

ISTITUTO " CARLO FORLANINI ,,  
CLINICA FISIOLÓGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA  
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

---

M. MORELLINI e G. FOJANINI

L'INOCULAZIONE DEL BACILLO DI KOCH  
NELLA CAVIA  
PER VIA TRANSCRANICA SOTTODURALE

*Estratto da* ANNALI DELL'ISTITUTO « CARLO FORLANINI »

Anno IV, N. 7-8 Pag. 507-520



*Misc B*  
*58*  

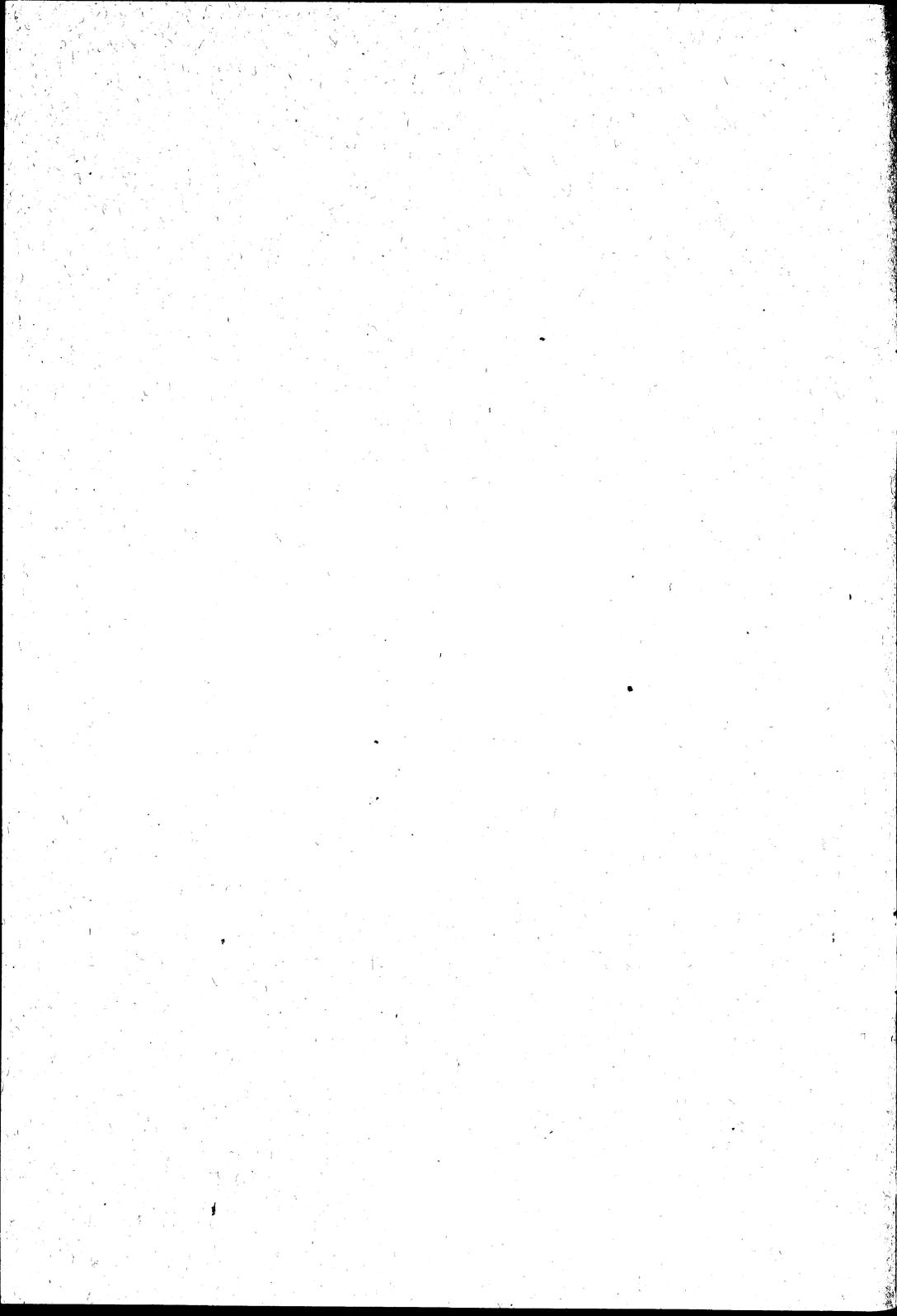
---

*45*

ROMA  
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA

Via Emilio Morosini, 17

1940-XVIII





## L'INOCULAZIONE DEL BACILLO DI KOCH NELLA CAVIA PER VIA TRANSCRANICA SOTTODURALE

MOROELLO MORELLINI e GIUSEPPE FOJANINI

Le vie di inoculazione da seguire negli animali da esperimento, per ottenere un'infezione tubercolare a scopo sperimentale o diagnostico sono svariate; le più comuni di esse sono, a seconda dei casi, la via endovenosa, la via sottocutanea, quella intradermica, quella endoperitoneale; tuttavia altre vie sono state sperimentate dai ricercatori allo scopo di accelerare l'infezione e la diagnosi; per questo ultimo scopo accanto a queste diverse modalità di infezione (intraganglionare, oculare, digestiva, rettale, vescicale, respiratoria, pleurica, intramammaria, intraarticolare, testicolare, ecc.) sono stati presi in considerazione anche accorgimenti tecnici diversi aventi il compito di anticipare la diagnosi nell'animale sensibile (biopsia dei gangli vicini al punto di iniezione, schiacciamento meccanico dei gangli stessi, prova tubercolinica, trattamento con estratto acetonicò di bK., trattamento tubercolinico, con sangue citratato di coniglio, agar, uovo coagulato, carta da filtro, ecc.). Non ultimi anche il cervello e le meningi sono stati oggetto di speciali ricerche da parte dei batteriologi e laboratoristi; già nel trattato di CALMETTE vengono riferite ricerche che dimostrano come all'introduzione di bacilli di Koch sotto la dura, segua, nella cavia, una meningite tipica che conduce a morte l'animale in due o tre settimane.

