aventi le stesse proprietà di quelle di Schrön-Mir-

coli-Much, in altri bacilli, acido o non acido resistenti, stimai logica la deduzione che detti granuli potessero essere considerati quali normali componenti del bacillo tubercolare, partecipanti attivamente ai suoi fenomeni di moltiplicazione.

IL BACILLO ALFA ED IL CICLO DI FERRÀN 1897.

— J. Ferràn (66-67-68-69) coltivando in particolari matracci, in brodo a mano a mano più povero di glicerina, di peptone e di glucosio, il bacillo di Koch, che egli chiama « gamma », ed agitando quotidianamente le culture, osservò che qualcuna di esse (cosa che non accade mai con le comuni culture di bacilli tubercolari) si intorbida. L'intorbidamento era dovuto ad un particolare tipo di bacillo che, secondo l'A., pur conservando immutata l'acido-resistenza e le altre proprietà, si differenzia dal tipico bacillo di Koch, per la proprietà appunto di emulsionare il brodo in cui è coltivato; egli chiamò questo bacillo « delta ». Coltivandolo negli stessi mezzi culturali del bacillo di Koch osservò che esso poteva perdere la sua acido-resistenza acquistando proprietà morfologiche analoghe a quelle dei bacilli del gruppo tifo-coli. A questi diede il nome di « Epsilon ».

Inoculando i bacilli « Epsilon » a cavie, poteva vedere che essi acquistavano proprietà analoghe a quelle del bacillo di Koch e producevano il quadro di una tipica tubercolosi; egli chiamò questo « ciclo evolutivo discendente del bacillo di Koch ».

Accanto alle forme discendenti Ferràn ha descritto nei germi, del tipo tifo-coli, che egli chiama « alfa », una fase ascendente. Questi bacilli « alfa » sono privi di acido-resistenza, però quando sono virulenti, producono tossine che determinano infiammazioni viscerali spesso mortali; detti bacilli producono questi disturbi, sempre secondo Ferràn, assumendo sostanze lipoidi tossiche che li trasformano in tipici bacilli di Koch. Dopo un lungo soggiorno nell'intestino dell'ospite, i bacilli alfa modificano alquanto i loro caratteri morfologici primitivi; non si impregnano più con facilità con i vari colori, e si sviluppano difficilmente nelle culture; a questi bacilli, che non sono più acido-resistenti ed occupano un posto intermedio fra i primitivi bacilli alfa ed il bacillo di Koch, l'A. diede il nome di bacilli Beta

ed al bacillo acido-resistente di Koch, che gli corrisponde, il nome di *gamma*. La trasformazione del bacillo alfa in bacillo gamma avverrebbe solo in vivo.

Quando il bacillo gamma invade il nostro organismo, lo rende sensibile all'azione tubercolina, senza però produrre, di necessità, una infezione tubercolare; questo spiegherebbe, secondo il Ferràn, il numero rilevante di cuti-reazioni positive che si hanno negli adulti.

I bacilli del gruppo alfa, non acido-resistenti, producono nel nostro organismo tossine e danno luogo alla formazione di anticorpi e di sostanze immunizzanti; i bacilli acido-resistenti, gamma, invece producono il tubercolo, ma non danno luogo alla produzione di sostanze immunizzanti; questo spiegherebbe, secondo l'A., l'insuccesso della tubercolina e di tutti gli agenti che sono stati messi in opera contro il bacillo di Koch.

Auclair (72), nel 1903 in una sua memoria, confermò, in parte, le ricerche di Ferràn: egli ottenne, partendo da una cultura di comuni bacilli di Koch, un bacillo che si sviluppava in culture omogenee, cresceva rapidamente sui comuni terreni di cultura, specie alla temperatura di 37°, e rassomigliava al bacterium coli. Secondo le esperienze dell'A. queste varietà saprofitie non erano virulente per la cavia e per il coniglio: dopo inoculazioni ripetute, però, gli animali finivano col soccombere, dopo parecchi mesi, per cachessia, senza presentare lesioni nodulari degli organi.

Auclair non riuscì a trasformare il suo bacillo saprofita in bacillo di Koch: egli spiegò ciò con il fatto che il suo bacillo aveva acquistato caratteri fissi di saprofitismo.

Vaudremer (73-74), più recentemente, ha ottenuto modificazioni analoghe coltivando il bacillo tubercolare in profondità, in brodo di patata, senza glicerina; quest'A. ottenne forme ramificate simili ai bacteri delle leguminose, che prendevano il Gram e si coloravano colla più grande facilità; riportati su patata glicerinata questi microbi riprendevano, nello spazio di dieci giorni, l'aspetto e la virulenza del bacillo di Koch.

Leo Monfas (75) ha descritto nel 1921, ben 75 varietà di coli di cui alcune appunto trasformabili in bacilli di Koch.

Il bacillo della tubercolosi secondo le vedute di Ravetlat-Pla (1924). — Secondo Joaquin Ravetlat e R. Pla J Armengol (76) il bacillo della tubercolosi si presenta, nell'organismo, sotto tre forme differenti le quali avrebbero una particolare importanza nella evoluzione del processo; queste forme sono:

1° La forma di attacco.

2° La forma intermedia o di trasizione.

3° La forma di resistenza o bacillo di Koch; queste tre forme, tra loro reversibili, si trovano costantemente nella lesione tbc. e costituiscono, secondo gli Autori, forme differenti di una stessa specie bacterica.

FORMA DI ATTACCO (fig. 1). — È rappresentata da un cocco che, sui terreni liquidi, può presentarsi sia isolato sia sotto forma di diplococco, di streptococco o di tetrad; la forma più comune è quella del diplococco; su terreni solidi si presenta quasi sempre con l'aspetto di diplococco e di diplostreptococco, poco mobile, si colora bene con tutti i colori basici di anilina, non è acido-resistente; quando proviene direttamente dal bacillo di Koch è gram positivo, talora può essere gram negativo. Quando proviene direttamente da un organismo tubercoloso cresce lentamente e richiede terreni particolari e temperature di termostato; quando invece è «adattato» si sviluppa rapidamente anche su terreni poveri, alla temperatura ambiente ed intorbidata le culture, e, talvolta, produce alla superficie di esse un velo. La migliore temperatura di germinazione è a 36°-38°, però il bacillo si sviluppa, meno bene, anche a temperatura di 2-3 gradi e di 40-41 gradi; la sua resistenza agli agenti esterni è tanto maggiore quanto più grande è la sua virulenza; ha inoltre il potere di attraversare le candele di Chamberland e di Berkefeld. La sua virulenza non è uguale per tutti gli animali da esperimento, ma è maggiore per l'animale da cui è stato isolato; la sua virulenza diminuisce se lo si conserva in terreni artificiali. Negli animali le dosi mortali di culture di «forme di attacco» determinano processi infiammatori multipli ed una rapida cachessia che si fa ancora più apprezzabile se l'animale tarda parecchio tempo a morire.

Le dosi inferiori a quella mortale producono effetti differenti; così la cavia passa qualche settimana senza presentare appa-

rentemente alcun disturbo; sacrificata non presenta allora lesioni macroscopiche. Dopo parecchi mesi però gli animali vanno incontro ad una progressiva cachessia, presentando le stesse lesioni delle dosi mortali; in queste condizioni si possono trovare dei tubercoli ma è difficile che si producano con una sola iniezione di materiali contenenti forme di attacco.

FORMA INTERMEDIA O DI TRANSIZIONE. — Sotto il nome di forma intermedia gli AA. comprendono:

1° La fase germinativa del bacillo di Koch nelle culture, corrispondenti alle forme non acido-resistenti (forme giovani o bacilli primitivi) descritte da Marmorek, Borghesi, Krjlow, Bacigaluppo, e recentemente da Bezançon e Philibert sotto il nome di sostanza cianofila.

2° I granuli di Much, che gli AA. considerano come forma a sè.

3° Le granulazioni intracellulari del pus, rappresentanti le forme di attacco, che, trovandosi in condizioni di vita sfavorevoli, per l'azione delle sostanze difensive esistenti negli accumuli cellulari, si trasformano in forme di resistenza.

IL BACILLO DI KOCH rappresenta, per questi AA., la forma che il virus tubercolare assume quando si trova in condizioni di vita sfavorevoli.

Concludendo secondo questa concezione la forma di attacco è una forma dotata di potere « aggressivo », si trova nei processi acuti e si può isolare da tutte le lesioni attive; la forma intermedia è la forma in cui il virus tubercolare passa in condizioni di vita sfavorevole, e la si trova di preferenza nel pus; il bacillo di Koch rappresenta la forma di resistenza del virus tubercolare.

Per facilitare la comprensione di questa e delle seguenti teorie, riporto il grafico disegnato da Velez (84) (fig. 2); nella parte centrale un triangolo schematizza la teoria evoluzionistica di Ferràn; al di fuori di essa, un quadrato sintetizza il polimorfismo reversibile delle forme di Ravetllat-Pla. Circoscrivendo queste due figure si ha il circolo di Velez come rappresentazione schematica della sua teoria sul metavirus (v. in seguito).

CIRCOLO DI VELEZ. — La parte inferiore di questo circolo rappresenta il proto virus o proto bacterio, comprendente la forma filtrante e le forme di attacco; il secondo arco è formato dal mesovirus, comprendente le forme intermedie della precedente classificazione; verrebbe in seguito il virus normale o normovirus, che comprende la forma classica di Koch o bacillo gamma di Ferràn o forma di resistenza di Ravetllat-Pla; da ultimo i metabatteri o metavirus comprendenti le forme ramificate di Metchnikoff (8), Schultze (25), le forme raggiate di Babes e Levaditi (24), ecc.

Secondo De Almeida Magalhães (85-86), il virus tubercolare si può presentare nelle lesioni attive, sotto forme diverse, di cui il bacillo acido-resistente, il micrococco di Ravetllat-Pla e l'ultra virus di Fontes, rappresentano le varie fasi evolutive; le forme filtranti sarebbero responsabili della setticemia tubercolare, il micrococco delle forme infiammatorie, ed il bacillo di quelle distruttive; dalla prima si può passare, attraverso il micrococco, a l'ultima (ciclo progressivo) o viceversa (ciclo regressivo) (fig. 3).

ULTRA VIRUS TUBERCOLARE. — L'esistenza di una forma filtrabile del virus tubercolare, nonostante la mole non indifferente di lavori sperimentali che su questo argomento sono comparsi in questi ultimissimi anni, non è ammessa pacificamente da tutti gli Autori che hanno trattato questo argomento.

La scuola francese, con a capo Calmette, e quella spagnola di Ravetllat-Pla, sono unanimi nell'ammettere l'esistenza di una stadio filtrabile del bacillo tubercolare, tanto che Calmette ha potuto stabilire che i filtrati di cultura, di sputi, di pus, di essudati pleurici, di urine tubercolari ecc. contengono elementi invisibili, non coltivabili con i mezzi attuali, virulenti e tubercoligeni, quando sono iniettati negli animali, in cui producono delle lesioni, più o meno specifiche, talvolta con la presenza di bacilli tubercolari acido-resistenti.

In Germania, in America, ed anche in Italia, studi di controllo di numerosi autori, di indiscutibile valore, quali ad esempio tra noi il Petraghani, portarono a risultati del tutto contraddittori i quali vennero ad inframare l'esistenza dell'ultra virus.

Da alcuni Autori è stato obiettato che il

reperto di bacilli acido-resistenti negli strisci di ghiandole di cavie inoculate con virus filtrabile non ha un valore assoluto, perchè forme acido-resistenti si possono riscontrare anche nelle ghiandole perfettamente sane (nella proporzione del 33% secondo Petroff (87). A questa affermazione si è opposta la Rabinovitsch dimostrando che la tubercolosi spontanea delle cavie, se l'igiene delle stalle è ben mantenuta, è rarissima e da un quadro del tutto diverso da quello dell'inoculazione del virus tubercolare filtrabile. De Santis Monaldi (89), su 92 cavie esaminate, comunque venute a morte, non ha mai trovato bacilli acido-resistenti, tipici od atipici, nel sistema ghiandolare linfatico, e reperto negativo hanno avuto pure Zlatogoroff (90), Mellon e Jost (91), Selter-Blumemberg (92), Keller e Werthmar (93), Jan Van Der Cee (94), Lange e Klauberg (95), Selter e Blumemberg (92) hanno interpretato i reperti positivi come dipendenti dal passaggio, attraverso le candele, di qualche bacillo di resistenza attenuata e forse anche di scheggie bacillari (Bazillen-Splittern); Valtis (101-102-103-104) fa però notare come la tubercolosi da virus filtrabile non sia affatto paragonabile alla tbc. sperimentale delle cavie, quale si dovrebbe avere per il passaggio del bacillo o di minime particelle di esso, attraverso le candele porose; manca inoltre, particolarmente, la lesione di tipo ulcerativo, in corrispondenza del punto di inoculazione, e l'adenopatia.

La dimostrazione sperimentale di una trasformazione, in vivo, dell'ultra virus non tubercoligeno, in bacilli tubercoligeni, è stata data dagli Autori francesi (Nègre-Bouquet e Certonciny (96), Arloing e Dufourt (97), Saenz (98-99), Durand-Kourilski-Benda (167), ecc.) mediante successivi passaggi negli animali; tuttavia quando gli animali sopravvivono più di due mesi, alle iniezioni di filtrati, scompaiono dagli organi i bacilli tubercolari tipici (Saenz); si può allora avere la guarigione, se non si provvede, mediante successivi passaggi in altri animali, al ristabilirsi della virulenza iniziale. Una documentazione sperimentale, che parla in favore della stretta parentela tra bacillo di Koch e virus filtrabile, è data dall'esistenza di un vero fenomeno di Koch, con escare, in cavie inoculate con filtrati di culture e di prodotti tbc. (Debré-Lelong e Bonnet) (100),

Valtis, Saenz e De Sanctis Monaldi (101) e la dimostrazione di anticorpi tbc. nei filtrati di organi di feti di nati da madre tbc. (Valtis e Lacomme) (104).

Le culture del virus filtrabile, nella grande maggioranza dei casi, diedero risultati negativi: Vaudremer in collaborazione con Hauduroy (105-106) descrisse in substrati molto poveri di sostanze proteiche e senza glicerina, lo sviluppo di forme filamentose con i caratteri che abbiamo più sopra descritti; queste esperienze furono confermate solo dalla Toguonoff e da Kirchner.

Per Mudd e Fessner (109-110) le forme osservate da Vaudremer non devono essere considerate come micro organismi ma come precipitati; anche Calmette non è convinto della realtà dei fatti esposti da questi Autori. Alla Società di Biologia di Parigi, nel gennaio scorso, Valtis e Saenz (111), comunicavano di essere riusciti a coltivare il virus tbc. filtrabile in terreni all'uovo, tipo Besredka, preparati con speciali e delicati accorgimenti, con l'aggiunta di siero fresco di coniglio, di glicerina, di estratti di globuli rossi di bue. Seminando su questo terreno filtrati di culture di tubercolosi umana, dopo una decina di giorni di incubazione, si vedrebbero apparire numerosi bacilli acido-resistenti, lunghi e granulosi misti a bacilli non acido-resistenti che, secondo gli AA., sarebbero derivati dall'evoluzione, in vitro, delle forme invisibili esistenti nel filtrato.

