



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

Dott. B. ROMANO

RICERCA DEI BACILLI DI KOCH
NEI MATERIALI SOSPETTI
COL METODO DELLA « GOCCIA OMOGENEIZZATA »

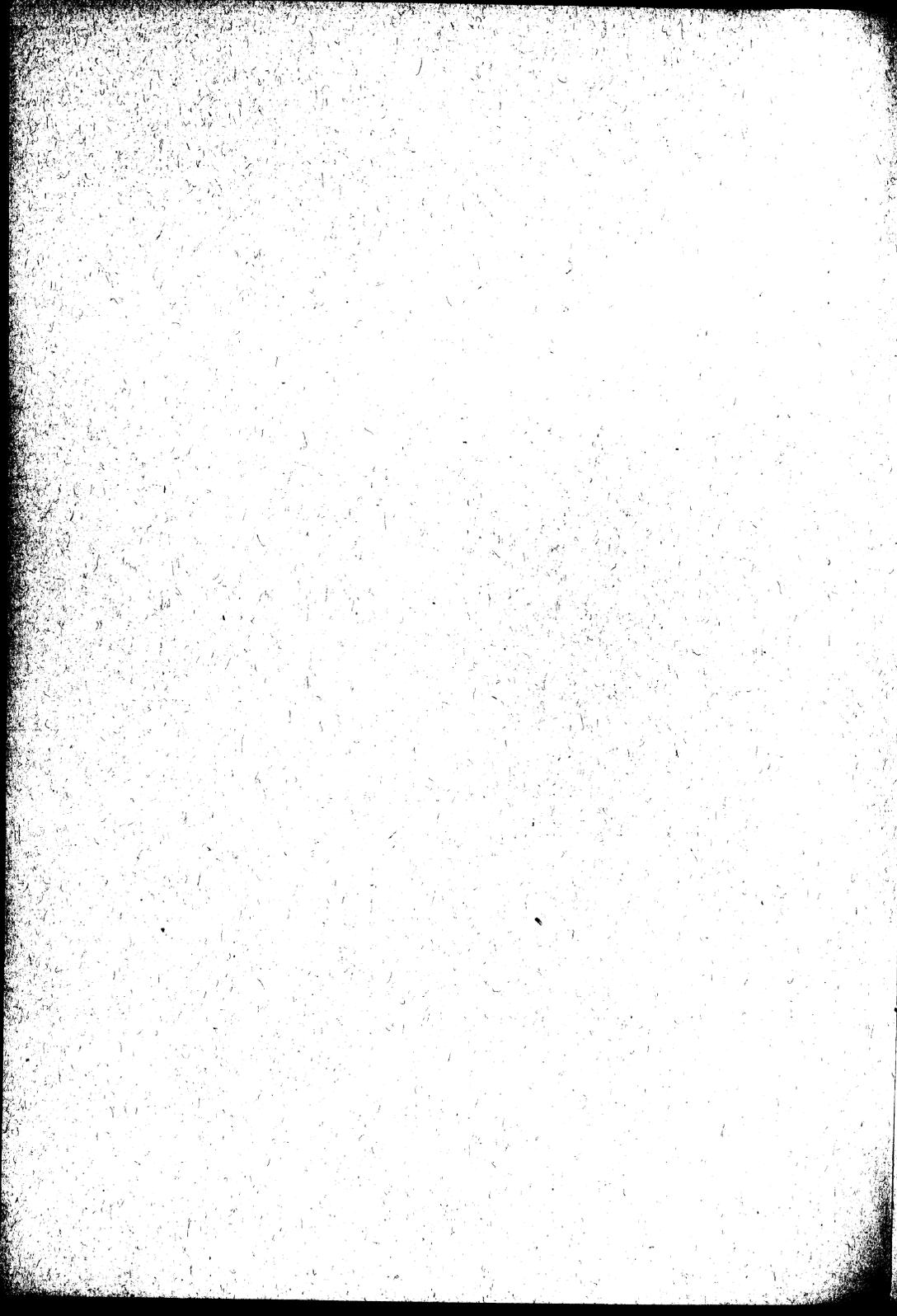
Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»

Anno IV N. 11-12 Pag. 936-942



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 17

—
1940-XIX



RICERCA DEI BACILLI DI KOCH NEI MATERIALI SOSPETTI
COL METODO DELLA « GOCCIA OMOGENEIZZATA »