L'introduzione di bacilli di Koch nello spazio subdurale può essere effettuata: mediante la puntura lombare, tecnica applicabile nella cavia con una certa difficoltà; per via transorbitaria, introducendo un ago lungo la parete mediale della cavità orbitaria sino a sorpassare appena il foro orbitario per deporre il materiale infettante internamente alla dura; per via sottooccipitale (MARTIN), introducendo l'ago attraverso l'articolazione atlanto-occipitale dell'animale tenuto a testa iperflessa (l'ago va introdotto lentamente per non ferire i centri nervosi e si deve anche avere l'avvertenza di lasciare defluire qualche goccia di liquor prima di procedere alla iniezione); per via transcranica, attraversando la teca con modalità diverse: CALMETTE incide la pelle su una linea trasversale passante per la commessura posteriore degli occhi; pratica poi nell'osso, mediante un punteruolo, un piccolo foro, che deve essere un po' a destra o a sinistra della linea mediana per non raggiungere il seno longitudinale superiore, ed attraverso ad esso introduce l'estremità dell'ago che spinge indietro per quattro-cinque mm. iniettando. poi il materiale.

DE ANTONI incide la cute di lato alla linea mediana verso l'occipite per una lunghezza di quasi 2 cm., scopre la calotta e mediante un trapano a piccola corona incide profondamente l'osso. Colla punta del bisturi fa saltare il pic-

colo disco osseo, attraversa quindi con l'ago dall'avanti all'indietro la dura meninge cercando di mantenere l'estremità dell'ago subito al di sotto di essa senza affondare nella massa cerebrale; procede quindi alla iniezione. Una tecnica simile seguirono ZAMBONI, la JOUSSET ed altri.

La quantità di materiale che si può introdurre sotto la dura è scarsa: poche gocce per alcuni, per altri un decimo di cc., per altri ancora da 2 a 3/10 di cc.

In genere il decorso post-operatorio è ottimo; l'intervento, se condotto con buona tecnica, non è molto traumatizzante, la cavia si rimette in poche ore dallo shock e nei primi giorni dopo l'intervento si comporta come un animale normale. Ben presto però insorgono fenomeni talmente tipici e costanti che ci fanno subito fare diagnosi di malattia: l'animale dimagra benché continui a nutrirsi, poi a poco a poco si abbatte, si ritira in un angolo della gabbia; a 15-20 giorni dall'inoculazione, talvolta oltre, compaiono chiari segni di irritazione meningea; dapprima paralisi di un arto, prevalentemente il posteriore; l'animale cammina trascinandosi dietro l'arto paralizzato; poi cade su una coscia, più tardi su un fianco; a questo punto non è più capace di muoversi, presenta frequenti tremori e finché permane la motilità dell'arto anteriore tenta sovente di rialzarsi senza però mai riuscire; paralizzato anche questo l'animale è obbligato a giacere sul fianco. Se si cerca di rimetterlo in piedi ricade subito dal lato paralizzato, per di più se si appoggia la cavia sul lato sano questa riesce a rizzarsi per poi ricadere subito sul lato malato. Compare poi paralisi anche dall'altro lato, incontinenza degli sfinteri, paralisi pupillare alla luce, quindi la morte. Il periodo della paralisi ha durata varia, alcune volte solo 24 ore e anche meno, altre volte sino a dieci giorni. Questa sintomatologia è talmente tipica che permette subito la diagnosi ed è inoltre precoce; come ho già detto compare in genere entro la seconda settimana con variazioni di lieve entità a seconda della quantità dei bacilli inoculati o più sicuramente della virulenza di essi.

Il controllo autoptico mostra che la dura è ipertesa, congesta ed in genere aderente alle leptomeningi nel punto dell'intervento operatorio; la pia meninge è sempre congesta, ricoperta da un tenue strato di essudato, spesso ispessita o rivestita da placche caseose, talvolta mostra alla superficie numerosi finissimi tubercoli; l'encefalo è tumido e succulento, esiste spesso un netto stato di idrocefalo. Alla base appare, nei casi in cui il materiale vi venne depositato, un tenue essudato gelatinoso; nei casi in cui l'infezione fu praticata attraverso la volta tale essudato non è sempre presente.

Asportando una certa quantità di essudato dalle pie meningi con un'ansa si possono dimostrare bacilli di Koch generalmente in grande numero ed a piccoli ammassi. L'esame istologico di frammenti encefalo-meningei, che in questi casi è sempre bene praticare, mostra il quadro tipico della meningite tubercolare: infiltrazione dell'aracnoide e della pia da parte di elementi linfoistocitari, comparsa anche di elementi della serie granulocitica, formazione di tubercoli prevalentemente linfo-epitelioidi con zone di necrosi, assenza di cellule giganti, fatto questo ultimo noto anche in patologia umana.

Da tutte queste osservazioni e da questi dati risulta chiaramente che la meninge reagisce con particolare prontezza, evidenza di sintomi e naturalmente specificità al bacillo di Koch che venga portato in contatto di essa.