Queste culture, sebbene così ricche di germi che, nel campo di un preparato, con esse allestito, se ne possono contare talvolta più di cento, presentano la singolare proprietà di non essere trapiantabili e di essere affatto prive di virulenza per la cavia, mentre, nel coniglio, talvolta restano innocue, altre volte invece, in poche ore, provocano la morte con un imponente sindrome nervosa. Queste culture lasciate a sè, dopo una ventina di giorni, perdono la loro virulenza anche sul coniglio.

In un recentissimo lavoro, Seppilli e Rivasini (112), seminando filtrati di culture di bacilli tubercolari o di essudati patologici tubercolari, su culture di linfoghiandole di cavia adulta e di leucociti di pollo, avrebbero osservato lo sviluppo di forme bacillari acido-resistenti, con i caratteri del bacillo di Koch. I risultati positivi sono stati otte-

nuti soltanto con i filtrati di culture in brodo di patata non glicerinata di non più di venti giorni.

Secondo le ricerche di Bouquet-Négre e Valtis (113), Valtis e Saenz (115), Arloing-Thevenot-Dufourt e Malartre (114), il virus filtrabile esplicherebbe inoltre un'azione, se non immunizzante, per lo meno di attenuazione e di protezione nel corso dell'infezione tubercolare sperimentale delle cavie; la resistenza conferita dal virus filtrabile all'organismo tbc. è tanto più marcata quanto più frequente e di lunga durata sono le iniezioni di virus filtrabile. Queste proprietà vaccinantanti non hanno però ricevuto la conferma di tutti gli Autori; ad esempio Cleveland Floyd e Margaret Chase Heerik (116), Rabinowitsch (117), Selter e Blumemberg (118), hanno avuto risultati negativi; contro le proprietà vaccinantanti del virus si schiera anche Petraggnani (168-169).

Il virus filtrabile sarebbe poi dotato di proprietà allergiche sia per via cutanea (filtro cutireazione) che per via intradermica (filtro intradermoreazione).

Secondo Arloing e Dufourt (97), in processi tbc. attenuati, la filtrocutireazione darebbe una reazione forte, mentre nelle forme molto gravi riuscirebbe negativa; in tal modo la filtrocutireazione verrebbe a presentare un valore prognostico di molto superiore a quello delle comuni prove tubercoliniche; riguardo a queste ultime, sempre secondo i predetti Autori, gli animali inoculati con virus filtrabili possono essere sensibili alla intradermoreazione colla tubercolina anche quando non presentano alcuna lesione anatomica visibile, nè tumefazioni ghiandolari, nè reperto di bacilli acido-resistenti.

La filtro intradermoreazione, alla diluizione di uno in cento, mentre riesce negativa nei soggetti sani, sarebbe positiva nei tubercolotici (Sterling e Okumiewski (119) ed anche nei bambini (Nelis) nati da parenti tbc., anche quando la cutireazione tubercolinica è negativa, anzi sarebbe molto più spiccata di questa. Secondo le ricerche di questi ultimi anni l'ultravirus tubercolare sarebbe presente anche nel sangue di individui tbc., nelle urine, in caso di tbc. renale, nel liquido cerebro-spinale, in caso di meningite tbc., esso esplicherebbe la sua azione infettante non solo attraverso la cute ed il

peritoneo, ma anche per via gastrica e per via intracardiaca ed endovenosa; su questo ultimo punto però, come quello che riguarda la permeabilità placentare dell'ultravirus tbc., i pareri sono quanto mai discordi ed ancora nulla di positivo e certo è stato detto. Pare che i filtrati di materiale tbc., in rapporto all'origine, alla dose, ed all'età, posseggano grande varietà di poteri patogeni quando siano iniettati nelle cavie; infatti per Arloing-Dufourt e Malartre (170) si possono ammettere tre forme anatomiche diverse prodotte dal virus filtrabile, nelle quali un carattere comune è dato dalla assenza di una localizzazione tbc. al punto dell'inoculazione e dalla mancanza del risentimento ghiandolare satellite (anche su questo punto, fra i vari sperimentatori, non esiste accordo).

Prima forma o nodulare: tubercolosi progressiva, mortale in due o quattro mesi, con lesioni caseose nei gangli o nei visceri; tali lesioni sono in genere più estese a carico delle ghiandole linfatiche, i polmoni sono invece raramente colpiti; in tali lesioni si possono mettere in evidenza bacilli acido-resistenti.

Seconda forma o cachettizzante: caratterizzata da dimagrimento progressivo degli animali fino alla cachessia, accompagnata alle volte ad ipertrofia, senza caseificazione, dei gangli linfatici, più costantemente di quelli del gruppo tracheo-bronchiale e dei mesenterici, nel succo dei quali, come anche nei vari organi, si possono dimostrare bacilli tbc. Secondo le esperienze di alcuni AA. tale iperplasia ghiandolare linfatica procederebbe a catena, dai gangli vicini al punto di inoculazione, fino a quelli più lontani.

Terza forma o effimera: è svelabile solo con la tubercolina; non esistono lesioni specifiche e non si incontrano bacilli tbc. nei vari organi; in essa il periodo preallergico è molto più lungo che negli animali controllo e nelle due prime forme; l'intradermica, per essere positiva, ha bisogno di concentrazioni di tubercolina molto forti. Gli Autori ammettono che questa ultima forma sia dovuta ad una infezione passeggera da parte di un virus filtrabile attenuato, che essi chiamano virus labile, infezione che cessa colla distruzione, nell'organismo, del virus stesso.

La prova della tubercolina, negli animali che reagiscono colla iperplasia del sistema linfatico, senza lesioni tbc. tipiche, può riuscire positiva, ma di rado, e soltanto se si impiegano dosi molto alte (soluzione 1 su 50 per iniezioni intradermiche); con queste soluzioni concentrate si osserva una reazione progressivamente crescente, per circa otto giorni, a partire dall'iniezione del filtrato, poi per un'altra settimana la reazione si mantiene costante, sotto forma di una papula arrossata, ed infine diminuisce, per scomparire del tutto 45 giorni circa dopo l'inoculazione. Secondo gli Autori francesi, lo stato allergico compare dopo l'introduzione dei filtrati anche quando non vi è alcuna alterazione anatomica e scompare sotto l'influenza dei raggi ultravioletti.

Secondo Durand (120) esisterebbero ceppi diversi di virus filtrabile, dotati di proprietà patogeniche diverse, con quadri anatomici patologici propri, alcuni a tendenza sclerosante o caseificante, altri a potere principalmente tisiogeno.

Recentemente Sanarelli ed Alessandrini (164), introducendo nel peritoneo di cavie, sacchi di collodio contenenti bacilli tbc. hanno notato un quadro clinico molto simile a quello che si osserva nelle forme cachettizzanti del virus tbc.

All'autopsia il sacco di collodio appariva intatto fra le anse intestinali; si notava però un'intensa reazione infiammatoria dell'epiploon e della sierosa addominale; i gangli addominali retro sternali erano ipertrofici, gli altri organi apparivano invece normali senza tracce di lesioni tbc.

Nei gangli linfatici e nello epiploon essi hanno trovato delle granulazioni molto piccole, acido-resistenti, rappresentanti, secondo gli AA., forme granulari elementari del bacillo tbc. originatesi degli elementi filtrabili che avevano attraversato la membrana di collodio. Essi hanno pure notato, immergendo, in terreni di cultura, per parecchi giorni, un tubo di collodio chiuso, contenente bacilli tbc.; lo sviluppo di forme debolmente acido-resistenti, che, iniettate in cavia, provocarono ingorgo delle ghiandole dell'inguine; in esse fu possibile, all'autopsia, dopo quaranta giorni dall'inoculazione, mettere in evidenza forme acido-resistenti.

Tuttora noi ignoriamo sotto quale forma il virus filtrabile possa attraversare le candele

filtranti, cioè se esso sia l'espressione ultra microscopica di uno stadio particolare del ciclo di sviluppo del bacillo tbc. oppure sia dato da frammenti di germi o dei tanto discussi granuli di Schrön-Mircoli-Much, i quali si siano risolti in elementi ancor più piccoli, filtrabili, sia perchè così riproducono uno stadio proprio al circolo vitale del parassita, sia per azioni e reazioni organiche ed extra organiche che facilitano il disgregamento del corpo bacillare mettendo in libertà elementi filtrabili che, su di un appropriato terreno organico possono, attraverso un ciclo di sviluppo a noi completamente sconosciuto, riprodurre la forma bacillare classica acido-resistente. Per Fontes (121), Bezançon e Philibert (83), il virus filtrabile sarebbe rappresentato dai granuli di Schrön-Mircoli-Much o corpi gramofili, come essi li chiamano; Ravetlat-Pla (76) lo individuano nel microcco o forma di attacco; Morton Kahn (122-123) pensa che esso sia rappresentato da quegli ammassi di granuli, simili a polvere, tanto minuti da non poter essere misurati con il micrometro, in cui si frammentano i bacilli tbc. agglutinati; questa ipotesi accetta anche Calmette. Avverrebbe in questo caso qualcosa di simile a quello che Hauduroy (124) ha descritto per la forma filtrabile del bacillo del tifo e paratifo; infatti Kahn ha visto generarsi alla periferia degli ammassi di bacilli agglutinati e risolti in granuli, esilissimi filamenti, i quali crescono rapidamente sino a dar luogo a forme adulte.

In base alle ricerche, cui abbiamo testé accennato, Calmette (125) distingue le infezioni tbc. in due grandi gruppi: un primo gruppo di malattie per lo più acute, determinate dall'ultra virus, caratterizzate dall'assenza o dalla scarsità di forme normali, acido-resistenti, del bacillo di Koch. In questo primo gruppo di malattie, che va sotto il nome di « *granulémie prébacillaire* » Calmette comprende un gran numero di manifestazioni patologiche, fra di esse la pleurite, la pericardite, la peritonite tbc. la meningite, l'eritema nodoso o polimorfo, diverse malattie della cute (sarcoidi, tuberculidi papulo squammosi), le tifo-bacillosi di Landouzy, infine la tubercolosi miliare, in cui spesso non è possibile mettere in evidenza veri bacilli di Koch, colorabili con lo Ziehl. Un secondo gruppo abbraccia malat-

tie, ad andamento cronico, che egli indica con il termine di vere « bacillosi » e che rappresentano sia il quadro ultimo di una infezione causata, allo inizio, dall'ultra virus, ed in seguito, dai bacilli acido-resistenti che ne derivano, sia infezioni realizzate, fin dall'inizio, dalla penetrazione diretta del vero bacillo di Koch. A ben considerare, si riscontrano numerosi punti di contatto fra quanto scrive Calmette e quello che prima di lui Ravetilat-Pla (76) e Velez (81), e più recentemente, Almeida-De Magalhães (85-86), hanno sostenuto; uno sguardo allo schema più sopra riportato (fig. 3) verrà a sincerarcene.

Sergent-Durand-Kourilski e Benda (126) pur ammettendo uno stadio prebacillare, affermano che è impossibile isolare in un quadro anatomico patologico e clinico lo stadio prebacillare, dovuto all'ultra virus; si dovrebbe in questo caso ammettere l'esistenza indipendente del virus stesso dall'organismo, cosa che non è stata ancora dimostrata, perchè la presenza del virus, ad es., in un esudato, non esclude la presenza di forme bacillari; neanche si può isolare il quadro della granulia come uno stadio di passaggio fra le bacillosi e la granulemia prebacillare, perchè vi si trovano contemporaneamente e l'ultra virus ed i bacilli.

Anche Jousset (127) crede prematura una classificazione del genere di quella proposta da Calmette.

Rimando il lettore che volesse approfondire l'argomento della filtrabilità del virus tbc. al magnifico recente lavoro del prof. Emilio Veratti (128) ed a quello di Segà e Brustolon (129).

FORME NON ACIDO-RESISTENTI DEL BACILLO DI KOCH. — Nel 1921 Vaudremer (130) coltivando sui terreni all'agar, glucosato al 2% un ceppo di bacilli della tbc. bovina, osservò che questi, dopo sei settimane perdevano la loro acido-resistenza e si coloravano con il violetto di genziana, in pochi secondi, « come un bacillo che prende il gram »; inoculati in cavia, dopo due mesi di soggiorno in termostato, determinavano, nel giro di tre settimane, un'ascesso che si apriva lasciando sfuggire un pus caseoso tipico in cui si trovavano bacilli acido-resistenti; gli animali inoculati con questo pus si comportavano come quelli cui fossero

stati iniettati ordinari bacilli di Koch. Vaudremer riferisce pure che i bacilli della tubercolosi umana, seminati su agar ordinario, dopo otto settimane, danno luogo a culture bianche, simili « a grumi di Kefir » costituite da bacilli, più grossi dei comuni bacilli acido-resistenti, omogenei, senza granuli, colorantisi col violetto di genziana, gram positivi. Inoculati nelle cavie, produssero un tipico ascesso tbc.; se si seminavano in acqua peptonata al 2% questi bacilli così modificati, si ottenevano, dopo otto giorni, culture in cui si vedevano elementi di tipo miceliale con rigonfiamenti terminali, aventi l'aspetto dell'actinomyces, colorantisi con la fuxina diluita; aggiungendo una goccia di sangue di cavallo, i bacilli ridiventavano acido-resistenti, Vaudremer, descrivendo queste forme, così si esprime: « Leur forme générale, leur longueur plus grande, leurs granulations, en nombre toujours supérieure a deux en font ressembler d'avantage au b. tbc. typique. Nous devons signaler, en effet, que le bacille tbc. cultivé sur gélose ordinaire, ne rappelle, en rien, la forme considérée, jusqu'à maintenant, comme caractéristique de ce microbe. Ressemblant à des diplocoques depourvus d'acidoresistance, ils gardent le gram et sont irréconnaissables; pourtant il s'agit bien de bacilles tbc. ».

Vaudremer, ancora in unione ad Hauduroy (131) filtrando culture di bacilli tbc. in acqua peptonizzata e glicerinata, attraverso candele Chamberland L 3, ha ottenuto, nel filtrato, conservato in termostato 38° per 48 h, lo sviluppo di un fine micelio nelle cui maglie erano contenuti piccoli ammassi giallastri, microscopicamente costituiti da sottili filamenti, delicati, anastomizzati fra loro, contenenti granuli fortemente colorati, inegualmente distanti tra di loro; sparsi fra le maglie del micelio, si osservano elementi bacillari corti o lunghi, granulari, incurvati o rettilinei. Questi elementi si colorano male con il bleu di metile, fortemente con il violetto di genziana; i granuli sono gram-positivi, i filamenti invece non lo sono; rare fra essi le forme acido-resistenti. La semina del filtrato, in brodo comune, ha dato luogo a colonie presentanti lo stesso quadro microscopico. Ninni (132), inoculando direttamente nelle ghiandole di cavia culture tbc., filtrate attraverso can-

delà, ha notato, in un caso, negli strisci di queste ghiandole, ammassi di bacilli colorati in bleu, con granuli acido-resistenti, con struttura identica a quella del bacillo di Koch; Valtis e Saenz (111) hanno ottenuto lo stesso risultato con l'inoculazione diretta del filtrato nel peritoneo di cavia. Ninni però non considera queste forme come tipicamente tbc.; con il passaggio di ghiandola in ghiandola, ha ottenuto tuttavia, da esse, forme acido-resistenti tipiche. Valtis e Saenz, nel lavoro più sopra citato, dimostrano che gli elementi originali dall'ultra virus, nelle culture, sono in un primo tempo non acido-resistenti e che soltanto nella ulteriore evoluzione compaiono le forme acido-resistenti; risultati analoghi hanno ottenuto, come dicemmo, Seppilli e Ravasini (112).