Dott. BRUNO ROMANO, Assistente volontario

Fra i diversi metodi per la ricerca e la dimostrazione del BK nei materiali sospetti, senza dubbio, quello di maggior diffusione è l'esame diretto microscopico. E ciò per ovvie ragioni che superfluo sarebbe elencare. Ma d'altra parte esso presenta degli svantaggi (ben noti, ad es., a chi si è trovato nelle condizioni di porre diagnosi di guarigione nella tbc. polmonare sulla sola scorta del reperto microscopico; o nelle condizioni non meno scabrose di porre quella diagnosi precoce che tanta parte ha in tema di tubercolosi, vista come problema sociale), che i ricercatori di ogni tempo hanno cercato di ovviare. E recentissima infatti, in questo genere di ricerche, l'introduzione del microscopio a fluorescenza, mentre di parecchi anni or sono è il metodo di OSOL. Questo autore russo nel 1927, rifacendosi al metodo proposto da ROGERS per la ricerca dei parassiti malarici nel sangue, fu il primo ad introdurre nella ricerca del bacillo di Koch nell'espettorato, il metodo della goccia spessa (originariamente e più propriamente « dicker Ausstrich »), i cui accorgimenti tecnici essenziali sono:

1° invece di strisciare il materiale sul vetrino, ve lo si depona a mezzo di pipetta dopo omogeneizzazione a forma di grossa goccia che occupa tutta l'area del portaoggetti;

2° invece dell'acido solforico, come decolorante viene adoperata una soluzione idroalcolica di solfito di sodio, che scolora il preparato della grande quantità di fucsina trattenuta per il suo spessore, pur lasciando colorati in rosso i bacilli tubercolari.

Questo procedimento però non ebbe eccessiva fortuna essendo privo di praticità: infatti si ottengono con l'espettorato dei preparati così densi che la lettura ne riesce difficoltata. Recentissimamente due autori lituani, KOGANAS e NOKANAS, lo adottarono, e con buoni risultati, per ricercare i bacilli di K. nel succo gastrico degli adulti. Buoni risultati dovuti, a nostro modo di vedere, al fatto che il succo gastrico ha densità e viscosità di molto inferiori all'espettorato, ed al fatto che i succitati AA. lavorano su materiale centrifugato.

Anche le nostre ricerche hanno rapporti col metodo di ROGERS per la malaria; ma avendo osservato in ricerche preliminari eseguite colla tecnica di OSOL che questo non ci offriva risultati brillanti, perchè generalmente non diversi da quelli ottenuti colorando i comuni strisci colla tecnica di ZIEHL NIELSEN, pensammo di eliminare i difetti della suddetta tecnica di ROGERS e pervenimmo al metodo della « goccia ».

E dei risultati incoraggianti delle nostre prime esperienze demmo comunicazione con nota presentata il giorno 17 maggio 1939 alla seduta della Sezione Laziale per la lotta contro la tubercolosi.

TABELLA 1^a.

Confronto tra il metodo usuale dello striscio ed il metodo della goccia.

| Espettorati esaminati | REPERTO | | Espettorati esaminati | REPERTO | | Espettorati esaminati | REPERTO | |
|-----------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|
| | col metodo Ziehl-Nielsen | col metodo Goccia | | col metodo Ziehl-Nielsen | col metodo Goccia | | col metodo Ziehl-Nielsen | col metodo Goccia |
| 1 | — | + | 21 | — | + | 41 | — | + |
| 2 | + | +++ | 22 | — | + | 42 | — | + |
| 3 | ++ | +++ | 23 | — | + | 43 | — | + |
| 4 | + | + | 24 | — | ++ | 44 | — | + |
| 5 | — | — | 25 | — | + | 45 | — | — |
| 6 | — | + | 26 | — | — | 46 | — | — |
| 7 | — | — | 27 | — | — | 47 | — | — |
| 8 | — | + | 28 | — | + | 48 | — | + |
| 9 | — | ++ | 29 | — | + | 49 | — | — |
| 10 | — | ++ | 30 | — | — | 50 | — | — |
| 11 | ++ | +++ | 31 | — | + | 51 | — | + |
| 12 | — | + | 32 | — | + | 52 | — | + |
| 13 | — | + | 33 | — | — | 53 | — | — |
| 14 | — | — | 34 | — | — | 54 | — | — |
| 15 | — | — | 35 | — | + | 55 | — | + |
| 16 | — | — | 36 | — | — | 56 | — | — |
| 17 | — | — | 37 | — | — | 57 | — | — |
| 18 | — | + | 38 | — | — | 58 | — | — |
| 19 | — | + | 39 | — | — | 59 | — | — |
| 20 | — | + | 40 | — | — | | | |
| Totale . . . | | | | 59 | 3 | 32 | | |

Percentuale assoluta di positività col metodo dello Ziehl-Nielsen 5,08 %

Percentuale assoluta di positività col metodo della goccia omogeneizzata 54,23 %

Percentuale di vantaggio sullo Ziehl 49,15 %

Per circostanze intercorrenti non potemmo prima d'ora pubblicare le nostre ricerche cosicchè i due AA. lituani ci hanno preceduto, sebbene di precedenza non possa veramente parlarsi, dato che il nostro metodo differisce sia nel principio che nella tecnica.