In possesso di questi risultati sperimentali era logico pensare che il metodo fosse degno di essere applicato alla pratica corrente nella prova biologica. Però, a quanto mi risulta, l'applicazione alla pratica fu effettuata solo da DE ANTONI che prese lo spunto da ricerche consimili del FELDMANN. Questa reticenza nell'applicare un metodo che teoricamente appare ottimo può es-

sere spiegata da queste due considerazioni: in primo luogo sotto la dura non si può introdurre il materiale in grande quantità (3/10 di cc. al massimo) ed è quindi possibile che in così piccola dose non siano contenuti bacilli di Koch; in secondo luogo viene facile pensare che anche trattando il materiale patologico con particolari accorgimenti si sia ben lungi dall'impedire l'insorgenza di meningiti banali che portino a morte l'animale prima che si possa instaurare il quadro della meningite tubercolare. Secondo gli AA. sopracitati avrebbe una certa importanza solo la seconda evenienza. FELDMANN, dopo aver osservato che l'inoculazione intracerebrale di culture di bacilli tubercolari sospesi in soluzione fisiologica uccide la cavia in un tempo medio di tre settimane, e che con questo sistema le cavie erano passibili di infettarsi anche con ceppi aviarii, applicò, in collaborazione con MAGATH, il metodo per la prova diagnostica ed esegui 211 esami su urine, sputi, essudati pleurici, materiale osseo ed articolare. A detta degli AA. i risultati furono soddisfacenti; il metodo nei confronti di quello endoperitoneale e sottocutaneo si dimostrò molto più rapido, però di minor sensibilità degli altri due (negatività del primo in confronto a positività degli altri due). Questa minor sensibilità sarebbe però solo apparente perchè nel computo dei casi negativi furono dagli AA. compresi anche quelli nei quali le cavie inoculate per via intracerebrale vennero a morte o subito o nei primissimi giorni dopo l'inoculazione, o per il trauma stesso o per infezione banale.

In altri casi rari le cavie inoculate dagli AA. sopravvissero senza ammalarsi mentre si ammalarono gli animali di controllo inoculati endoperitoneo o sotto-cute: gli AA. spiegarono questa differenza col fatto che il materiale in esame fosse poverissimo di bacilli tanto da non contenerne in quella esigua quantità (cc. 0,25) che viene infettata nel cervello e contenerne invece nella quantità, otto volte superiore, che è possibile iniettare per altre vie.

Risultano quindi i difetti del metodo: possibilità di infezione banale e scarsità del materiale inoculabile; la seconda evenienza potrebbe essere evitata iniettando sotto la cute dello stesso animale lo stesso materiale in quantità superiore.

Il DE ANTONI provò dapprima il metodo intracerebrale ma lo abbandonò ben presto per i risultati poco incoraggianti, data l'altissima mortalità immediata per lesione meccanica e tardiva per infezione da germi banali. Ricorse perciò al metodo sottodurale, previo trattamento del materiale in esame con acido solforico secondo la tecnica di LANG per la semina in terreni di HOHN e diluendo il materiale solo quel tanto che lo rendesse sufficientemente fluido. Praticò in tutto una ventina di prove su liquor, urine, escreti, pus.

Ebbe concordanza di risultati nelle tre prove: sottodurale, endoperitoneale, sottocutanea con un tempo medio per la prova sottodurale di circa una ventina di giorni. In due soli casi la prova sottodurale non potè venire sfruttata per la morte degli animali per meningite banale. L'A. rimane del parere che il metodo di inoculazione sottodurale sia consigliabile parallelamente ai comuni metodi per la rapidità dei risultati e per la sensibilità, pur tenendo presente la possibilità di insuccesso per morte degli animali in seguito a meningite banale. Sarebbe inoltre consigliabile per il vantaggio di poter servire alla dimostrazione della tubercolosi aviaria se quanto è detto dal FELDMANN, non però controllato dal DE ANTONI, fosse esatto; sarebbe questo un enorme vantaggio perchè è noto che i bacilli della tubercolosi aviaria sono poco patogeni per la cavia se inoculati per le vie usuali, e noi sappiamo che l'infezione da aviario è nell'uomo piuttosto rara, ma possibile.

Il procedimento tecnico dell'inoculazione intradurale del bacillo di Koch è stato preso in considerazione anche nel nostro Istituto allo scopo di controllare quali applicazioni ne sarebbero potute derivare per la pratica corrente.

per impraticarci del metodo ed estenderlo, in prosieguo di tempo, alla pratica corrente, per esaminare inoltre se esistesse realmente una particolare sensibilità delle meningi della cavia verso l'infezione tubercolare da bacillo aviario come aveva sostenuto il FELDMANN per il cervello. Per di più un'altra questione volevano studiare: BOQUET in un lavoro abbastanza recente, considerando che, pure essendo indubitata la particolare recettività del coniglio per i bacilli bovini, la resistenza che l'animale oppone al bacillo umano non è nè assoluta nè costante, ricorse alla inoculazione sottodurale per vedere di rendere più sensibile la diagnosi differenziale fra bacillo umano e bovino. Difatti mentre con l'inoculazione di mgr. 0,01 e 0,001 di bacilli bovini determinò regolarmente una paralisi progressiva che insorse nel corso della terza settimana e portò alla morte qualche giorno dopo, nella grande maggioranza dei casi l'inoculazione sottodurale di bacilli umani alla stessa dose non produsse alcun disturbo. Certi ceppi umani furono capaci di provocare una meningite mortale, ma in generale il periodo di inoculazione e l'evoluzione della malattia furono molto più lunghi che nell'infezione da bacillo bovino. E ancor più recentemente B. BÉQUIGNON sperimentando sul topolino bianco inoculato per via intracerebrale con dosi di 1/1000 mgr. aveva ottenuto la morte dei topolini in venti, venticinque giorni usando stipiti bovini, in 45 giorni con stipiti umani e in 74 giorni con stipiti aviari.