Sfogliando la bibliografia si trovano, anche in passato, accenni alla esistenza di forme non acido-resistenti del bacillo di Koch. Così noi sappiamo che Marmorek (77-78-79) si serviva, per la preparazione del suo siero, di culture tbc. giovani in cui la maggioranza dei bacilli, che egli chiama primitivi, non era acido-resistente.

Krilow (133), seguendo lo sviluppo delle culture di bacilli tbc., notò che i giovanissimi bacilli di Koch sono gram-negativi ed, in uno stadio ulteriore, gram-positivi e solo in seguito acido-resistenti; la sostanza gram-positiva compare per lo più nei bacilli giovani, sotto forma di granuli, l'acido-resistenza per contro è diffusa. Zironi (134), usando culture di bacilli della tbc. umana, bovina ed aviaria e colorando con il Gram e lo Ziehl, confermò le ricerche di Krilow. Scrive lo Zironi che, se nelle culture giovanissime « l'osservazione cade non sui frammenti di patina insemata, ma sui germi moltiplicantisi, prevalgono i bacilli gram-negativi colorabili con i colori di contrasto e non acido resistenti. Essi presentano un notevole poliformismo perchè vanno da piccole forme bacillari diritte, a grosse forme clavate, e non sono rari i bacilli che, a forte ingrandimento, si presentano come una rete, nelle parti più voluminose delle quali, si trovano uno o più vacuoli ».

Recentemente Dessy (158), mettendo a contatto estratti di fegato, cervello, milza, muscoli e ghiandole linfatiche, con emulsione di bacilli tbc. notò, a carico di questi ul-

timi, alcune modificazioni, che vanno dalla frammentazione intensa, per cui il bacillo si spezzetta in granuli acido-resistenti, alla trasformazione streptococciforme, per cui nel corpo bacterico, appaiono zone sporisimili, colorate intensamente in bleu rossastro, alla perdita totale dell'acido-resistenza ed alla trasformazione in elementi esili, lunghi, pallidamente colorati in rosso. Aggiunge poi ancora che gli elementi sporisimili, fortemente colorabili in azzurro rossastro, differenziabili per l'aspetto e le proprietà tintoriali dei granuli di Much potrebbero forse essere interpretati come forme più resistenti del bacillo tbc. stesso. Borghesi (135), coltivando il bacillo di Koch in terreni all'uovo, ottenne il rapido sviluppo di culture ricche di forme granulose, sia isolate che unite in catenelle, non acido-resistenti; risultati analoghi riporta Bacigalupo (136); Courmont e Panisset (137) pubblicano una figura di culture giovani di bacilli di Koch, in cui questi appaiono come molto corti, sotto forma di streptobacilli, non acido-resistenti. Ravetlat-Pla (76) misero in evidenza in terreni, in cui era stata aggiunta soluzione jodo-jodurata, « una bacteria muj larga come un filamento de actinomyces, gram negativa, no acido-resistente, que en las siembras se convierte en bacteria de ataque ». Recentemente Sweanj (138) ha osservato, in un ascesso tubercolare dell'orecchio, granulazioni di un aspetto particolare che in certi stadi possono trasformarsi in bacilli nettamente mobili, che non sono però acido-resistenti; piccole dosi di questi granuli, iniettate, hanno provocato una tbc. cronica ed atipica, mentre l'inoculazione di dosi massive provocò un'iniezione tipica e grave. Anche Mayer (171), Knol (173), Kirchenstein (172), ecc. hanno accennato a variazioni dell'acido-resistenza del bacillo di Koch.

LA SOSTANZA CIANOFILA. Legroux e Magroux (139) hanno studiato nel 1920 la struttura delle colonie di bacilli di Koch, ed hanno constatato che esse sono costituite da una trama filamentosa colorantesi in bleu, su cui si sviluppano numerosi bacilli; essi interpretano questa sostanza come un prodotto della elaborazione dei bacilli, che avrebbe grande importanza nella coesione e nella struttura delle colonie stesse. Bezançon e

Philibert (83) nel 1926, facendo uno studio morfologico dei veli di culture tbc., in mezzi liquidi, hanno potuto osservare che i veli stessi sono composti d'una materia amorfa, la sostanza cianofila, in mezzo alla quale si originano i bacilli acido-resistenti e i corpi gramofili (granuli di Schrön-Mircoli-Much). Riferisco la descrizione che di questa sostanza danno i due Autori.

« Elle se dispose en bandes dessinant des colonnes, des travées qui se recourbent et se rejoignent, délimitant des aréoles claires, plus ou moins circulaires sur la coupe. Elle présente une structure membraniforme et fibrillaire et donne l'impression d'être formée, soit d'une membrane striée longitudinalement, soit plutôt de fibrilles disposées parallèlement et toujours suivant le grand axe des colonnes. De fait, on voit nettement des filaments isolés aberrants, de l'épaisseur d'un bacille, mais beaucoup plus longs, qui s'échappent des travées; ils se terminent quelque fois librement, quelque fois, par une véritable anastomose, ils rejoignent, à travers une aréole, la travée voisine.

Ils ne présentent pas de double contour, ne paraissent pas être ramifiés, mais deux filaments parallèles peuvent diverger et simuler une ramification.

Dans les points où les bacilles acido-résistants sont apparents, ils sont disposés dans les travées de la substance cjanophile le long de leur grand axe, parallèles entre eux et parallèles à la striation fibrillaire des travées bleues. Ils semblent comme juxtaposés aux filaments, appliqués sur eux, peut être substitués à une partie du filament. On a ainsi l'aspect de véritables nervures cjanophiles sur lesquelles sont plaqués les bacilles, parfois très rares ».

Essi concludono che la forma tipica del virus tbc. non è « *exclusivement le bâtonnet acido-résistant considéré habituellement, mais un parasite beaucoup plus complexe comportant trois sortes d'éléments; des filaments, formant une charpente sur la quelle se développent les éléments bacillaires renfermant eux-mêmes des corpuscules chromophiles* ».

Partendo poi dalla osservazione che le culture di actinomyces hanno una struttura analoga a quella delle culture di bacilli di Koch (presenza di sostanza cianofila fila-

mentosa formante eleganti arabeschi, che costituiscono l'armatura delle colonie) sostengono che il bacillo di Koch deve essere classificato in un genere speciale, il genere « *Mycobacterium* » (Lehman e Neuman) nella famiglia degli actinomyceti.

Dalla rassegna bibliografica (che, per quanto minuta, è ben lungi dall'essere completa) che abbiamo ora fatto, apprendiamo che il germe della tubercolosi, oltre che con il tipico aspetto di bacillo di Koch, si può presentare sotto altre forme, considerate via via come stadi degenerativi o come forme di passaggio.

Allo scopo di seguire, nelle sue varie fasi, il ciclo riproduttivo del bacillo tubercolare e di stabilire l'importanza che in esso hanno le forme descritte dai vari AA. sopra citati, mi sono proposto una metodica serie di ricerche che formano oggetto del presente lavoro.

ESPERIENZE PERSONALI SULLA FILTRABILITÀ DEL VIRUS TUBERCOLARE. — Mentre come si è visto da molti Autori si ammette l'esistenza di un virus filtrabile in quasi tutti i materiali che contengono bacilli tbc., non vige fra essi l'accordo sulla natura del virus e sulla sua virulenza. Dufourt e Arloing (97) per spiegare le discrepanze che si hanno nei reperti, giacchè mentre in taluni casi si trova una tubercolosi disseminata rapidamente mortale, in altri questa manca, ammettono l'esistenza di un « *virus labile* » dotato di scarsa virulenza, il quale, clinicamente ed anatomicamente poco offensivo, rapidamente verrebbe distrutto ed eliminato dall'organismo; la sua presenza sarebbe svelabile solamente con la intradermoreazione in soluzioni molto concentrate.

Per Calmette gli elementi filtrabili, inoculati negli animali sensibili, si mostrano dotati di debole virulenza (che si può accrescere con successivi passaggi di animale in animale) ed ordinariamente sono incapaci di produrre lesioni caseose; nell'organismo umano però questo stesso virus è la causa di un gruppo di malattie generalmente acute, caratterizzate dall'assenza o dalla scarsità di forme normali, acido-resistenti,

dei bacilli di Koch, che egli indica, come già dicemmo, sotto il nome di « granulémie pre-bacillaire »; anche per Ravetllat-Pla (76) il virus filtrabile sarebbe dotato di scarsa resistenza e, quando le condizioni di vita non sono favorevoli al suo sviluppo, trapassa allora nella forma intermedia.

Secondo quanto riferisce Valtis (140), il virus sarebbe invece molto virulento e dotato inoltre di una certa resistenza; risulta infatti, dalle sue esperienze, che cavie, inoculate con filtrati, nel peritoneo, vennero a morte a distanza di 12, 13 giorni dall'inoculazione; inoltre apprendiamo che « les éléments filtrables du bacille de Koch, conservent pendant 8 jours à la glacière, leur pouvoir pathogène ». Questo virus, così virulento e resistente, genererebbe bacilli acido-resistenti che non sono in grado di determinare lesioni tbc. tipiche e che, neppure dopo cinque passaggi in vivo, possono riacquistare i caratteri patogeni del ceppo originario. Per Durand (120) esistono diversi ceppi di virus tbc. filtrabile dotati di proprietà patogeniche diverse, con singoli quadri anatomo-patologici loro proprii, alcuni a scarsa attività, altri iperattivi.

Secondo Seppilli e Ravasini (112) gli elementi filtrabili « non accompagnano necessariamente e costantemente la forma classica del bacillo di Koch o per lo meno non lo accompagnano in quantità ed in condizioni tali da essere rilevabili con l'unico mezzo di cui, fino ad oggi, disponiamo, vale a dire con la prova biologica ».

Alcuni Autori sostengono che il virus filtrabile si trova con maggiore frequenza in particolari terreni di cultura; soprattutto secondo Casagrandi (142) nelle culture « scerate », cioè in quelle in cui si trovano numerose le forme granulose, bacillari e filamentose, non resistenti al metodo di Ziehl-Neelsen. Vaudremer avrebbe fatto la stessa constatazione nelle culture in terreni liquidi scarsamente azotati.

Sergent e Kourilskj (143), partendo da osservazioni cliniche, pensano, contrariamente agli altri Autori, che il bacillo di Koch « resté inclus, comme emmuré vivant dans les foyers latents des lésions paraissant éteintes, perde sa forme classique, acido-resistente, pour prendre celle du virus f., durant la période de sommeil, et la reprend en suite à la phase de reveil ou d'écllosion ».

Come si vede i pareri dei vari Autori sono quanto mai discordi.

Allo scopo di sincerarmi: 1° se il V. f. possa esistere come forma a sè o se la sua esistenza sia legata a quella del bacillo tbc; 2° se detto virus sia veramente labile oppure sia dotato di una certa resistenza, ho sottoposto alla filtrazione alcuni escrementi tbc. sia emessi da poco che essiccati, per parecchi giorni, all'aria od in termostato. Se il v. filtrabile fosse veramente labile, esso dovrebbe, in conseguenza dell'essiccamento del materiale che lo contiene, scomparire e la filtrazione dare risultato negativo, mentre all'incontro dovrebbe essere positiva con l'escreato appena emesso; se invece il virus è legato al bacillo tbc., dato che questo si mantiene vivo e virulento anche con l'essiccamento del materiale che lo contiene (65), si dovrebbe, colla filtrazione, in tutte e due le prove, avere risultato positivo. Ricerche sperimentali in questo senso sono già state fatte dal Tagliabue (144), il quale ha filtrato, con esito negativo, liquido di versamento pleurico, lasciato per tre-cinque giorni a temperatura ambiente, liquido siero emorragico estratto dal peritoneo di cavie morte per tbc., diluito in acqua peptonizzata e lasciato a temperatura ambiente per quattro giorni e pappe di fegato e di milza di cavie morte per tbc. conservate nello stesso modo. Dalle sue esperienze non risulta però che egli abbia fatto subire ai materiali il trattamento da me usato, e con gli stessi intendimenti.

TECNICA. — Ho usato per queste ricerche, come già dissi, escreato tbc. in cui l'esame microscopico dimostrò sempre una quantità notevole di bacilli di Koch; parte dell'escreato, raccolto in quantità notevole poche ore dopo l'emissione, veniva messo in scatole di Petri e lasciato in ter-

ESPERIENZE SULLA FILTRABILITÀ DEL BACILLO TUBERCOLARE.

		PROVE AVANTI LA FILTRAZIONE										PROVE DOPO LA FILTRAZIONE									
Num. d'ord.	Materiale	Condizioni dell'escreato	Ricerca di B. Koch prima e dopo l'autolizzazio-	Successive prove biologiche nell'escreato	Esame batterioscopico del filtrato	Ricerche culturali	Inoculazione in cavie	Morte della cavie	Peso cavie		Intra-venosa 1% dopo iniezione filtrato	Esame Anatomico patologico	Esame istologico fegato e polmoni	Esame istologico linfonodi Milza	Esame batterioscopico ghiandole e milza						
									Iniziale	Finale											
1	I	Fresco	+	+	+	—	26-9-29	22-11-29	640	930	—	Chiaudole ilo polm. ingross.	—	Iperplasia follicoli linfatici	—						
2	»	»	+	+	+	—	26-9-29	21-3-30	390	840	—	Id.	—	Id.	—						
3	»	»	+	+	+	—	26-9-29	2-11-29	400	520	—	*Fegato, milza voluminosi	Fegato in deg. grassa	Milza congesta	—						
4	»	»	+	+	+	—	26-9-29	30-10-29	480	570	—	Id.	Id.	Id.	Forme bacillari non acido-resistenti						
5	»	Essiccato termostato per 3 giorni	+	+	+	—	29-9-29	20-3-30	340	670	—	Chiaudole ilari molto ingross.	—	Iperplasia follicoli linfatici	—						
6	»	Id. 7 giorni	+	+	+	—	24-9-29	24-3-30	275	600	—	—	—	Iperplasia follicoli linfatici	—						
7	»	Id. 8 giorni	+	+	+	—	28-9-29	13-12-29	500	720	—	Ghiandole ilari ingrossate	Degen. grassa fegato	Milza congesta	—						
8	II	Fresco	+	+	+	—	12-9-29	22-10-29	470	730	—	Id. molto ingr.	—	—	—	Come N° 5					
9	»	»	+	+	+	—	12-9-29	23-3-30	380	540	—	—	—	—	—	—					
10	»	Essiccato termostato per 6 giorni	+	+	+	—	21-9-29	24-10-29	330	560	—	Chiaudole ilo ingrossate	—	Iperplasia follicoli linfatici	—	—					
11	III	Fresco	+	+	+	—	17-9-30	24-10-29	440	390	—	*Fegato, milza ingrossati	Degen. grassa fegato	Milza congesta	—	—					
12	»	Essiccato aria 4 giorni	+	+	+	—	18-9-29	20-3-30	310	640	—	Ghiandole ilo ingrossate	—	Iperplasia follicoli linfatici	—	Come N° 5					
13	IV	Fresco	+	+	+	—	14-9-29	23-3-30	230	710	—	—	—	—	—	—					
14	»	Essiccato aria 6 giorni	+	+	+	—	20-9-29	21-3-30	370	826	—	—	—	—	—	—					
15	V	Fresco	+	+	+	—	18-9-29	20-4-30	410	960	—	Chiaudole ilo ingrossate	—	Iperplasia follicoli linfatici	—	—					
16	»	Essiccato termostato 4 g.	+	+	+	—	21-9-29	17-3-30	560	1040	—	Id.	—	Id.	—	—					
17	VI	Fresco	+	+	+	—	29-9-29	28-4-30	470	910	—	Id.	—	Id.	—	—					
18	»	»	+	+	+	—	7-10-29	3-2-30	390	850	—	Id.	—	Id.	—	—					
19	»	»	+	+	+	—	28-9-29	3-2-30	450	1010	—	Id. molto ingr.	—	Id.	—	—					
20	VII	Essiccato aria 8 giorni	+	+	+	—	5-10-29	21-12-30	300	950	—	—	—	Id.	—	Come N° 5					
21	»	Id.	+	+	+	—	3-10-29	27-1-30	400	980	—	Ghiandole ilari ingrossate	—	Iperplasia follicoli linfatici	—	—					
22	»	Fresco	+	+	+	—	1-10-29	5-2-30	350	810	—	—	—	—	—	—					

* Le cavie presentavano nel punto di inoculazione un ascesso.

mostato a 37°, per quattro-otto giorni, oppure per un tempo uguale in ambiente aereato ed illuminato. Per l'omogeneizzazione dell'escreato, sia fresco che essiccato, mi servii del metodo consigliato dal Petraghani (168-169): addizione con due volumi di idrato di sodio al 4%, soggiorno per un'ora in termostato, successiva neutralizzazione con acido cloridrico al 10%. Dell'escreato così trattato inoculavo due cc., come controllo, in una cavia, il resto, in dosi di 15-20 cc., filtravo, per aspirazione, attraverso candele di Chamberland L2, aggiungendovi, contemporaneamente, per controllare il filtro, 2 ansate di *Micrococcus Melitensis*. Le prove di sterilità del liquido ottenuto, dopo filtrazione attraverso candela, venivano fatte in brodo comune, lasciando il materiale in termostato, per circa quarantotto ore; non ebbi mai a notare inquinamento. Le candele non venivano usate per più di tre filtrazioni, erano di volta in volta lavate e sterilizzate in pentola di Koch, per un'ora; la durata della filtrazione non fu mai superiore a trenta minuti.