Siamo partiti dall'osservazione che la ricerca microscopica diretta spesso è infruttuosa per la ragione che i bacilli sono dispersi in grandi quantità di materiale, di cui solo una piccola parte è posta sotto l'osservazione per mezzo del comune striscio, non solo, ma che esplorare coll'obbiettivo ad immersione tutta la superficie di un vetrino richiede un tempo notevolmente lungo, soprattutto se bisogna eseguire parecchi esami in serie. D'altra parte il fatto che in parecchi esami non si riesce a mettere in evidenza i BK pur dopo una

TABELLA 2^a.

Confronto e controllo con prove culturali ed inoculazione in animali sensibili.

| Numero di protocollo | REPERTO | | | Numero di protocollo | REPERTO | | |
|----------------------|---------------|--------|---------------------|----------------------|---------------|--------|---------------------|
| | Ziehl-Nielsen | Goccia | Biologico-culturale | | Ziehl-Nielsen | Goccia | Biologico-culturale |
| 3110 | — | — | — | 3122 | — | — | — |
| 3111 | — | — | — | 3123 | — | — | — |
| 3112 | — | — | — | 3124 | — | + | + |
| 3113 | — | — | — | 3125 | — | + | + |
| 3114 | — | + | + | 3126 | — | — | — |
| 3115 | — | + | + | 3127 | — | — | + |
| 3116 | — | + | + | 3128 | — | + | + |
| 3117 | — | + | + | 3129 | — | — | — |
| 3118 | — | — | + | 3130 | — | — | — |
| 3119 | — | — | + | 3131 | — | — | + |
| 3120 | — | — | + | 3132 | — | — | — |
| 3121 | — | + | + | | | | |
| Totale . . . | | | | 23 | 0 | 8 | 13 |

Percentuale di positività: Goccia 34,78%; Biologica-culturale 50,52%.

TABELLA 3^a.

| MATERIALI ESAMINATI | Numero | POSITIVITÀ | |
|----------------------------|--------|---------------|--------|
| | | Ziehl-Nielsen | Goccia |
| Espettorati | 59 | 3 | 32 |
| Succhi gastrici | 2 | 0 | 2 |
| Liquidi pleurici | 2 | 0 | 2 |
| Totale . . . | 63 | 3 | 36 |

Percentuale di positività: alla goccia 57,14%; dello Ziehl-Nielsen 4,76%.

osservazione accurata, mentre poi le prove biologiche e culturali sono positive, fa dedurre che i bacilli sono sì presenti, ma scarsissimi e difficilmente rintracciabili.

Cosicchè abbiamo pensato di sottoporre il materiale ad omogeneizzazioni e poi, invece di strisciarlo o di fare delle gocce spesse, di eseguire delle gocce molto piccole, riducendo così il campo a proporzioni assai inferiori pur aumentando le probabilità di visualizzare i BK data la precedente omogeneizzazione.

L'agitatore del Prof. MORELLI ci ha permesso di ottenerla in modo perfetto, abbandonando il comune metodo all'idrato di sodio ed adoperando della semplice soluzione fisiologica.

Apportammo queste modifiche ed accorgimenti nuovi perchè indispensabili per effettuare la ricerca sui vari prodotti patologici quali espettorato, pus, liquido pleurico, oltrechè sul succo gastrico, che era stato l'unico materiale esplorato col metodo della goccia spessa dagli autori succitati. I primi risultati ottenuti sono tanto confortanti da indurci a comunicare questo nuovo accorgimento tecnico, fiduciosi di poterlo presto avvalorare con una congrua casistica; fin ora abbiamo sperimentato su espettorati negativi o scarsamente positivi all'esame diretto con lo ZIEHL-NIELSEN; in parecchi dei primi con la nostra tecnica, abbiamo potuto dimostrare un evidente reperto bacillare con una percentuale di circa il 50 % e nei secondi il numero dei bacilli era aumentato nella proporzione di 3 : 1.