Noi volevamo quindi vedere se era possibile mettere in evidenza una più spiccata sensibilità delle meningi della cavia verso il bacillo umano perchè è noto che servendosi dei comuni metodi di inoculazione non è agevole fare diagnosi differenziale tra infezione da bacillo umano e da bovino nella cavia, benchè si dica che quest'animale ha una sensibilità leggermente maggiore per il bacillo umano.

*Tecnica delle ricerche.* — Per provocare l'infezione ci servivamo di 4 ceppi comuni del nostro laboratorio: uno umano l'H. 522, due bovini, il bovino VALLÉE ed il B. 12, uno aviario il 3633. Usammo poi per l'ultima esperienza un altro ceppo umano, l'umano 25 isolato recentemente nel nostro laboratorio dal contenuto gastrico di un bambino affetto da epitubercolosi e classificato di media virulenza. Difatti inoculato intracete nella cavia alla dose di 1/1.000.000 di mgr. dava, dopo tre mesi, lesioni ghiandolari caseose e caseoso nodulari nella milza e nel polmone.

Prelevammo i germi umani e aviari da colture di 30 giorni cresciute su terreno SAUTON, i bovini da coltura di 30 giorni su brodo glicerinato. Il velo culturale veniva pesato e la sospensione il più possibile omogenea praticata volta per volta secondo le note norme. Preparammo per la prima esperienza tre diluizioni differenti, l'una contenente 1 mgr. di bacilli per cc., l'altra 1/10 di mgr. per cc., la terza 1/100 di mgr. per cc. Siccome sotto la dura iniettavamo 1/10 di cc. della sospensione, venivamo ad infettare l'animale con 1/10 di mgr. usando la prima diluizione, con 1/100 di mgr. usando la seconda e con 1/1000 di mgr. usando la terza. Per le successive esperienze volendo noi infettare l'animale con 1/100 di mgr., preparavamo una sospensione contenente 1/10 di mgr. di bacilli per cc.; di essa 1/10 di cc. veniva iniettato sottodura.

Come vie di accesso seguimmo quella transcranica. Non sembrandoci però sufficiente praticare nella teca un foro con un punteruolo per passarvi l'ago, scegliemmo il metodo della trapanazione, togliendo il disco di osso molto in avanti, come già BERTRAND, BABLET e BLOCH per il coniglio, per avere così la possibilità di insinuare l'ago sotto la dura per un bel tratto; appunto per facilitare questa manovra demmo all'ago una piccola curvatura a concavità inferiore perchè meglio si adattasse alla convessità dell'encefalo. Lo scopo

unico di queste manovre era quello di evitare o ridurre al minimo il reflusso del materiale inoculato dal foro di ingresso dell'ago.

Ecco dettagliatamente come procedevamo: fissata la cavia prona su uno dei soliti tavolini si procedeva a depilazione della regione periorbitaria, frontale e parietotemporale sinistra. Iodizzata la cute si praticava, mezzo cm. sopra al margine orbitario superiore di sinistra, una incisione di un cm. di lunghezza, il cui centro corrispondeva alla verticale tirata dalla rima palpebrale posteriore. Giunti sul piano osseo raschiavamo il periostio, indi con un trapano del diametro di 4 mm. praticavamo un foro nella teca; colla punta del bisturi sollevavamo l'opercolo osseo, compariva allora la dura madre al di sotto della quale, con una comune siringa da tubercolina, veniva iniettato 1/10 di cc. di sospensione bacillare. Tolto l'ago fuoriusciva scarso liquor misto a sangue; non possiamo però escludere la fuoriuscita di piccola parte del materiale iniettato. Asciugavamo accuratamente il campo e procedevamo quindi alla chiusura. Mentre nelle prime esperienze coprivamo il foro di trapanazione col dischetto osseo ricavato, nell'ultima esperienza non ci preoccupammo più di chiudere, il che non turbò assolutamente il decorso postoperatorio. La cute veniva avvicinata con grappette e di nuovo iodizzata. Su un totale di 119 interventi perdemmo 6 animali durante il tempo operatorio; queste cavie furono subito sostituite sicchè questa mortalità non figura nelle tabelle. La mortalità nel periodo successivo all'intervento risulterà per ogni esperienza dalle tabelle; la parte di essa da attribuirsi al trauma operatorio è praticamente nulla.

In seconda giornata procedevamo ad iodizzare la ferita, in quinta giornata le grappette erano tolte e la ferita di nuovo iodizzata. Osservavamo quotidianamente gli animali, li pesavamo ogni 5 giorni e segnavamo ogni sintomo che potesse essere riferito ad irritazione meningea. Venuto a morte l'animale procedevamo all'autopsia che per i visceri toracici ed addominali si svolgeva secondo le comuni regole; il cervello veniva messo in luce togliendo un ampio disco di sostanza ossea che partendo dalla protuberanza occipitale giungeva in avanti sino al margine superiore delle orbite seguendo il contorno della volta cranica. Un frammento di cervello con le meningi veniva fissato in alcool e le sezioni colorate con ematossilina eosina e Van Gieson avendo la massima cura che in esse fossero presenti sia il cervello che le meningi. Anche dal fegato, dalla milza, dal rene e dal polmone venivano prelevati frammenti per l'esame istologico.

Di ogni caso avevamo quindi un accurato reperto istologico che ci serviva come base per la diagnosi.

#### RISULTATI.

La prima esperienza (vedi tabella I) ci servì d'orientamento generale per quel che riguarda la tecnica del procedimento operatorio, la resistenza degli animali alla inoculazione, il decorso postoperatorio. Volevamo inoltre vedere se i nostri ceppi avessero conservata la loro virulenza e fossero usabili per le esperienze definitive, infine determinare quale fosse la dose più opportuna.