Seminavo il materiale filtrato parte su terreni di Petraghani e di Petroff, per vedere se in esso fossero eventualmente contenuti bacilli tbc. coltivabili, il resto, in dosi di 5-8 cc., veniva inoculato nel sottocutaneo inguinale di cavie sane, sicuramente indenni da infezione tubercolare; le intradermiche, all'uno in 100, praticate avanti l'inoculazione del filtrato, furono sempre negative. Separai, dopo la inoculazione, gli animali a due a due, in gabbie vicine, procurando di metterli in condizioni uguali di luce, temperatura ad aerazione, e li alimentai giornalmente con foraggio fresco. Tanto nelle cavie inoculate con materiale tbc. non filtrato che in quelle inoculate con filtrato, eseguii di 20 in 20 giorni l'intradermoreazione (pre-

via depilazione) con tubercolina diluita all'1%; essa risultò positiva soltanto nelle prime, cioè in quelle trattate con materiale non filtrato, le quali vennero a morire, dopo 30-40 giorni, con tubercolosi generalizzata. Il materiale filtrato risultò quasi sempre limpido e, per quanto lungamente centrifugato, non ho mai trovato in esso forme batteriche di nessuna specie. Le prove culturali del filtrato, su terreno di Petroff e di Petraghani, furono costantemente negative. Alcune delle cavie inoculate con materiale filtrato si dimostrarono, nei primi tre giorni, sofferenti, col pelo arruffato, e rifiutarono, nelle prime venti ore, il cibo, ma si rimisero però facilmente; il peso è andato aumentando da quello iniziale.

Qualcuno fra gli animali, a distanza di tre-quattro mesi dalla inoculazione, dopo un primo periodo di benessere, andò incontro ad un progressivo decadimento, caratterizzato da diminuzione dell'appetito e della vivacità, calo ponderale, immobilità; il decadimento non fu però mai tale da condurre l'animale a morte. In tre degli animali (in cui praticai l'iniezione di filtrato nella profondità dei muscoli della coscia), ebbi la formazione di un'ascosso che li condusse in breve alla morte. L'autopsia non fece rilevare lesioni imputabili alla tbc.; i controlli biologici e batterioscopici furono al riguardo negativi, l'esame istologico mise in evidenza una degenerazione grassa del fegato ed una iperplasia dei follicoli della milza, per cui si può pensare che la loro morte sia senz'altro da imputare alla sopravvenuta infezione piogenica.

Come dissi separai le cavie, inoculate con lo stesso filtrato, a due a due, in una stessa gabbia; di questi animali ne sacrificai uno dopo 40-60 giorni, l'altro dopo 5-7 mesi; alla autopsia, che praticavo con la maggiore asepsi possibile,

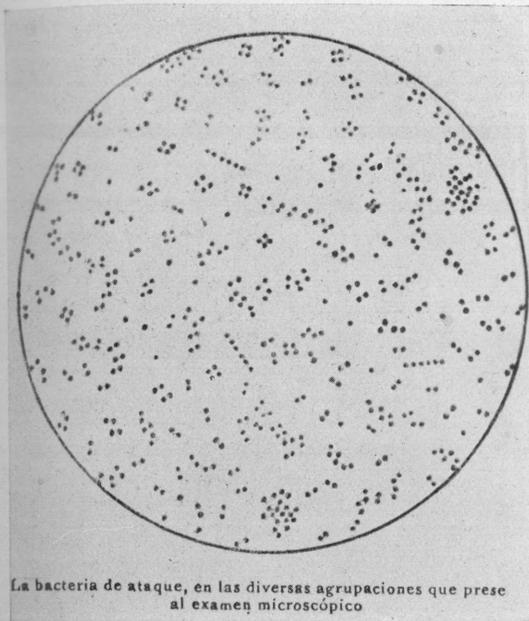


Figura I. — La forma di attacco secondo Ravetllat - Pla.
(Da Ravetllat - Pla).

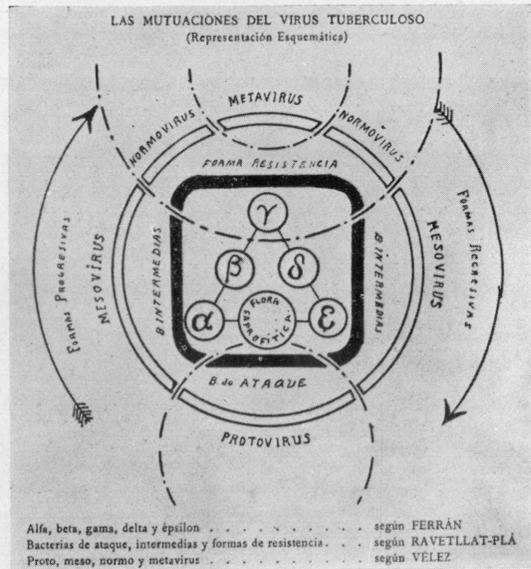


Figura II. — Grafico riproducente le teorie di Ferràn, Ravetllat - Pla e Velez.
(Da Velez).

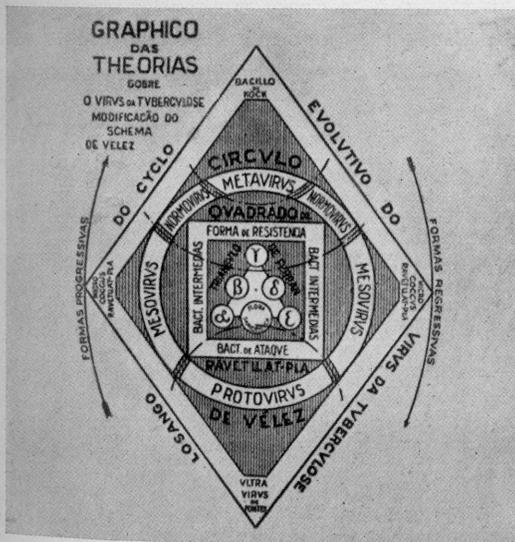
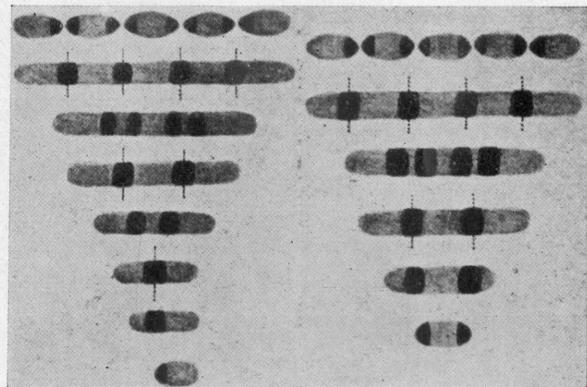
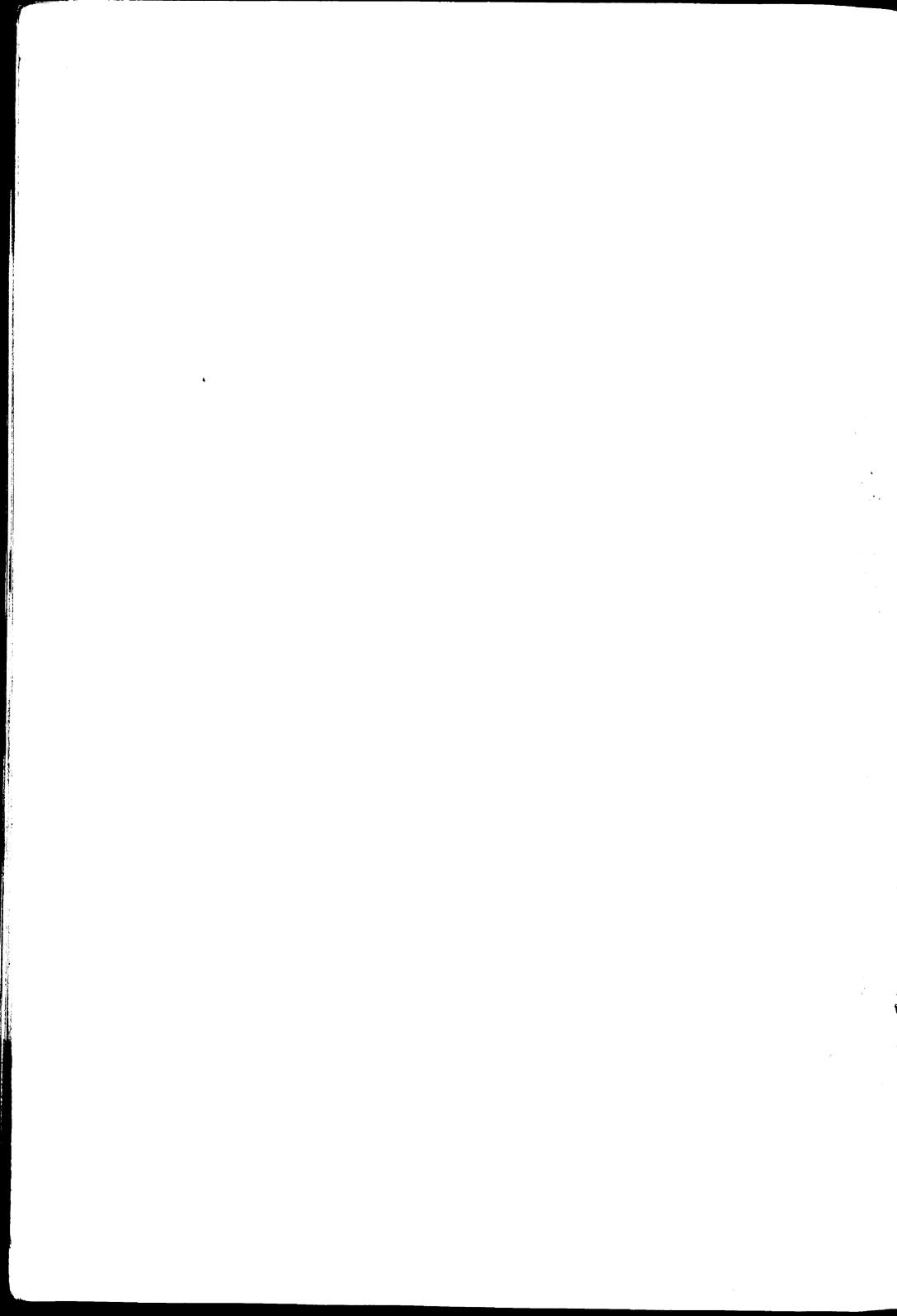


Figura III. — Modificazione dello schema precedente secondo De Almeida de Magalhaes.
(Da De Almeida Magalhaes).





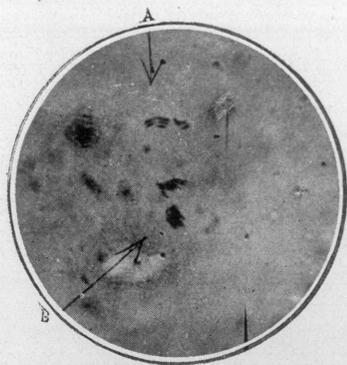


Figura V. — Bacilli tubercolari tendenti ad agglutinarsi ed a fondersi in una unica massa. (Colorazione: Acido Cromico Ziehl - Nielsen. Immersione $3 \frac{m}{m}$ Koristka. Culture di 65 giorni).

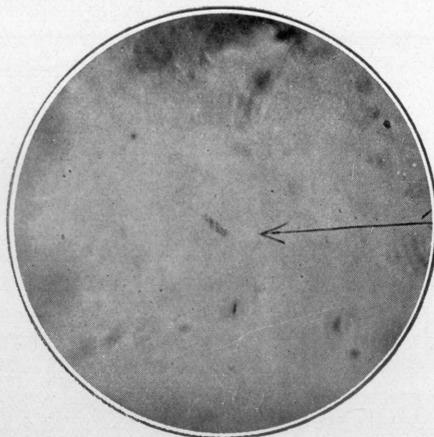


Figura VI. — Forme bacillari in via di degenerazione. (Colorazione: Acido cromico e Ziehl-Nielsen. Immersione $1.5 \frac{m}{m}$ Koristka. Culture di 50 giorni).

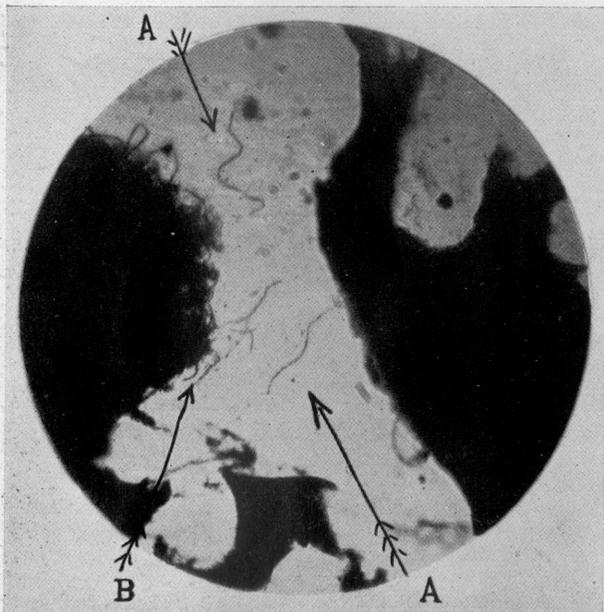


Figura VII. — Sezione di cultura di bacilli tubercolari di 38 giorni. Inclusione in paraffina. In A) si vedono forme filamentose isolate; in B) riunite a formare eleganti arabeschi. (Colorazione: Saffranina, Violetto Genziana. Immersione $3 \frac{m}{m}$ Koristka).