Questi risultati saranno facilmente comprensibili, quando si pensi che il laboratorio del nostro Istituto ha eseguito in poco più di un anno circa 800 prove colturali ed inoculazioni in cavie di espettorati negativi all'esame diretto, delle quali circa 600 furono positive. (Nel nostro Istituto si dà per negativo un espettorato dopo ripetuti ed accurati esami diretti e con arricchimento).

Fu appunto la constatazione di un rapporto ad indice basso fra negatività dell'esame diretto e positività della prova colturale ed inoculazione in cavie che ci indusse ad applicare sistematicamente il metodo della goccia; d'altra parte la tecnica di esecuzione è così semplice che quand'anche i risultati delle esperienze che continueremo, deludessero le nostre aspettative, varrà sempre la pena di eseguirla a complemento dell'esame diretto se non a supplemento delle ricerche più complesse, le quali senza dubbio, per un certo numero di casi, non possono essere omesse.

Descriveremo in primo luogo la tecnica di questo esame diretto con le nostre modificazioni per passare poi alla critica di ciascun tempo.

1° Con una pipetta da espettorato si preleva circa 1 cmc. di espettorato (bastano anche quantità molto più piccole) dalla parte più densa e lo si mette in una comune provetta;

2° si aggiunge soluzione fisiologica nella proporzione di 1 : 2, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 10, a seconda della consistenza del materiale;

3° si chiude accuratamente la provetta con tappo sterile di gomma o sughero;

4° si agita per 15' con l'agitatore di Morelli. Dopo di che si ottiene un liquido fluido e perfettamente omogeneo anche essendo partiti dal materiale più denso;

5° servendosi di una comune pipetta Pasteur si fa cadere una goccia del liquido ottenuto su di un vetrino portaoggetti;

6° si pone in termostato a 37° per 45-60';

7° si colora col metodo di Ziehl.

Il preparato macroscopicamente si presenta con forma ad anello del diametro tra i 4 e i 7 mm. venendo la parte centrale risparmiata dai liquidi coloranti. I bacilli esistenti si dispongono alla periferia, nella zona intermedia delimitata dai due cerchini dell'anello, e sono facilmente visibili al microscopio, data anche la facile orientazione di movimento da imprimere al vetrino per la totale esplorazione del preparato.

La omogeneizzazione del materiale ottenuta con i primi quattro tempi della tecnica descritta, è la base del metodo: la perfetta configurazione ad anello della goccia (addensamento degli elementi alla periferia e permanenza

nell'area centrale di un sottile velo di liquido evaporato), dipende infatti, come è risaputo, dalla sua tensione superficiale e questa a sua volta dipende dallo stato di diluizione del materiale. È necessario quindi, nell'aggiungere la soluzione fisiologica, variare le proporzioni a seconda lo stato fisico del materiale. Nell'esame di un liquido pleurico limpido, ad es. la omogeneizzazione può del tutto essere omessa, mentre trovandosi di fronte ad un liquido pleurico empiematico o ad espettorato muco-purulento, sarà bene attenersi alla proporzione di 1 : 5, 1 : 10.

Non disponendo, poi, di un agitatore Morelli, si può ottenere la omogeneizzazione sostituendo (tempo 2°) alla soluzione fisiologica, idrato di sodio 4 % ed agitando a mano la provetta, secondo la sua verticale, fino ad ottenere la diluizione cercata. Così agendo però è necessario non oltrepassare i 30' dal momento in cui si pone il materiale a contatto con l'idrato di sodio, fino al momento di porre il vetrino in stufa; e ciò per evitare il reperto di BK alterati nella loro struttura dall'azione chimica dell'idrato di sodio unita a quella meccanica dell'agitare. Infatti già dopo 15' i comuni germi non sono più visibili. (Il BK resiste all'azione dell'idrato di sodio a tale diluizione circa 60').

Come pure per essiccare il preparato invece del termostato, si può usufruire di una comune lampada elettrica da 50 W., coperta nella metà superiore (considerandola in posizione orizzontale) da un piccolo paralume emisferico che convogli il calore ed i raggi luminosi in basso, e posta a circa 15 cm. sul vetrino per un tempo medio di 30-45'.

La colorazione si esegue comunemente con lo Ziehl-Neelsen; spesso però, dato l'ammassamento del materiale alla periferia della goccia, come sopra abbiamo descritto, si ottengono delle colorazioni di contrasto troppo intense, cosicchè siamo stati indotti a sostituire il bleu di metilene con il verde di malachite opportunamente diluito (1 : 30). Poichè si intuisce come un fondo chiaro al microscopio, permette di individuare molto più facilmente gli elementi bacillari colorati in rosso che a volte possono ammassarsi in modo da simulare un precipitato di colore. Col metodo di Spengler, invece si ha una colorazione di contrasto troppo debole la quale nei preparati sottili non solo rende difficile la messa a fuoco, ma la visualizzazione stessa dei bacilli.