Ci servimmo perciò di animali tenuti per un mese nelle ordinarie condizioni di stabulazione e di alimentazione, tutti in buone condizioni, del peso oscillante tra 300 e 400 gr. Dividemmo gli animali in sei lotti dei quali tre dovevano essere inoculati con dosi differenti di bacilli umani (H. 522) e 3 di bacilli bovini (VALLÉE). Ogni lotto era diviso in tre gruppi dei quali il primo ricevette 1/10 di mgr. di bacilli, il secondo 1/100 di mgr., il terzo

1/1000 di mgr. sotto la dura. L'operazione fu benissimo sopportata e durante essa perdemmo due soli animali che furono subito rimpiazzati nel lotto. Esaminando ora la tabella vediamo come sia scarsa anche la mortalità post-operatoria: infatti su 24 animali ne perdemmo solo due, uno per broncopolmonite ed uno per emorragia sottodurale; i rimanenti 22 vennero a morte in un periodo che va dai 17 ai 59 giorni e tutti per meningite tubercolare. La mortalità maggiore si ebbe entro un periodo di 17-25 giorni dalla inoculazione. Prima della morte notammo sempre per un periodo di 1-3 giorni, la classica e progressiva sintomatologia di flogosi meningea.

TABELLA N. I.

Num.	CEPPO	DOSE e via di inoculazione	DATA della morte	OSSERVAZIONI
1	H 522	1/10 mgr. sottodura	23° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	18° »	id.
3	id.	id.	18° »	id.
4	id.	id.	23° »	id.
5	id.	1/100 mgr. sottodura	48° giorno	meningite tubercolare
6	id.	id.	18° »	id.
7	id.	id.	2° »	emorragia sottodurale
8	id.	id.	23° »	meningite tubercolare
9	id.	1/1000 mgr. sottodura	23° giorno	meningite tubercolare
10	id.	id.	22° »	id.
11	id.	id.	22° »	id.
12	id.	id.	22° »	id.
1	Bovino Vallée	1/10 mgr. sottodura	20° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	20° »	id.
3	id.	id.	17° »	id.
4	id.	id.	59° »	id.
5	id.	1/100 mgr. sottodura	38° giorno	meningite tubercolare
6	id.	id.	2° »	broncopolmonite
7	id.	id.	24° »	meningite tubercolare
8	id.	id.	24° »	id.
9	id.	1/1000 mgr. sottodura	24° giorno	meningite tubercolare
10	id.	id.	22° »	id.
11	id.	id.	29° »	id.
12	id.	id.	29° »	id.

*Epoca media di mortalità:*

H 522, 1/10 mgr., giorni 20,5.  
 » 1/100 mgr., giorni 20,3.  
 » 1/1000 mgr., giorni 22.

B. 12, 1/10 mgr., giorni 25.  
 » 1/100 mgr., giorni 20.  
 » 1/1000 mgr., giorni 25.

Questa prima esperienza ci aveva quindi dimostrato che la tecnica era corretta, l'intervento operatorio benissimo sopportato, che alla inoculazione coi nostri ceppi seguiva in un periodo di tempo relativamente breve l'insorgere di una tipica meningite tubercolare col relativo corteo sintomatico e con reperto istologico positivo. Non potemmo invece ricavare indicazioni utili sulla dose da usare perchè con tutte le diluizioni ottenemmo pressapoco i medesimi risultati. Stabilimmo quindi di servirci, per le esperienze successive, della dose intermedia di 1/100 di mgr.

*Seconda esperienza* (v. tabella II). — Inoculammo 45 animali di taglia piuttosto piccola e del peso tra 100 e 200 gr. Dividemmo le cavie in tre lotti al primo dei quali fu inoculato sotto la dura e con la consueta tecnica 1/100 di mgr. di bacilli umani (H. 522), al secondo 1/100 di mgr. di bacilli bovini (VALLÉE), al terzo 1/100 di mgr. di bacilli aviari (3633). Questa esperienza non ebbe un esito brillante; già durante l'operazione perdemmo due animali ed altri due li perdemmo entro due ore dall'intervento; essi furono però subito sostituiti. Nei giorni successivi, a varia distanza di tempo dall'intervento, un numero considerevole di animali venne a morte, cosicchè su 15 animali infettati col ceppo umano solo 8 presentarono meningite; gli altri morirono per cause varie. Nel lotto delle cavie infettate col ceppo bovino 8 morirono di meningite e gli altri di malattie varie; nel lotto infettato col ceppo aviario si ebbero due meningiti e 7 morti per cause varie, gli altri 6 animali erano ancora in vita dopo 3 mesi, sani e notevolmente ingrassati. Furono sacrificati e l'esame istologico non mise in evidenza alterazioni nè meninge nè degli altri organi.

Non sappiamo a che cosa attribuire l'insuccesso della esperienza; crediamo però di dover attribuire grande importanza al fatto che gli animali erano di taglia troppo piccola e un certo valore a una piccola epidemia di polmonite. Una sola nozione utile possiamo ricavare da questa esperienza e cioè che le cavie non dimostrarono una particolare sensibilità delle meningi verso il bacillo aviario, vorremmo dire non ne dimostrarono affatto.