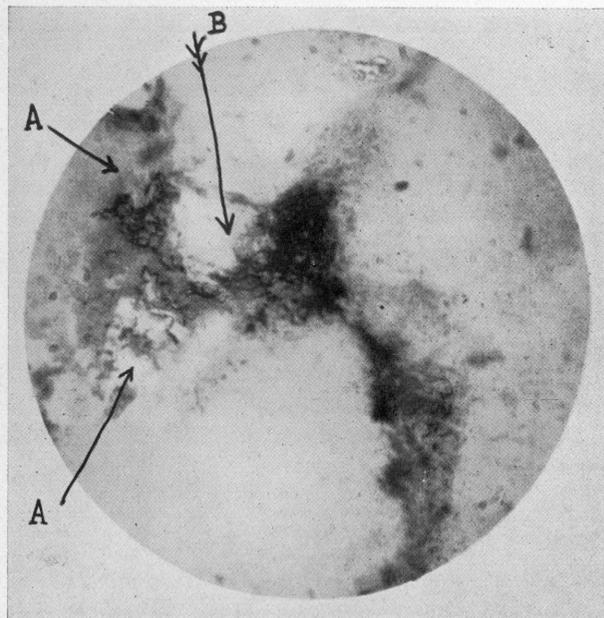


Figura VIII. — Sezione di cultura di bacilli tubercolari di 75 giorni. Inclusione in paraffina. Si vedono bacilli di Koch, granulosi, allungati, fra loro intrecciatesi (A). Frammezzo ad essi, poco visibili, filamenti di sostanza cationofila (B). (Colorazione: Saffranina, Violetto Genziana. Immersione $3 \frac{m}{m}$ Koristka).



usando ferri sterilizzati, che cambiavo dopo aver scuoiato l'animale, prelevavo i polmoni, il fegato, la milza e le ghiandole. Con parte di questi organi praticavo degli strisci su vetrini nuovi previamente sterilizzati nella pentola di Koch, ricoprendoli, dopo la colorazione, con coprioggetti pure sterili; un'altra parte, triturrata in mortaio, veniva inoculata in cavia; il resto veniva fissato in formalina per l'esame istologico.

L'iniezione del filtrato non si accompagnò mai ad adenopatia satellite, il liquido iniettato fu sempre assorbito rapidamente senza dar luogo a reazioni locali fatta eccezione dei tre casi suaccennati in cui si ebbe, in seguito alla iniezione nei muscoli, la formazione di un ascesso da piogeni.

RISULTATI. — L'autopsia degli animali uccisi a distanza varia dalla iniezione di filtrato non rilevò mai lesioni imputabili alla tbc.: in quasi tutti gli animali trovai le ghiandole dell'ilo polmonare fortemente aumentato di volume, alcune di esse sino ad un pisello. Il fegato, la milza, il rene, i polmoni, apparivano integri; non trovai mai polmoniti, focolai necrotici, quali hanno descritto alcuni Autori; mai ebbi a rilevare aumento delle ghiandole mesenteriche o dell'ilo epatico. Non fu mai notata ipertrofia del ganglio satellite nel punto di inoculazione del filtrato.

ESAME ISTOLOGICO. — Per la fissazione dei pezzi, come dissi, mi servii della formalina; le sezioni venivano colorate con la ematossilina e l'eosina, con il Van Gieson. L'esame istologico delle linfo-ghiandole del mediastino mise in evidenza una notevole vaso-dilatazione; in quasi tutti i follicoli il cosiddetto centro germinativo di Flemming era molto più voluminoso di quello che generalmente appare; non si vedevano formazioni specifiche per il gra-

nuloma tubercolare; fenomeni del tutto analoghi incontrai talvolta nella milza. Negativi per la tubercolosi erano pure i preparati istologici del fegato e dei polmoni.

ESAME BATTERIOSCOPICO. — Per l'esame batterioscopico degli strisci di linfoghiandola e delle sezioni istologiche, mi sono servito del metodo già da me consigliato che permette di mettere in evidenza, contemporaneamente, i granuli di Schrön-Mircoli-Much e i bacilli tubercolari; esso consiste nel mordenzamento degli strisci, per cinque minuti, a freddo, con acido cromatico al 5-10 %, in soluzione acquosa, cui faccio seguire, dopo lavaggio in acqua corrente, la comune colorazione di Ziehl. L'esame fu sempre negativo, eccezion fatta per quattro animali (V. tavola al numero 5, 8, 12, 19); in questi, negli strisci fatti con la polpa delle ghiandole dell'ilo polmonare, ho potuto mettere in evidenza rare forme bacillari, affusate, allungate, riunite tra di loro a forma di catenelle, composte di tre-quattro elementi, contenenti granuli acido-resistenti; queste forme non erano resistenti agli acidi e si coloravano in bleu; nel 4° caso trovai elementi analoghi solo invece che di colore bleu, essi apparivano rosso-bruni, erano di lunghezza inferiore, e non erano riuniti in catenelle. L'aspetto di queste forme bacillari corrispondeva alla descrizione delle forme non acido-resistenti, riscontrate da Valtis e Saenz e da Ninni, rispettivamente nelle culture di v. filtrabile e nelle ghiandole di cavie inoculate con detto virus. Ma mentre Ninni, che le considera come forme tbc., riuscì, con consecutivi passaggi, di cavia in cavia, a trasformarle in bacilli di Koch tipici, nel caso nostro abbiamo avuto risultato negativo.

Nella milza, nel fegato, nei polmoni,

la ricerca batterioscopica del bacillo di Koch fu sempre negativa; negativi pure, sia dal punto istologico che batterioscopico, i controlli biologici in cavia, praticati coll'inoculazione di pezzi di visceri (ghiandole, milza e fegato) triturati sterilmente in mortaio con soluzione fisiologica.

Dovendo dare una interpretazione alle forme bacillari più sopra descritte, per la loro forma e per le loro qualità tintoriali, naturalmente escludendo che si tratti di precipitati, sono alquanto in dubbio se si debbano realmente ascrivere alle forme tubercolari. A convalidare il dubbio insorgono due elementi: il non aver potuto trasformare queste forme attraverso successivi passaggi in cavia (già al secondo passaggio non era possibile riscontrarle nelle ghiandole degli animali di controllo) come avviene per le forme generate dal v. f. (Calmette); in secondo luogo l'assenza di lesioni o di alterazioni istologiche, quali sogliono accompagnare il bacillo di Koch. Bisogna però ricordare che gli elementi generati dal v. f. secondo le affermazioni di numerosi Autori, possono trovarsi nelle ghiandole pur senza dal luogo in esse ad alcuna alterazione specifica.

Due ipotesi si possono quindi avanzare: o si tratta di forme bacillari, di origine non tbc. ed in favore di ciò ricorderò che Petroff (87), Selter e Blumenberg (92), nelle cavie sane trovarono, nelle ghiandole dell'ilo, bacilli acido-resistenti non tubercolari; oppure si tratta di forme atipiche del bacillo di Koch del tipo di quelle descritte da numerosi Autori (vedi avanti nella bibliografia). Delle due ipotesi allo stato attuale della questione la prima mi sembra la più probabile; resta però sempre da spiegare come solo in questi animali inoculati si sia avuto un simile reperto, mentre questo sia mancato negli

animali usati per controllo, ed anche in altri animali sani sacrificati contemporaneamente.

Riferendomi al reperto istologico delle linfoghiandole, dal momento che la quasi totalità degli istologi ammette che il centro germinativo sia il centro reattivo del follicolo linfatico, sarei tentato a dedurre che in tutte le ghiandole vi è uno stato reattivo di cui appunto il documento è la moltiplicazione delle cellule centro-germinali; non è però possibile, dal tipo della lesione, risalire, con sicurezza, alla causa determinante, perchè fenomeni reattivi si possono avere come esponenti di tossemie le più varie. Mi pare però si possa avanzare un'ipotesi: e cioè che questa iperplasia non sia che l'espressione di un fatto reattivo di fronte alla iniezione del filtrato. Conforterebbe questa ipotesi il fatto che con iniezioni di B. C. G., in cavie inoculate con filtrato, sono riuscito a produrre in esse un quadro analogo a quello ora descritto, ma molto più imponente; pure una notevole importanza avrebbe il fatto che nelle cavie di controllo non abbiamo mai notato nulla di simile, e l'osservazione che l'adenopatia delle ghiandole dell'ilo polmonare è un reperto frequente nelle esperienze dei ricercatori che si sono occupati dell'argomento, adenopatia che si può presentare con il quadro da noi descritto, pur essendo presenti nelle ghiandole bacilli tbc.

Alcuni Autori, fra cui Arloing, riferiscono questa lesione al V. f. stesso, altri invece ad infezioni spontanee da germi di varia natura, frequenti negli animali degenti negli stabulari (Keller e Werthamr) (93), Dessy (174), Galli (176), Montemartini (175) invocano l'azione di tossine provenienti dal bacillo tbc., o di prodotti di disintegrazione del bacillo stesso; altri infine incolpano la flora cospicua, di origine varia, contenuta nei materiali usati per la filtrazione.

Hababou Sala (151) ottenne lesioni isto-

logiche del tipo di quelle da noi riscontrate, nelle ghiandole di cavie inoculate sia con filtrati di prodotti tbc., riscaldati a 80° per 20', sia con tubercolina bruta. Mellon e Jost (152), che nelle loro esperienze ottennero risultati positivi solo in due animali su 37, riferiscono di aver riscontrato nelle cavie lesioni istologiche, con formazioni simili al tubercolo, per azione di un microrganismo di tipo paratifoide Gram negativo.

Recentemente Sega e Brustolon (129) hanno inoculato con filtrati di vari espettorati, tbc. e non tbc. numerose cavie, ottenendo sempre un'identico reperto, caratterizzato (eccezion fatta di un unico caso in cui si trovarono lesioni tbc.) da emorragie, più o meno cospicue, accompagnate da una proliferazione delle cellule del reticolo endotelio, con presenza di cellule globulifere e pigmentifere, in numero più o meno notevole; questi Autori riscontrarono lesioni identiche, oltre che nelle ghiandole, anche nel fegato, nella milza e nel polmone.

Allo scopo di sincerarmi se il quadro istologico da me riscontrato fosse dovuto, anziché al materiale tbc. filtrato, alle sostanze chimiche usate per la sua omogeneizzazione (acido solforico e idrato di sodio) mi sono proposto di vedere se la iniezione di dette sostanze, sia da sole, che mescolate, con le modalità seguite per la omogeneizzazione dell'escreato, a frammenti di organi di animali sicuramente indenni da tbc., potesse dare un reperto analogo. Scelte 12 cavie, presentanti ripetute intradermoreazioni negative alla tubercolina, alla diluizione dell'uno in mille, iniettai a quattro di esse, nel sottocutaneo dell'inguine, 10 cc. di idrato di sodio al 4 % e di acido cloridrico al 10 %, mescolati in modo da avere, alla tintura di lacca muffa, una reazione neutra; ad altre quattro inoculai frammenti di fegato e di milza, trituriati in mortaio sterile ed omogeneizzati come più sopra ho descritto; le rimanenti tenni come controllo.

Dopo otto giorni dalla prima iniezione,

uccisi una cavia di ogni gruppo; mentre in quelle inoculate si notava un'aumento delle ghiandole dell'ilo polmonare, questo aumento mancava in quelle di controllo. Reinoculai allora le rimanenti con le stesse modalità; dopo otto giorni sacrificai nuovamente un animale per ogni gruppo ottenendo lo stesso reperto, ma più evidente del precedente; ripetei l'esperienza per altre due volte, osservando, di volta in volta, un aumento sempre più evidente delle ghiandole, le quali però non superarono mai il volume di un chicco di grano.

Mentre l'esame istologico delle ghiandole delle cavie di controllo non rilevava nulla di particolare, quello delle cavie inoculate metteva in evidenza una notevole vaso-dilatazione ed un ingrandimento del centro germinativo di Flemming; meno evidente appariva questo quadro nella milza; qua e là per quanto di rado, si osservavano focolai circoscritti di necrosi e i piccole emorragie. Il reperto richiamava, per il suo aspetto, quello osservato nelle ghiandole degli animali inoculati col filtrato, ma da questo se ne scostava per la minore intensità ed evidenza delle lesioni.

Dobbiamo allora riferire il quadro istologico, da noi riscontrato, ad un fattore tossico, dato dal materiale adoperato, oppure al virus tbc. stesso od anche ad una infezione spontanea, (del tipo di quella suscitata) delle cavie?

Quest'ultima ipotesi, senz'altro si può scartare, perchè non trovammo nei controlli nulla di simile; anche l'azione del V. f. appare poco probabile perchè non abbiamo mai trovato forme riferibili, con sicurezza, al bacillo di Koch, e perchè i controlli biologici furono negativi. Rimane l'ipotesi avanzata per prima che vorrebbe riferire il tutto ad un fattore tossico, questa ipotesi mi appare, sulla

base di questi miei controlli, la più accettabile; non posso però escludere che anche il V. f. possa essere in causa, per quanto per i motivi suesposti, questa ipotesi mi appaia meno probabile.

RICERCHE SULLA MORFOLOGIA DELLE CULTURE DI BACILLI DELLA TUBERCOLOSI.

Lo scorso anno studiando i fenomeni riproduttivi del bacillo della tubercolosi negli escreati e nel materiale caseoso proveniente da caverne tbc. ho potuto osservare accanto ai tipici bacilli di Koch, forme esili, allungate, provviste di un solo granulo, talora di due o tre, riuniti tra loro da esili filamenti.

Queste forme, mentre erano ben colorabili con il May Grunwald-Giemsa (il loro protoplasma appariva azzurro scuro, i granuli rosso bruni) non si mettevano invece in evidenza con lo Ziehl. Notai pure forme bacillari tozze, più grosse di un comune bacillo di Koch, morfologicamente a lui simili, granulose, coloranti in bleu scuro con il Giemsa, i comuni bacilli di Koch si coloravano invece in rosso rosa.

In queste forme, specie in quelle del secondo tipo, a carico dei granuli si osservavano processi moltiplicativi del genere di quelli che il Mori ha descritto in alcune specie batteriche coltivate in terreno parapllassigeno; non vidi però mai l'ultimo quadro del ciclo da lui descritto cioè la frammentazione in elementi bacillari forniti di granuli uni o bipolari (figura 4).

Erano queste forme da attribuirsi al germe della tbc. oppure ad altre forme bacillari? Le ricerche bacterioscopiche eseguite negli escreati di pneumonici e di bronchiettasici e nei polmoni di individui morti in seguito a lesioni polmonari non tbc. (polmoniti, ascessi) diedero sem-

pre risultati negativi, che però non bastavano, da soli, a confermare la natura tbc. di queste forme. Una risposta sicura al riguardo non poteva essere data che da ricerche sistematiche eseguite sulle culture di bacilli tbc., dai primi tempi del loro sviluppo sino alla loro morte.

A questo scopo da tre culture di bacilli tbc. su patata glicerinata, provenienti dall'Istituto di Igiene della R. Università di Bologna, prelevai, di sei in sei giorni, dei frammenti di patina, che inclusi in paraffina; le culture al momento della osservazione avevano poco più di dieci giorni (17-3-1930), e vennero seguite per quasi tre mesi (30-5-1930).