* * *

Questa la tecnica da noi sperimentata; essa è molto semplice ed affatto priva di esigenze speciali di alcun genere ed a nostro parere, che è basato sui risultati ottenuti, di importanza pratica non indifferente. Tale nostra convinzione è avvalorata dal fatto che essa ha di fronte all'esame diretto usuale molti vantaggi, tra i quali non ultimo che in notevole numero di casi evita la esecuzione della inoculazione in cavie e semina su terreni di coltura, apportando un notevole risparmio di tempo e di spesa.

Si pensi infatti che solo 10' al più 20', sono sufficienti per esplorare tutto l'intero campo microscopico, mentre in 30' non si riesce ad esaminare nemmeno la terza parte di un comune striscio. Si pensi alla tranquillità di avere esaminato l'intera goccia, nei confronti al dubbio che sempre rimane dopo avere esaminato tutto uno striscio (cosa quasi impossibile) per quanto l'esame sia condotto con metodo ed esattezza. Si pensi al fatto che su di ogni vetrino portaoggetti si possono far cadere anche 10 gocce numerandole progressivamente in modo analogo ai diversi campioni di espettorati, attuando così un rapido esame in serie di parecchi casi, con notevole economia di tempo e materiali. Quando però, ciò non si voglia fare si possono sempre eseguire vari

esami in serie dello stesso campione di materiale ; cosa del resto inutile data la perfetta omogeneizzazione e di conseguenza la eguale dispersione dei corpi bacillari nel liquido.

Si pensi, infine, alla grande quantità di prove biologiche e culturali risparmiate e si potrà facilmente convenire nella approvazione di questo nuovo accorgimento di tecnica, accordandogli piena fiducia.

RIASSUNTO

L'A. descrive il nuovo metodo della « goccia omogeneizzata » per la ricerca microscopica diretta dei bacilli di Koch; tecnica che sintetizza le varie manovre di arricchimento ed omogeneizzazione. I risultati delle prime esperienze dimostrano nei confronti col metodo dello striscio allo Ziehl-Nielsen, una positività maggiore del 49 %, così da permettere un notevole risparmio di prove colturali ed inoculazioni negli animali sensibili.

RÉSUMÉ

L'A. fait la description de la nouvelle méthode de la « goutte homogène » pour la recherche microscopique directe des bacilles de Koch : c'est une technique qui synthétise les différentes manœuvres d'enrichissement et de homogénéisation. Les résultats des premières expériences prouvent que, dans l'égard de la coloration Ziehl-Nielsen, on a une plus grande positivité de 49 %, qui permet un'épargne considérable d'épreuves culturelles et d'inoculations chez des animaux sensibles.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. beschreibt das neue Verfahren des « homogenisierten Tropfens » für die direkte mikroskopische Untersuchung des K. B.; eine Technik die die verschiedenen Anreicherungs- und Homogenisierungsmethoden zusammenfasst. Die Ergebnisse der ersten Erfahrungen zeigen, im Vergleich zum Ausstrichpräparat nach Ziehl-Nielsen, eine, um 49 % höhere Positivität und gestattet daher eine bedeutende Ersparnis von Kulturproben und Inokulationen in die empfindlichen Tiere.

SUMMARY

The author describes the new method of the « homogenized drop » for the direct research for the Koch bacillus a technique that synthesizes the various manœuvres of enrichment and homogenization. The results of the first experiments demonstrate, in comparison with the Ziehl-Nielsen strip method, a positivity of more than 49 %, which admits a noteworthy saving of cultural tests and inoculation of sensible animals.

BIBLIOGRAFIA

- BESTA B. — L'uso del microscopio a fluorescenza nella ricerca del bacillo di Koch. « Annali Istit. C. Forlanini », anno III, n. 11-12.
- DADDI G. — Il bacillo di Koch. Ediz. Cappelli, Bologna.
- KOGANAS-NAKANAS. — Recherche du bacille dans le contenu gastrique par la methode d'Armand-Delille, ameliorée par le procédé de la « goutte épaisse ». « Presse Med. », 1940, 20-21, p. 236-237.
- ID. — La ricerca del bacillo di Koch nel contenuto gastrico degli adulti. « Revue de Tbc », 1939, 5^e, T. 5, n. 3, 362.
- OSOL. — Tuberkelbazillenforschung im dicken Ausstrich « Deut. Med. Wochenschrift », 1927, 1002.



59609