*Terza esperienza* (V. tabella III). — Ci sembrava che dalla prima esperienza risultasse una mortalità leggermente più precoce negli animali trattati con bacilli umani in confronto con quelli trattati col ceppo bovino. Avevamo però usato due ceppi di minima virulenza. Volevamo ora vedere se usando un ceppo bovino molto virulento (B. 12 che inoculato intracute nella cavia alla dose mg. 1/10000 provoca dopo 2 mesi lesioni caseose della milza, del fegato e del polmone), in parallelo con uno umano debole (H. 522 che inoculato nella cavia alla dose di mg. 1/10000 provoca dopo due mesi una tubercolosi localizzata ai gangli linfatici vicini), fosse possibile ricavare qualche elemento utile per una diagnosi differenziale, inoltre volevamo controllare di nuovo gli effetti dell'infezione con bacilli aviari; ci servimmo perciò di 30 cavie tutte del peso superiore ai 500 gr. che dividemmo in tre lotti; nel primo inoculammo sotto la dura 1/100 di mgr. di bacilli umani (H. 522), nel secondo 1/100 di mgr. di bacilli bovini (B. 12), nel terzo 1/100 di mgr. di bacilli aviari (ceppo 3633 che inoculato sul pollo per via endovenosa nella dose di mgr. 1/100 provoca dopo 50 giorni una evidente tubercolosi del fegato e della milza). La mortalità durante l'intervento fu nulla; gli animali poche ore dopo l'inoculazione si erano completamente ripresi.

I risultati di questa esperienza furono soddisfacenti. Nel primo lotto 6 animali morirono di meningite tubercolare nel periodo di 30-40 giorni, gli altri precocemente per malattie varie. L'esame istologico mostrò nei primi,

TABELLA N. 2.

NUM.	CEPPO	DOSE e via di inoculazione	DATA della morte	OSSERVAZIONI
1	H 522	1/100 mgr. sottodura	7 <sup>o</sup> giorno	polmonite
2	id.	id.	30 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
3	id.	id.	21 <sup>o</sup> »	id.
4	id.	id.	39 <sup>o</sup> »	id.
5	id.	id.	4 <sup>o</sup> »	polmonite
6	id.	id.	6 <sup>o</sup> »	empiema
7	id.	id.	61 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
8	id.	id.	5 <sup>o</sup> »	polmonite
9	id.	id.	5 <sup>o</sup> »	id.
10	id.	id.	69 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
11	id.	id.	41 <sup>o</sup> »	id.
12	id.	id.	30 <sup>o</sup> »	id.
13	id.	id.	8 <sup>o</sup> »	id.
14	id.	id.	39 <sup>o</sup> »	id.
15	id.	id.	4 <sup>o</sup> »	polmonite
1	Bovino Vallée	1/100 mgr. sottodura	2 <sup>o</sup> giorno	polmonite
2	id.	id.	6 <sup>o</sup> »	id.
3	id.	id.	28 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
4	id.	id.	28 <sup>o</sup> »	id.
5	id.	id.	2 <sup>o</sup> »	emorragia sottodurale
6	id.	id.	21 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
7	id.	id.	38 <sup>o</sup> »	id.
8	id.	id.	3 <sup>o</sup> »	emorragia sottodurale
9	id.	id.	5 <sup>o</sup> »	polmonite
10	id.	id.	42 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
11	id.	id.	29 <sup>o</sup> »	id.
12	id.	id.	67 <sup>o</sup> »	id.
13	id.	id.	12 <sup>o</sup> »	polmonite
14	id.	id.	30 <sup>o</sup> »	meningite tubercolare
15	id.	id.	2 <sup>o</sup> »	polmonite
1	Aviario 3633	1/100 mgr. sottodura	26 <sup>o</sup> giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	5 <sup>o</sup> »	polmonite
3	id.	id.	vivo dopo 3 m.	—
4	id.	id.	9 <sup>o</sup> giorno	polmonite
5	id.	id.	5 <sup>o</sup> »	emorragia sottodurale
6	id.	id.	2 <sup>o</sup> »	id.
7	id.	id.	vivo dopo 3 m.	—
8	id.	id.	52 <sup>o</sup> giorno	meningite tubercolare
9	id.	id.	6 <sup>o</sup> »	polmonite
10	id.	id.	4 <sup>o</sup> »	id.
11	id.	id.	vivo dopo 3 m.	—
12	id.	id.	id.	—
13	id.	id.	2 <sup>o</sup> giorno	emorragia sottodurale
14	id.	id.	vivo dopo 3 m.	—
15	id.	id.	id.	—

tipici quadri dalla malattia, negli altri scarso essudato emorragico e linfococitario con comparsa, negli animali morti dopo 2 giorni, di scarsa infiltrazione linfocitocitaria senza ispessimento della meninge, e senza caratteri tali di specificità da permettere una diagnosi di flogosi tubercolare.

Nel gruppo degli animali trattati con bacillo bovino il risultato fu particolarmente brillante; tutti gli animali morirono entro la terza settimana dopo aver presentato per un periodo variabile da uno a tre giorni i tipici sintomi di meningite e mostrando al controllo istologico il quadro classico della flogosi tubercolare.

I risultati del terzo gruppo, quello trattato col bacillo aviario, non fecero che confermare il dubbio che già avevamo manifestato in occasione della seconda esperienza. Tre soli animali su 10 morirono di meningite tubercolare, gli altri erano ancor vivi dopo tre mesi, in ottime condizioni, si erano notevolmente ingrassati ed all'esame autoptico ed istologico non presentarono segni di flogosi tubercolare meningea.

Confrontando l'epoca di mortalità degli animali trattati col bacillo umano e quelli infettati col bovino, si nota una mortalità nettamente più precoce in questi ultimi. Data l'enorme differenza di virulenza tra i due ceppi crediamo che a ciò e non ad una maggiore sensibilità delle meningi verso il bovino debba attribuirsi il fenomeno osservato. Decidemmo pertanto di procedere ad un'altra esperienza usando il solito ceppo bovino ed un ceppo umano di pari virulenza. Purtroppo non avevamo sottomano un ceppo umano molto virulento e dovemmo adoperare il ceppo umano H. 25 di virulenza media.