TECNICA. — Per l'inclusione seguivo la tecnica indicata da Bezançon e Philibert: asportavo con una spatola rasente la superficie di impianto, un frammento di coltura della grandezza di 1/2 centimetro e lo fissavo, cercando di scoprirlo il meno possibile, in alcool assoluto, per una diecina di minuti; successivamente lo passavo in paraffina molle e poi nella dura, mantenendovelo, in tutto, non più di mezz'ora, quindi includevo. Le sezioni erano di tre quattro millesimi di millimetro e venivano montate e trattate come le comuni sezioni istologiche. Per la colorazione mi sono servito di numerosi metodi: Ziehl-Neelsen, con colorazione di contrasto con bleu di metile (metodo questo che permette una ricerca rigorosa dell'acido-resistenza, per potere fare la discriminazione tra parte acido-resistente e non acido-resistente delle colonie); Kirchenstein, Maj-Grumwald-Giemsa, ematossilina ed eosina, Bielskowskj-Maresch, colorazione con il bleu lattico, con la delta-purpurina e la benzo purpurina, il metodo di Babes per l'actinomyces, il violetto di genziana.

I metodi che mi risultarono meglio cor-

rispondere furono il Maj-Grumwal-Giems, lo Ziehl-Neelsen ed il violetto di genziana. Una colorazione che mi è sembrata mettere bene in evidenza la sostanza cianofila è la seguente: colorazione con una soluzione satura di safranina in acqua di anilina, per tre minuti, decolorazione con alcool assoluto; violetto di genziana di Nicolle per tre minuti; decolorazione con alcool assoluto.

ASPETTO DELLE CULTURE. — A piccolo ingrandimento le colonie hanno un aspetto areolare: la sostanza che le compone è divisa in tanti alveoli le cui travate di separazione si fondono le une con le altre; la parte superficiale ha aspetto ondulato e presenta delle profonde incisure dovute all'accrescimento in altezza delle singole pliche. Si notano talvolta due cavità areolari comunicanti fra di loro per mezzo di una specie di canale, più o meno stretto, limitate da un bordo più chiaro; spesso i canali di riunione sono virtuali per l'accollamento delle pareti dell'alveolo. Facendo delle sezioni in serie, si può riconoscere il meccanismo di formazione delle cavità di aspetto vacuolare, si vedono così due pliche superficiali, poste vicine l'una all'altra, riunirsi, poi, venute a contatto in un dato punto, fondersi.

Usando il metodo di Ziehl, le travate hanno un colore azzurro (sostanza cianofila di Bezançon e Philibert) e sono disseminate di piccoli punti violetti; a più forte ingrandimento (immersione) si vede che questi punti, di reazione colorante basica, sono formati dall'accollamento di 20,30 bastoncini più o meno flessuosi, tra loro paralleli, aventi l'aspetto e le dimensioni del comune bacillo di Koch. Nelle sezioni frontali, cioè verticali al piano di impianto delle culture, la parte azzurra occupa la porzione esterna, la parte rossa, bacillare, la parte interna; ma non in

tutte le sezioni: in alcune, ad es., in quelle condotte obliquamente, l'ordine può essere invertito e la sostanza cianofila può prevalere sulla parte bacillare esistente e viceversa.

Non osservai, anche in stadi avanzati di sviluppo delle culture, una prevalenza assoluta della parte acido-resistente sulla cianofila; è da notare però che in tal momento le colture non presentano più la struttura alveolare, simile ad un favo di api, che si ha nei primi tempi dello sviluppo, ma sembra che le singole travate si siano fuse tra loro a formare dei grossi sepimenti, fortemente colorati, che impartiscono, a medio ingrandimento, alle colture una struttura ancora alveolare, ma molto più grossolana.

Esaminando a forte ingrandimento e facendo oggetto di osservazione la sostanza cianofila, questa dà l'impressione di essere formata, in alcuni punti, da una membrana striata longitudinalmente, in altri da fibrille disposte parallelamente al grande asse delle travate più sopra descritte. Queste fibrille o filamenti, sono di molto inferiori allo spessore di un bacillo; alcune terminano liberamente, altre invece, per mezzo di una vera e propria anastomosi, si uniscono con un frammento di sostanza cianofila vicino; esse costituiscono come un intreccio, una trama, su cui sono appoggiati i bacilli acido-resistenti. Non osservai mai come riferiscono Bezançon e Philibert (83) bacilli acido-resistenti « juxtaposes aux filements appliqués sur eux, peut être substitués à une partie du filament » in modo da costituire « des véritables nervures cjanophiles sur lesquelles sont plaqués les bacilles, parfois très rares »; ma trovai sempre, limitatamente alle possibilità che offre il metodo di colorazione usato (Ziehl-Neelsen), una interdipendenza tra le due forme.

Se si osservano i singoli filamenti di sostanza cianofila posti ai margini delle culture, quindi liberi da sovrapposizioni, si vedono, lungo il loro asse longitudinale, dei piccoli ingrossamenti più scuri, che si potrebbero attribuire, grosso modo, ad un'addensamento della sostanza che compone il filamento. Questi addensamenti, o granuli, come si potrebbero anche chiamare, non sono posti uno di seguito all'altro, regolarmente, ma a distanza irregolare, lungo l'asse del filamento, in modo che questo appare, in alcuni punti, omogeneo, in altri interrotto a seconda della direzione e delle volute che esso compie. I bacilli di Koch acido-resistenti, come abbiamo già detto, sembrano, in alcune sezioni, intrecciarsi coi filamenti di sostanza cianofila, in altri (anche in sezioni diverse di una stessa inclusione) dominano da soli il campo; osservati a fortissimo ingrandimento, più particolarmente negli stadi avanzati di sviluppo delle culture (70 giorni), non appaiono come bacilli isolati, quali si presentano, ad es., negli escreati, ma come lunghe catene, fra loro intrecciate, aventi l'aspetto, grossolanamente, di un groviglio di spago. Come ho detto questo aspetto è più netto quando la coltura è vecchia, in questo stadio il bacillo appare anche più voluminoso, tinto vivamente in rosso, quasi che la sostanza acido-resistente che lo forma fosse aumentata; anche i granuli di Schrön-Mircoli-Much, appaiono più netti, tinti in bruno.

In uno stadio ancora più avanzato i bacilli, che apparivano costituire come una esile graticciata, circoscrivente, gli alveoli sudescritti, si agglutinano, si riuniscono a formare una massa omogenea rossa-viva in cui la struttura dei singoli bacilli rimane poco netta. Se si osservano le parti più sottili e marginali dei cumuli di bacilli, si vede che questi sono andati

incontro a processi di frammentazione, dividendosi ciascuno in frammenti minuti, di cui alcuni composti di sola sostanza acido-resistente, altri da questa e da un granulo di Schrön-Mircoli-Much.

Ho ritratto nelle microfotografie 5 e 6 due di questi stadi: nella prima si vedono bacilli che si agglutinano e tendono a fondersi in un'unica massa, nella seconda, la frammentazione di due bacilli, paralleli, in granuli minuti. In altre microfotografie, presentate nella seduta della *Società di Biologia Sperimentale di Bologna* il 18-12-1929 (64-65), ho seguito dettagliatamente le varie fasi di questo processo; non mi è stato però possibile trarre da esse clichés sufficientemente nitidi. Anche nella sostanza cianofila avvengono, negli stadi avanzati, dei fatti degenerativi: la striatura longitudinale appare meno netta, i singoli filamenti sembrano fondersi in una massa omogenea, tinta in bleu, in cui si vedono talora catenelle lineari di granuli, talora granuli sparsi, in parte degenerati. Questi granuli, contrariamente a quelli di Schrön-Mircoli-Much dei quali appaiono più grossi, in questo stadio, non sono né gram-positivi, né acido-resistenti.

Colorando le sezioni con il May-Grunwald-Giemsa appare abbastanza netta la differenza tra bacilli di Koch e sostanza cianofila; mentre questa è azzurra, quelli appaiono tinti debolmente in rosa; mentre nei primi i granuli di Schrön-Mircoli-Much sono poco visibili o mancano, nella seconda questi sono numerosi. Le due forme paiono intrecciarsi le une con le altre; i sottili filamenti che si mettevano in evidenza con il metodo precedente, qui non sono visibili; si ha pure l'impressione che i bacilli siano più esili, di volume inferiore al normale; ciò potrebbe essere dovuto, stando agli studi di Zironi (134), al fatto che la sostanza acido-resistente

forse non viene, con questa colorazione, messa in evidenza.

Il metodo che meglio permette di studiare la morfologia delle colture, nei loro singoli elementi, mi è apparso quello con la safranina ed il violetto di genziana che abbiamo più sopra descritto. Con questo metodo, usando forti ingrandimenti, le colture paiono costituite da tre gruppi di elementi morfologicamente diversi: forme bacillari tinte in rosso, con granuli azzurri, corrispondenti, per la forma e dimensioni, al comune bacillo di Koch; forme bacillari tinte in viola riunite in catenelle intrecciantisi a formare eleganti arabeschi ed infine sottili filamenti azzurri; queste due ultime forme sembrano continuarsi le une con le altre; meno netti sono i rapporti di continuità fra queste forme e quelle colorate in rosso. Seguendo, attraverso numerosi preparati, le varie fasi di sviluppo delle forme filamentose, si vede che in quelle più sottili, apparentemente omogenee, compaiono ad un dato punto, dei granuli numerosissimi che sembrano riempire tutto il filamento; in uno stadio ulteriore, questo si ingrossa, si tinge, anzichè in azzurro, in viola scuro, e viene ad assumere le dimensioni di un bacillo di Koch, senza però abbandonare la forma allungata. Nelle microfotografie ho cercato di ritrarre qualcuno di questi elementi, in quella numero 7 si vedono filamenti, in alcuni punti isolati (A) in altri (B) riuniti a formare eleganti volute; è abbastanza netto l'aspetto granuloso; in quella numero 8 si vedono (colture di 75 giorni) bacilli di Koch allungati, granulosi, fra loro intrecciantisi (A); frammezzo ad essi, poco evidenti, filamenti di sostanza cianofila (B).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI. — Allo scopo di eliminare le cause di errore nella interpretazione di queste forme filamen-

tose ho ripetuto le ricerche anche in ceppi diversi di bacilli tbc., ottenendo sempre risultati identici. Non credo si possa, nel nostro caso, trattare di inquinamento; infatti soltanto delle streptotriccee potrebbero simulare un reperto del genere; ma non si comprenderebbe come proprio queste, e non i comuni cocchi dell'aria avrebbero dovuto infiltrarsi nelle nostre colture. Un inquinamento da muffe è assolutamente da escludere per l'aspetto e lo spessore dei filamenti, per l'assenza di spore e per il fatto che, quando una muffa inquina tali colture, ben presto le invade in modo tale da non lasciare dubbi sulla sua presenza.

Un'altra ragione ancora ci conforta nella nostra ipotesi: mentre con lo Ziehl-Neelsen si mettono in evidenza soltanto le forme acido-resistenti e la sostanza cianofila, con il metodo da noi indicato, colorando sezioni in serie di una stessa inclusione, si vedono le tre forme descritte; se si trattasse veramente di un inquinamento dovremmo mettere in evidenza le forme parassite con entrambi i metodi, cosa che non avviene; per queste ragioni ritengo che le forme filamentose, da noi osservate nelle colture, debbano attribuirsi al bacillo tubercolare.

A mio modo di vedere due sono le interpretazioni che ci possono dare di queste forme; la prima che le forme bacillari adulte, granulose, acido-resistenti, nel corso del loro accrescimento, diano vita a singoli elementi, composti ciascuno di un granulo e di un'azione di protoplasma, riunito a formare lunghi e sottili filamenti. Ciò corrisponderebbe in parte, alle osservazioni di Kirchenstein (172) e di Bilello, e con quanto, anche io, ho potuto osservare in precedenti ricerche; accettando però questa ipotesi, si deve di conseguenza ammettere che gli elementi giovani, una volta separati dal

bacillo che li ha generati, perdano la loro acido-resistenza per riacquistarla, ad accrescimento compiuto, al momento in cui daranno vita a nuovi individui.

Seguendo la seconda interpretazione, si potrebbe ammettere che la forma primitiva del bacillo tbc. sia quella di un esile filamento, Gram-negativo, genzianofilo non resistente agli acidi; con l'ulteriore sviluppo, comparirebbero, nell'interno del filamento, granuli acido-resistenti, Gram-positivi (granuli di Schrön-Mircoli-Much, corpi gramofili) moltiplicantisi per divisione diretta; in questo momento comparirebbe l'acido-resistenza. Questa ipotesi è quella che a mio parere, è la più accettabile.

Bezançon e Philibert danno dei filamenti di cianofila una interpretazione diversa che si scosta da quanto noi abbiamo osservato; secondo questi AA. « Il semble que la colonie de bacille tuberculeux se développe tout d'abord sous forme de filaments de substance non acido-résistante (cyanophile) qui à un moment donné, se transforment en certains points en formes bacillaires dans les quelles apparaissent les corpuscules cromophiles, puis que les bacilles acido-résistante dégènèrent assez rapidement pour ne laisser persister que ces corpuscules cromophiles ». Queste osservazioni confortano l'ipotesi che recentemente ho avanzato, cioè che i granuli di Schrön-Mircoli-Much siano dei normali, costanti componenti del bacillo tbc., partecipanti attivamente ai suoi fenomeni moltiplicativi. Quanto ai granuli, in cui la sostanza cianofila si risolve quando la coltura invecchia, credo probabile debbano considerarsi come forme degenerative: il loro volume maggiore di un comune granulo di Schrön-Mircoli-Much, la mancata resistenza agli acidi ed agli alcool, il trovarsi in seno alla sostanza cianofila, quando questa è degenerata, e solo

in essa, infine la loro scomparsa negli stadi ultimi delle colture e l'assenza nelle prime fasi dello sviluppo, a mio modo di vedere, parlano in favore di questa ipotesi. Parimenti, per le ragioni ora esposte, non credo esista qualche analogia fra di essi ed i frammenti in cui si spezzano i bacilli di Koch nelle vecchie colture.

Non mi pare quindi che al granulo, come granulo, si possa dare, come fanno Bezançon e Philibert, un valore di unità a sè, simile a spora.

« Sans doute, essi scrivono, il ne s'agit pas des spores comparables a celles du bacille du carbon, du bacille de Nicolaier elles en diffèrent, en particulier, par leur moindre résistance à la chaleur, mais les corpuscules cromophiles ont des caractères qui permettent de les considérer comme des éléments de résistance du parasite et des éléments de reproduction: leur formation exclusive à l'intérieur du bâtonnet acido-résistant, leur persistance après la disparition de celui-ci montrent bien que le bacille semble être l'organe destiné à produire ces éléments. Nous avons vu que, dans les voiles très vieux, les éléments bacillaires ont presque disparus, mais la substance cyanophile, déjà en désintégration, est bourrée de corpuscules cromophiles; une telle culture, bien qu'il n'y reste que quelques bâtonnets fuchsinophiles, est, dans certains cas, encore repiquable, nous avons pu en réensemencer un âgé de 21 mois avec succès. Il est logique de supposer que ce sont les corpuscules qui représentent la seule partie résistante et non dégénérée de la culture qui sont l'origine de la genèse de la nouvelle colonie ».