*Quarta esperienza* (v. tabella IV). — Furono inoculate 20 grosse cavie del peso superiore a 500 gr., 10 con 1/100 di mgr. di H. 25, 10 con 1/100 di mgr. di B. 12. Anche questa volta i risultati furono chiarissimi; nessun decesso durante l'intervento, decorso postoperatorio ottimo, morte di tutti gli animali entro la terza settimana, per meningite. Mortalità più precoce negli animali trattati col bovino in confronto di quelli trattati con l'umano, fatto che crediamo di dover attribuire a differenze di virulenza di germe e non di sensibilità di organo. Confrontando i dati riferentisi ai ceppi umani delle esperienze III e IV (tabelle III-IV) si nota una mortalità più precoce negli animali trattati con l'umano 25; anche questo dimostra l'importanza della virulenza del germe nel determinismo di una più rapida flogosi meningea.

#### CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI.

Con bacilli di Koch umani e bovini abbiamo determinato la meningite tubercolare nella cavia per via transcranica introducendo il materiale sotto la dura attraverso ad una breccia ossea frontoparietale sinistra. L'intervento operatorio è facile e ben tollerato; raccomandiamo però l'uso di animali di grossa taglia e raccomandiamo inoltre di depositare il materiale sotto la dura molto addietro servendosi di un ago curvo. La cavia muore entro la terza settimana se si usano ceppi assai virulenti, dalla terza alla quarta settimana usando ceppi di virulenza media, più tardi usando ceppi scarsamente virulenti; prima della morte presenta per un periodo variabile da uno a tre giorni in media, una netta sintomatologia paretico-spastica. L'esame istologico rivela in questi animali il tipico quadro della meningite tubercolare; questo esame deve essere praticato, perchè non sempre si possono rilevare lesioni macroscopiche evidenti anche se l'animale presentò la tipica sintomatologia. In pra-

tica per abbreviare il tempo dell'osservazione può essere inutile attendere la morte dell'animale, basta sacrificarlo appena si sia manifestata con una certa evidenza la sintomatologia e procedere subito all'esame istologico che in due o tre giorni con tecnica rapida può dare il responso.

TABELLA N. 3.

Num.	C È P P O	D O S E e via di inoculazione	D A T A della morte	O S S E R V A Z I O N I
1	H 522	1/100 mgr. sottodura	31° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	34° »	id.
3	id.	id.	30° »	id.
4	id.	id.	37° »	id.
5	id.	id.	40° »	id.
6	id.	id.	6° »	polmonite
7	id.	id.	11° »	id.
8	id.	id.	32° »	meningite tubercolare
9	id.	id.	11° »	polmonite
10	id.	id.	11° »	id.
1	B 12	1/100 mgr. sottodura	16° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	id.	id.
3	id.	id.	id.	id.
4	id.	id.	15° giorno	id.
5	id.	id.	16° »	id.
6	id.	id.	30° »	id.
7	id.	id.	19° »	id.
8	id.	id.	16° »	id.
9	id.	id.	17° »	id.
10	id.	id.	15° »	id.
1	Aviario 3633	1/100 mgr. sottodura	23° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	26° »	id.
3	id.	id.	28° »	id.
4	id.	id.	vivo dopo 3 m.	—
5	id.	id.	id.	—
6	id.	id.	id.	—
7	id.	id.	id.	—
8	id.	id.	id.	—
9	id.	id.	id.	—
10	id.	id.	id.	—

*Epoca media di mortalità*: H. 522, giorni 33; B. 12, giorni 17,6.

Ha notevole importanza nel determinare l'epoca della morte la virulenza del ceppo adoperato, non ne ha invece grande la dose adoperata almeno entro i limiti di mgr. 0,1, 0,001.

Non esiste sensibilità maggiore della meninge verso il bacillo umano o bovino; le eventuali differenze nell'epoca di comparsa dei sintomi e della morte vanno riferite a differenza di virulenza dei ceppi usati.

TABELLA N. 4.

Num.	CEPPO	DOSE e via di inoculazione	DATA della morte	OSSERVAZIONI
1	H. 25	1/100 mgr. sottodura	19° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	21° »	id.
3	id.	id.	18° »	id.
4	id.	id.	18° »	id.
5	id.	id.	21° »	id.
6	id.	id.	19° »	id.
7	id.	id.	14° »	id.
8	id.	id.	18° »	id.
9	id.	id.	16° »	id.
10	id.	id.	23° »	id.
1	B. 12	1/100 mgr. sottodura	16° giorno	meningite tubercolare
2	id.	id.	17° »	id.
3	id.	id.	16° »	id.
4	id.	id.	18° »	id.
5	id.	id.	18° »	id.
6	id.	id.	14° »	id.
7	id.	id.	15° »	id.
8	id.	id.	18° »	id.
9	id.	id.	16° »	id.
10	id.	id.	16° »	id.

*Epoca media di mortalità*; H. 25, giorni 18,7; B. 12, giorni 16,4.

Con l'uso di bacilli aviari anche virulenti si ottiene una percentuale talmente bassa di meningiti specifiche che non è possibile parlare di sensibilità delle meningi verso questo germe (vedi FELDMANN).

Il dato più interessante delle nostre ricerche consiste, a nostro parere, nell'offrire una prova dell'inesistenza di una maggior sensibilità della meninge delle cavie verso il bacillo umano o bovino e, mettendo in evidenza la grande importanza del fattore virulenza di ceppo, nel chiarire i risultati ottenuti con svariate esperienze su conigli e topolini dagli AA.

È innegabile che, prese separatamente, anche alcune nostre esperienze ci avrebbero portato a concludere per una precocità di morte nei soggetti

trattati con stipiti umani (esperienza I) laddove, la ripetizione degli esperimenti usando stipiti più virulenti bovini (B. 12) invece del ceppo VALLÉE (attenuato) precedentemente usato, hanno permesso di constatare una mortalità pressochè analoga con quella degli stipiti umani di confronto (vedi esperienza 4). Il metodo dell'inoculazione sottodurale si presta dunque molto bene, come già era stato messo in evidenza anche da SMITHBURN, ed è, per dirlo con l'A. americano, un metodo eccellente per la determinazione biologica della virulenza del bacillo di Koch.