Ciò non esclude però che anche fra gli ammassi di granuli ed i frammenti di sostanza acido-resistente permangano bacilli capaci di causare una nuova infezione.

Quale è il significato dell'acido-resi-

stenza del bacillo tbc.? scrive Lustig (161) che « secondo vari ricercatori, Koch compreso, e specialmente secondo Marmorek (77-78-79), il bacillo di Koch, varierebbe nella sua colorabilità, secondo la sua età; i bacilli giovani sono sempre più colorabili di quelli vecchi con i comuni colori di anilina, inoltre i giovani bacilli si scolorano, non facilmente, sotto l'azione degli acidi e degli alcool, vale a dire sono meno acido-resistenti e meno alcool-resistenti; tali forme quindi, nell'ordinario procedimento, si scolorano con il processo di Neelsen o qualunque altro processo ed assumono poi i colori di anilina. Anche nel corpo bacillare di forme più vecchie si hanno zone che non resistono alla scolorazione ed assumono il colore di contrasto, mentre altre volte, nei corpi cellulari di grossi bacilli provenienti dalle caverne si hanno forme affatto colorabili alla prima come alla seconda colorazione e che appaiono come vacuoli ».

Krjlow (133), nel lavoro citato, seguendo lo sviluppo delle culture, notò che i giovanissimi bacilli di Koch sono Gram-negativi ed in uno stadio ulteriore Gram-positivi e, solo in seguito, acido-resistenti. La sostanza Gram-positiva compare per lo più, nei giovani bacilli, localizzata in granuli rigonfianti i germi, l'acido-resistenza per contro, è diffusa.

Secondo Zironi (134) l'acido-resistenza del bacillo di Koch sarebbe dovuta alla comparsa, nei giovani bacilli tbc., di uno o più granuli o di masserelle, le quali, ingrandendosi sempre più e conflueno assieme, finiscono, col rendere il bacillo interamente ed intensamente acido-resistente e notevolmente più grosso e tozzo.

Nei nostri preparati non fu possibile cogliere nettamente la trasformazione della sostanza cianofila nelle forme acido-resistenti; viene però spontaneo avanzare l'ipotesi che questi ultimi non rappresen-

tino che uno degli stadi attraverso i quali passa il bacillo tbc., probabilmente l'ultimo: la maturazione. Maturazione e non degenerazione, perchè nelle zone acido-resistenti si osservano ancora processi moltiplicativi ed invariata permane la virulenza, anche quando esse sono ridotte, nelle vecchie culture, a minuti frammenti.

Quale è l'ulteriore destino degli ammassi di granuli e di frammenti bacillari in cui si risolvono le colture negli ultimi stadi del loro sviluppo?

Scriva Kahn, in un suo recente lavoro, che i bacilli tbc. acido-resistenti, osservati al microscopio manipolatore, in particolari terreni culturali, presentano, dopo ventiquattro-quarantotto ore, dei fenomeni di moltiplicazione a carico dei granuli, del genere di quelli osservati da Kirchenstein, da Billelo ed anche da me, fenomeni che possono ricondursi allo schema di Mori (fig. 4). Dopo un determinato tempo, ventiquattro-quaranta ore, i fenomeni moltiplicativi si arrestano ed il bacillo va incontro a processi degenerativi, frammentandosi in « très fins cocci ou diplocoques, trop petits pour être mesurés, dont quelques-uns se groupent en chapelets courts ». Queste forme non sono acido-resistenti, e tendono poi ad agglutinarsi in modo che « on voit se former des amas et les particules qui les composent deviennent de plus en plus petites, de sorte que, si on prolonge l'incubation de vingt quatre à quarante-huit heures, on ne trouve plus, dans les micro-gouttelettes, que des petits amas des particules très fines, en poussière.

« Ces amas restent inchangés pendant des périodes de temps variables (vingt-quatre, quarante-huit heures ou plus). On peut cependant voir naître à leur périphérie les plus délicats bâtonnets qu'on puisse imaginer. Au début ces bâtonnets

sont tellement grêles qu'on les identifie difficilement. Ils poussent avec une rapidité variable jusqu'au moment où ils deviennent des bacilles adultes acido-resistants. Quelque uns de ce fins bâtonnets se séparent de l'amas ou ils ont pris naissance et se développent à una certaine distance de celui-ci.

«Cependant le plus grand nombre d'entre eux ne s'en écartent pas et y complètent leur développement» In altre parole, la forma iniziale del bacillo della tubercolosi, secondo Kahn, è quella di un esile filamento, non acido-resistente, il quale si trasforma, con rapidità variabile, in un bacillo di Koch, che, a sua volta, si divide in granuli minutissimi *non acido-resistenti*, simili a polvere, che generano poi un nuovo filamento.

Possiamo riferire la descrizione di questo Autore a ciò che abbiamo osservato nelle culture, seguite, passo passo, nelle varie fasi del loro sviluppo? A mio modo di vedere, pur tenendo in considerazione le differenti condizioni di osservazione e di esperimento, non mi pare possibile; Kahn dice che i filamenti si generano dai bacilli acido-resistenti quando questi si frammentano in minuti grani; ora in questo stadio, che noi abbiamo riscontrato solo nelle vecchie culture, anche la sostanza cianofila, con cui si possano identificare gli elementi descritti da questo Autore, va incontro a processi degenerativi; viceversa, quando i filamenti di sostanza cianofila sono abbondanti ed in pieno sviluppo, (prime settimane) i bacilli acido-resistenti sono integri, per nulla alterati nel loro caratteristico aspetto.

Tuttavia una parola definitiva in proposito credo possa essere data solo da ricerche, condotte metodicamente nei vari tessuti tbc., con lo scopo di seguire, passo passo, le varie fasi di sviluppo del germe;

sto eseguendo appunto ricerche in questo senso, ed i risultati sino ad ora ottenuti, mi fanno sperare di poter portare un po' di luce nella questione.

CONCLUSIONI.

In base ai risultati delle nostre esperienze possiamo trarre due conclusioni:

1° I materiali tbc., filtrati attraverso candela, sia a fresco, che dopo un soggiorno più o meno lungo in termostato od all'aria, si sono dimostrati privi di potere patogeno per le cavie; in esse però, all'autopsia, fu dato riscontrare un notevole ingorgo delle ghiandole dell'ilo polmonare. Gli esami batterioscopici condotti negli strisci di queste ghiandole furono negativi, eccezione fatta per quattro animali, in cui fu possibile mettere in evidenza forme bacillari, non acido-resistenti, colorate con lo Ziehl in bleu rosastro, non riferibili, per la loro morfologia e per le loro qualità tintoriali, al bacillo di Koch.

L'esame istologico metteva in evidenza il quadro di una iperplasia ghiandolare acuta, con emorragie, zone di necrosi, ed assenza di lesioni imputabili alla tbc. Il tentativo di riprodurre con acido solforico e idrato di sodio, materiali usati per la omogeneizzazione dei materiali tbc. filtrati, l'adenopatia, fu negativo.

Non ebbimo a notare alcuna differenza di comportamento fra le cavie inoculate con materiale tbc. filtrato a fresco e quelle inoculate con materiale filtrato dopo conservazione in termostato od all'aria; le reazioni tubercoliniche, negli animali inoculati, furono sempre negative.

2° Gli esami istologici di sezioni di colture di bacilli della tbc., misero in evidenza, accanto ai tipici bacilli di Koch, forme allungate, non acido-resistenti co-

lantisi in azzurro con lo Zielh Neelsen (sostanza cianofila di Bezaçon e Philibert); adoperando particolari accorgimenti tintoriali abbiamo potuto osservare che queste forme, nei primi stadi del loro sviluppo, sono omogenee, in seguito compaiono nel loro interno dei granuli, numerosissimi, che impartiscono al filamento l'aspetto di un rosario; crescendo ancora, il filamento viene ad assumere le dimensioni di un bacillo di Koch, da esso si distingue però per la proprietà di non colorarsi con la safranina, di essere Gram-negativo, e di colorarsi in viola con il violetto di genziana.

Questi filamenti, intrecciandosi gli uni con gli altri, formano degli eleganti arabeschi; paiono anche essere dotati di una certa resistenza, perchè resistono più a lungo, nelle colture vecchie, ai processi degenerativi. Anche le forme acido-resi-

stenti, negli stadi avanzati di sviluppo, non appaiono più con l'aspetto di bacilli isolati, quali si presentano ad esempio nell'escreato, ma come lunghe catene di elementi, fra loro intrecciati, aventi l'aspetto, grossolanamente, di un groviglio di spago; in questo stadio il bacillo appare più voluminoso, tinto vivacemente in rosso, quasi che la sostanza acido-resistente fosse aumentata. Mentre è facile cogliere il passaggio dei filamenti omogenei in quelli granulosi, meno chiara è la trasformazione di queste forme in bacilli acido-resistenti. Fra le forme atipiche del bacillo tbc., da noi osservate negli escreti, e quelle studiate nelle colture, esistono, sia dal punto di vista morfologico che tintoriale, molti punti di contatto: ricerche ora in corso, condotte in tessuti tbc., varranno a delucidare questo punto.

RIASSUNTO.

L'A. previa una diligente rassegna della letteratura al riguardo, prendendo lo spunto da due precedenti ricerche, ha studiato:

1° La filtrabilità del germe della tubercolosi nei materiali tubercolari, sia a fresco, che dopo un soggiorno prolungato dei materiali stessi in termostato od all'aria.

2° La morfologia delle colture di bacilli di Koch, seguite attraverso sezioni istologiche, dai primi giorni del loro sviluppo alla loro morte.

In base ai risultati delle sue esperienze conclude che:

1° I materiali tbc., filtrati attraverso candela, sia a fresco che dopo un prolungato soggiorno in termostato, si sono dimostrati privi di potere patogeno per le

cavie; hanno provocato però in esse un notevole ingorgo delle ghiandole dell'ilo polmonare. L'esame istologico di queste ghiandole metteva in evidenza il quadro di una iperplasia ghiandolare acuta, con emorragie, zone di necrosi ed assenza di lesioni tbc. L'esame batterioscopico rivelava, in alcune di esse, la presenza di germi non riferibili, per la loro morfologia e le loro proprietà tintoriali, al classico bacillo di Koch.

Il tentativo di riprodurre, con soluzioni di acido solforico ed idrato di sodio, sostanze usate per la omogeneizzazione dei materiali tbc., la adenopatia, è stato negativo.

2° L'esame istologico delle sezioni di colture di bacilli della tbc., ha messo in evidenza, accanto ai tipici bacilli di Koch, forme filamentose, allungate, non acido-

resistenti, colorantesi in bleu con lo Ziehl. Usando particolari accorgimenti tintoriali, l'A. ha potuto osservare che queste ultime forme, nei primi stadi del loro sviluppo, sono omogenee, in seguito compaiono nel loro interno dei granuli numerosissimi, che impartiscono al filamento l'aspetto di un rosario; crescendo ancora, il filamento viene ad assumere le dimensioni di un bacillo di Koch, da esso si distingue però per la proprietà di non colorarsi con la safranina, di essere Gram-negativo, e di colorarsi in viola con il violetto di genziana.

Anche le forme acido-resistenti, negli stadi avanzati di sviluppo, non appaiono più con l'aspetto di bacilli isolati, quali si presentano ad esempio nell'escreato, ma come lunghe catene di elementi, fra loro intrecciati; in questo stadio il bacillo appare più voluminoso, tinto vivacemente in rosso, quasi che la sostanza acido-resistente fosse aumentata. Mentre è facile cogliere il passaggio dei filamenti omogenei in quelli granulosi, meno chiara è la trasformazione di queste forme in bacilli acido-resistenti.

ZUSAMMENFASSUNG.

Ausgehend von seinen früheren diesbezüglichen Studien und nach Würdigung der einschlägigen Literatur untersucht der A.:

1°) Die Filtrierbarkeit des Tbc. Virus in tuberkulösem Material, sowohl in frischem Zustand, als auch nach längerer Aufbewahrung im Brutschrank oder an der freien Luft.

2°) Die Morphologie der Kulturen des Koch'schen Bazillus, unter histologischer Beobachtung von den ersten Tagen der Entwicklung bis zu ihrem Untergang.

Die Untersuchungsergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1°) Das tbc. Material erwies sich nach Passage durch Kerzenfilter, im frischen Zustand wie nach längerem Brutschrankaufenthalt, als nicht pathogen für Meerschweinchen, wenngleich die Versuchstiere eine bemerkenswerte Schwellung der Drüsen entsprechend einer akuten Hyperplasie mit Blutungen und nekrotischen Zonen bei Abwesenheit tbc. Veränderungen aufwiesen. Bei der bakteriologischen

Überprüfung fanden sich in einigen dieser Drüsen Keime, die weder ihrer Form nach, noch auch im färberischen Verhalten zum klassischen Koch'schen Bazillus in Beziehung gebracht werden konnten.

Kontrollversuche, analoge Drüsenveränderungen mit einfachen Lösungen von Schwefelsäure und Natronlauge (welche Substanzen zur Aufschliessung des tbc. Ausgangsmaterial gedient hatten) zu erzielen, hatten negatives Ergebnis.

2°) Die histologische Überprüfung von Kulturen des tbc. Bazillus ergab neben dem typischen Koch'schen Bazillus auch fadenartige, langgestreckte, nicht säurefeste, nach Ziehl sich blau färbende Formen. Mittels einer verfeinerten Färbetechnik konnte der A. beobachten, dass diese letzteren Formen im ersten Entwicklungsstadium homogene Struktur besitzen, während in der Folge in ihrem Inneren zahlreiche Körner auftreten, die dem Faden das Aussehen eines Rosenkranzes geben; im Laufe des weiteren Wachstums erreicht der Faden die Grösse eines Koch'schen Bazillus, unterscheidet sich aber von diesem durch die mangelnde

Färbbarkeit mit Safranin, durch den Gramnegativen Charakter und durch die Violett-färbung mit Genzianviolett.

Auch die säurefesten Formen erscheinen im vorgerückten Entwicklungsstadium nicht mehr als einzelne Bazillen wie etwa im Auswurfe, sondern in langen, verknäulten Ketten: in diesem Stadium

erscheint der Bazillus voluminöser, lebhaft rot gefärbt, als ob die säurefeste Substanz vermehrt wäre. Während der Übergang von der gleichmässig strukturierten in die körnige Fadenform leicht zu verfolgen ist, bleibt die Umwandlung dieser letzteren Formen in säurefeste Bazillen weniger klar.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. EASTWOOD: *Reports of the Royal-Commission on Tuberculosis*, 1907-1911.
2. SPENGLER C.: *Deutsch Med. Woch.*, 1907, 33, 337.
3. KOCH R.: *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1882, 15, 221.
4. EHRLICH: *Deutsche Medicinische Woch.*, 1882, 19, 269.
5. EHRLICH: *Deutsche Medicinische Woch.*, 1883, 11, 159.
6. PETRONE: *Atti Accademia Medico-Chirurgica Napoli*, 1884.
7. NOCARD e ROUX: *Annales Inst. Pasteur*, vol. I, 1887, pag. 19.
8. METSCHNIKOFF: *Virchow Archiv*, Bd. III, 1888, 63.
9. MAFFUCCI A.: *Zeitschrift für Hygiene und Infectious Krankheiten*, Bd. XI, 1892, pag. 445.
10. FISCHEL: *Untersuchungen über die Morphologie und Biologie des Tuberculose-erregers* (Verlag Braumüller Wien, 1893).
11. COPPEN JONES: *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, Bd. XVII, 1895, 1, 70.
12. HAYO BRUNS: *Id.*, Bd. XVII, 1895, 817.
13. BABES: *Zeitschrift f. Hygiene und Infectiouskrank.*, Bd. XX, 1892, pag. 412.
14. KLEIN: *Centralblatt f. Bakt. und Parasit.*, Bd. XII, 1892, 90.
15. SEMMER: *Deutsche Zeitschrift f. Thiermedizin*, Bd. XXI, pag. 213 (citato da D. PANE).
16. DIXON: *Centralbl. f. Bakteriolog. und Parasit.*, Bd. XV, 1899, pag. 492.
17. MARPMANN: *Id.*, Bd. XXII, pag. 582, 1899.
18. SCHULTZE: *Zeitschr. f. Hyg. und Infectious Krankheiten*, Bd. XXXI, pag. 153, 1899.
19. ARLOING: *C. R. Acad. Scienc.*, 1907.
20. PEHU e RAJOT: *C. R. Soc. Biologie*, 1907.
21. PANE D.: *Sulla Morfologia e sulla posizione sistematica del bacillo tubc.* (Tipografia e Leg. Cooperativa, Pavia, 1907).
22. FRAENKEL: *Centralblatt f. Bacteriologie und Parasitenkunde*, Bd. XXIX, 1903.
23. FRIEDRICH: *Deutsche Medicinische Wochen.*, 1897, n. 41.
24. BABES e LEVADITI: *Arch. Med. Esperim. et Anat. Patologique*, 1897.
25. SCHULTZE: *Zeitschr. f. Hyg. und Infectiouskrank.*, Bd. XXXI, 1899, pag. 153.
26. LUBARSC: *Id.*, Bd. XXXI, 1899, pag. 187.
27. MOELLER: *Deutsche Mediz. Wochens.*, 1898, pag. 376.
28. BABES: *Zeitschr. f. Hyg. und Inf.*, Bd. V, 1889, 173.
29. NEUMANN e LEHMANN: *Atlas und Grundriss der Bakteriologie* (München, 1904).
30. BOSTROEM: *Ziegler's Beiträge*, Bd. IX, 1891, pag. 1.
31. SANFELICE F.: *Bacilli della tbc. e bacilli acido-resistenti* (Boll. Ist. Sieroter. Mil., dic. 1920, n. 6).
32. MAGGIORA e ILVENTO: *Comunicazione al III Congresso Nazionale contro la Tuberculosi*.
33. FRANCO P. M.: *Le pseudotubercolosi* (Napoli, Idelson, ed., 1930).
34. KRUSE FLUGGE: *Die Mikroorganismen* (Leipzig, 1896), Bd. II, pag. 48.
35. LOPRESTI SEMINERIO: *La Pediatria*, n. 20, 1921.
36. BRUSA: *Policlinico*, sez. prat., n. 30, 1922.
37. FRANCO P. M.: *Rif. Medica*, n. 41, 1922.
38. D'ARRIGO: *Atti del Congresso contro la tbc.*, Napoli, 1900.
39. MIRCOLI: *Gazzetta Ospedali e Cliniche*, 1900, n. 42 e 1905, n. 49; *Pathologia*, 1912, pag. 315 e 1915, pag. 183; *Folia Medica*, 1924, pag. 602.
40. MUCH: *Beitr. zur klin. der Tuberc.*, 1902.
41. MUCH: *Id.*, 1908.
42. WIRTHS: *Münch. Med. Woch.*, n. 22, 1908.
43. SCHOTTMÜLLER: *Id.*, n. 49, 1908.
44. NEUMANN e MATSON: *Beitr. zur Klin. der Tuberc.*, 1924.
45. DE MARTINI: *Riforma Medica*, 1922.
46. WEIL, DUFOURT e ARLOING: *Revue de la Tuberc.*, 1921.
47. BERGEL: *Beiträge zur Klin. der Tub.*, Bd. 38, 1920.
48. KRYLOW: *Deutsche Med. Woch.*, 1920, n. 28.
49. PETER: *Beitr. zur Klin. der Tub.*, Bd. 52, 1922.
50. TALLO: *Gazzetta Intern. Med. Chirurgia*, 1915, n. 16.
51. MONTANARI: *Riv. Clin. Medica*, 1907, n. 17.



52. HAUDUROY e VAUDREMER: C. R. S. B., 9 giugno 1923.
53. HAUDUROY e VAUDREMER: Deutsche Med. Woch., 1926.
54. PERITI: Policlinico, sez. med., 1928.
55. BESANÇON e PHILIBERT: Presse Méd., 1926, pag. 33.
56. TRIMARCHI: Soc. Biologia Sperimentale, 1929.
57. KNOLL: Beitr. zur Klin. der Tub., 1910.
58. SPENGLER: Deutsche Med. Woch., n. 33, 1907.
59. BABES: C. R. S. B., 1910, pag. 315.
60. KNOLL e VEHLRI: Beiträge zur Klin. der Tub., 1909, Bd. 14.
61. DEYCKE: Münch. Med. Woch., 1910.
62. BITTOORF e MOMOSE: Deutsche Med. Woch., 1912, n. 1.
63. BORGHESI: Pathologica, 15 marzo 1914.
64. SCARZELLA: Soc. Biologia Sperimentale, dic. 1929.
65. SCARZELLA: Rivista di Batt. Imm., n. 4, 1930.
66. FERRÀN: Revue de Médecine, 1901, 21, pag. 1009.
67. FERRÀN: Id., 1902, 22, 54.
68. FERRÀN: Archives Générales de Médecine, 1903, 3.
69. FERRÀN: C. R. Soc. Biologie, 6 agosto 1897.
70. MARTINEZ VARGAS: Informe acerca de la vacuna anti-alfa del Dr. Ferràn (Medicina los niños, 1927).
71. MARTINEZ VARGAS: Id., novembre 1929, pag. 321.
72. AUCLAIR: Archives Médecine expérimentale, 1903, 15, 469.
73. VAUDREMER: C. R. Soc. Biol., 1921, pag. 259.
74. VAUDREMER: Id., 1921, 1055.
75. MONIAS B. L.: Pharm. Monatsheften, 1921 (citato da Vargas).
76. RAVETILLAT JOAQUIN e R. PLA y ARMENGOL: La bacteria de la tuberculosis (Publicaciones del Instituto Ravetillat-Pla, n. 2, mayo 1924).
77. MARMOREK: Acad. Méd. Paris, 1903, 332, 465-480.
78. MARMOREK: Berl. Med. Klin. Woch., 1906, 3, 58.
79. MARMOREK: Berl. Med. Klin. Woch., 1907, 44, 18.
80. BORGHESI: Pathologica, 15 marzo 1930.
81. KRYLOW: Zeitsch. für Hyg., 1911.
82. BACICALUPO: Semana Medica, 1922.
83. BESANÇON e PHILIBERT: Presse Méd., 1926, pag. 33.
84. VELEZ: El Polimorfismo del Virus tuberculoso (Publicaciones del Inst. Ravetillat-Pla, dic. 1927).
85. ALMEIDE (de) MAGALHAES: Id., 1929.
86. ALMEIDE (de) MAGALHAES: Comunicazione al XX Congresso Pan-Americano della tbc., Rio de Janeiro, giugno-luglio 1929.
87. PETROFF: Comunicazione alla VI Conferenza internazionale contro la Tuberculosis in Roma, ottobre 1928.
88. RABINOVITSCH: Id. id.
89. DE SANCTIS MONALDI: C. R. Soc. Biologie, pag. 9, 1929.
90. ZLATOGOROFF: Ann. Inst. Pasteur, n. 43, pag. 1654, 1929.
91. MELLON e JOST: citato da Ninni.
92. SELTER e BLUMENBERG: Centralbl. für Bakt., p. 100, 1929.
93. KELLER e WERTHMAR: Zeit. f. tub., Bd. 54, H. 1, 1929.
94. JAN VAN DER CEE: Dissertation unter Aldershoff. Utrecht, 1928 (citato da Segal e Brustolon).
95. LANGE e KLAUBERG: Zeit. f. Tuberk., H. 1, Bd. 53, 1929.
96. NÈGRE, BOUQUET e CERTONCINY: C. R. Soc. Biologie, pag. 1667, 17 dicembre 1927.
97. ARLOING e DUFOURT: C. R. Soc. Biologie, pag. 455, 1929.
98. SAENZ: C. R. Soc. Biologie, 1928.
99. SAENZ: Id., pag. 629, 1929.
100. DEBRÉ, LELONG e BONNET: C. R. Soc. Biol., pag. 235, 1926.
101. VALTIS SAENZ e DE SANCTIS MONALDI: C. R. Soc. Biologie, 1558, 1928.
102. VALTIS: Paris Medical, 1929, n. 2 (citato da Segal e Brustolon).
103. VALTIS: C. R. Soc. Biologie, pag. 353, 1929.
104. VALTIS e LECOMME: Id., pag. 447, 1928.
105. VAUDREMER e LECOMME: Id., pag. 259, 1921.
106. VAUDREMER e HAUDUROY: Id., pag. 1276, 1923.
107. TOCUONOFF: Id., pag. 349, 1927.
108. KIRCHNER: Beitr. Klin. Tub., Bd. 70, 1928.
109. MUDD: citato da Veratti.
110. FESSNER: citato da Veratti.
111. VALTIS e SAENZ: C. R. Soc. Biol., pag. 134, 1930.
112. SEPELLI e RAVASINI: Boll. Ist. Sieroter. Mil., pag. 341, 1930.
113. BOUQUET, NÈGRE e VALTIS: C. R. Soc. Biol., pag. 235, 1926.
114. ARLOING, TREVENOT, DUFOURT e MALARTRE: Bull. Ac. de Médecine, pag. 208, 1927.
115. VALTIS e SAENZ: C. R. Soc. Biol., pag. 353, 1929.
116. CLEVELAND, FLOYD, MARGARET CHASE HEERIK: Am. Rev. of Tbc., pag. 323, 1927 (citato da Segal e Brustolon).
117. RABINOWITZ: Deut. Med. Woch., pag. 1982, 1927.
118. BLUMENBERG e SELTER: Centr. f. Bact. Parasit. und Inf., Bd. 110, H. 6-8, 1929 (citato da Segal e Brustolon).
119. STERLING e OKUNIEWSKI: C. R. Soc. Biol., pag. 71, 1928.
120. DURAND: VI Conferenza Internazionale contro la Tuberculosis.
121. FONTES: Forme filtranti del virus tbc. (Archivio Med. Chir. del Brasile, n. 10, 1926).
122. KAHN MORTON: Ann. Inst. Pasteur, 1930, pag. 259.
123. KAHN MORTON: American Review of Tub., vol. XX, n. 2, 1929.
124. HAUDUROY: Presse Méd., pag. 924, 1930.
125. CALMETTE: Presse Méd., pag. 385, 1930.
126. SERCENT, DURAND, KOURILSKY e BENDA: Presse Méd., 1930, pag. 889.
127. JOUSSET A.: Presse Méd., pag. 691, 1930.
128. VERATTI E.: Riv. di Terapia e Clin. della Tuberc., 1930, pag. 630.
129. SEGA e BRUSTOLON: Id., 1930, pag. 441.

130. VAUDREMER: C. R. Soc. Biol., 1921, pag. 259.
131. VAUDREMER e HAUDUROY: C. R. Soc. Biol., 1923, pag. 1275.
132. NINNI: Giornale Batteriologia e Immunologia, pag. 477, 1930.
133. KRYLOW: Zeitschr. f. Hygiene, 1912, vol. 70 (citato da ZIRONI).
134. ZIRONI: Boll. Ist. Sieroter. Mil., n. 4, 1920, pag. 239.
135. BORGHESI: Pathologica, 1914.
136. BACIGALUPO: Semana Medica, 1922 (citato da Ravetlat-Pla).
137. COURMONT e PANISSET: *Précis de Microb. des Mal. infect. des animaux*, 1914.
138. SWEANJ: citato da Kahn.
139. LEGROUX e MACROUX: Ann. Pasteur, 1920, p. 417.
140. VALTIS: C. R. Soc. Biol., 1926, pag. 237.
141. VALTIS, NÈGRE e BOQUET: Id., 1927, 1667.
142. CASAGRANDI: Boll. Accad. Med. Roma, 1927, pag. 169.
143. SERGENT e KOURILSKY: Presse Méd., pag. 187, 1930.
144. TAGLIABUE: Boll. Ist. Sieroter. Mil., pag. 217, 1928.
145. SELTER e BLUMEMBERG: Centralbl. f. Bakt., p. 100, 1929.
146. KELLER e WERTHMAR: Zeit. f. T.B.C., Bd. 54, H. 1, 1929.
147. DESSY: VI Conferenza Internazionale contro la Tuberculosis.
148. DESSY: Boll. Ist. Sieroter. Mil., 1926, pag. 245.
149. GALLI: Boll. Ist. Sieroter. Mil., 1928, n. 12.
150. MONTEMARTINI: Boll. Ist. Sieroter. Mil., 1925, p. 1.
151. HABABOU SALA: C. R. Soc. Biol., 1928, pag. 1915.
152. MELLON e JOST: The Am. Rev. of Tub., 5 maggio 1929, pag. 485.
153. BRUNI e SEGRE: *Reazioni delle cellule alle infezioni tubercolari* (Sperling e Kupfer, Milano, 1929).
154. CALMETTE: *L'infection bacillaire et la t.b.c. chez les hommes et les animaux* (Masson, Paris, 1928).
155. HAUDUROY: *Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes* (Masson, Paris, 1929).
156. REDAELLI: *Studi nelle nocardiasi Sperimentale Actinomicosi Streptotricosi* (Boll. Ist. Sieroter. Mil., 1928, pag. 75 e 239).
157. KARWACKI: Zentralblatt für Bakteriologie, n. 1, 1931.
158. DESSY: Bollettino Ist. Sier. Mil., pag. 442, 1930.
159. MORELLI E.: Id., 1930, pag. 367.
160. LEVI: *Trattato di istologia* (U. T. E. T., 1927).
161. LUSTIG: *Malattie infettive* (ed. Vallardi, 1922).
162. OTTOLENGHI: *Microparassiti vegetali* (U. T. E. T., 1928).
163. VERATTI: *La tubercolosi dal punto di vista clinico e sociale*, 1921.
164. SANARELLI e ALESSANDRINI: Annali di Igiene, n. 8, 1930.
165. DOP e GAUTÈ: *Manuel de Technique botanique* (Lamarre ed., Parigi, 1928).
166. SANDER: Archiv für Hygiene, Bd. XVI, 1892, pag. 238 (citato da D. Pane).
167. DURAND, KOURILSKY e BENDA: C. R. Soc. Biol., pag. 151, 1928.
168. PETRAGNANI: Annali d'Igiene, fasc. 10, 1927.
169. PETRAGNANI: Bollettino Ist. Sieroter. Mil., 1926, n. 4, e 1928, n. 12.
170. ARLOING, DUFOUT e MALARTRE: Paris Méd., n. 1, 1926.
171. MAYER: Flora, Bd. LXXXIV, 1897, pag. 185 (citato da D. Pane).
172. KIRCHENSTEIN: Ann. Inst. Pasteur, 1922.
173. KNOLL: Beiträg. zur Klin. der Tuberk., 1909, Bd. XIV.
174. DESSY: Boll. Ist. Sieroter. Mil., 1925.
175. MONTEMARTINI: Id., 1925.
176. GALLI: Id., 1928.