Benchè non ci siamo occupati dell'applicazione della via sottodurale alla diagnosi biologica ci sia permesso esporre alcune considerazioni sull'argomento: l'infezione per via sottodurale permette una diagnosi di sicurezza indubbiamente più precoce che non quella praticata per altre vie, almeno nel campo sperimentale; noi pensiamo però che nel campo pratico non possa prendere il posto delle comuni tecniche. È sempre troppo scarsa la quantità di materiale inoculabile, è sempre troppo pericolosa la introduzione in meninge di un materiale polimicrobico, sia pure sottoposto a particolari trattamenti. Crediamo che il metodo sia da applicarsi, sempre contemporaneamente agli altri più comuni, in quei casi in cui vi sia una necessità particolarmente urgente di avere un responso ed in tali casi ricorrendo a 4-5 animali per lo meno, di grossa mole, concentrando il più possibile il materiale da inoculare e depositandolo sotto la dura il più lontano possibile dal punto di ingresso dell'ago.

#### RIASSUNTO

Gli AA. hanno studiato, nella cavia, la meningite sperimentale ottenuta per via transcranica sottodurale, servendosi di ceppi a virulenza varia di b. tubercolari umani, bovini, aviari, concludendo che con ceppi umani e bovini l'animale muore entro la terza settimana se si usano ceppi altamente virulenti, più tardi se si usano ceppi a media o scarsa virulenza, senza che abbia grande importanza la dose di bacilli adoperata; che non esiste una maggior sensibilità della meninge della cavia per il tipo umano o bovino; che i b. aviari danno una così piccola percentuale di meningiti specifiche che non si può parlare di sensibilità delle meningi della cavia per questo germe; e che infine questo metodo si presta molto bene per la determinazione biologica della virulenza del b. di Koch.

#### RÉSUMÉ

Les AA. ont étudié chez les cobayes la méningite expérimentale obtenue par voie transcranique sousdurale, en employant des souches à virulence variée de b. tuberculeux humains, bovins et d'oiseaux: ils en tirent ces conclusions:

1° Si on emploie des souches humaines et bovines d'une grande virulence, l'animal meurt dans la troisième semaine: il meurt quelque temps après si l'on emploie des souches d'une petite ou moyenne virulence; dans ce dernier cas il faut pas attacher trop d'importance à la quantité de bacilles employés.

2° On remarque pas une sensibilité plus aigue de la méninge du cobaye pour le type humain et bovin.

3° Les b. d'oiseaux donnent un pourcentage si bas des méningites spécifiques qu'il est impossible de parler de sensibilité des méninges du cobaye pour ce germe.

4° Enfin que cette méthode est très pratique pour la détermination biologique de la virulence du b. de Koch.

### ZUSAMMENFASSUNG

Verff. untersuchten in Meerschweinchen die, auf intracranialem Wege unter der Hirnhaut erzielte, sperimentelle Meningitis und verwendeten dabei Stämme von humanen, bovinen und Geflügeltuberkelbazillen verschiedener Virulenz. Sie kommen zu dem Schluss, dass das Tier mit humanen und bovinen hochvirulenten Stämmen in der dritten Woche sterben, sie sterben später wenn Stämme von mittlerer oder geringer Virulenz verwendet werden, ohne dass dabei die verabreichte Bazillendosis von besonderer Wichtigkeit wäre; und in den Meningen des Meerschweinchens besteht keine grössere Empfindlichkeit für den humanen oder bovinen Typus; dass die Bazillen der Geflügeltuberkulose einen so geringen Hundertsatz von spezifischer Hirnhautentzündung auslösen dass man von einer Empfindlichkeit der Meningen der Meerschweinchen infolge dieser Keime, nicht sprechen kann; und endlich, dass dieses Verfahren sehr nützlich sei für die biologische Bestimmung der Virulenz des Kochbazillus.

### SUMMARY

The authors have studied experimental meningitis obtained in guinea-pigs by sub-dural transcranial injections, adopting stocks of human, bovine and avian bacilli of varying virulence. They find that with human and bovine stocks the animal dies within the third week when highly virulent stocks are used and later if stocks of medium or slight virulence are adopted; that the meninx of the guinea-pig is not more highly sensible to the human or bovine types; that the avian bacilli give such a small percentage of specific meningitis that one cannot speak of the sensibility of the guinea-pig meninges to these germs; and lastly, that this method lends itself very well for the biological determination of the virulence of the Koch bacillus.

### BIBLIOGRAFIA

- AUSTRIAN. — « Bull. of the John Hopkins Hospital », 1916.  
BARBACCI. — « Atti R. Acc. Fisiocratici Siena 1902 », vol. 14, 1902.  
BARONE. — « Minerva Medica », 1927, pag. 215.  
BÉQUIGNON R. — « C. r. Soc. Biol. », 1939, 131, 581.  
BERTRAND, BABLET e BLOCH. — « Ann. Ist. Pasteur », 59, 1937, pag. 231.  
BLOCH. — « Berlin Klin. Woch. », 1907, n. 17.  
BOQUET, BROCA. — « Ann. Istituto Pasteur », 55, 1935, pag. 8.  
BOQUET. — « Ann. Istituto Pasteur », 61, 1938, pag. 479.  
BURNET, MANTOUX. — « C. R. Soc. Biol. », 1912, vol. 11.  
CALMETTE. — *L'infection bacillaire chez l'homme et chez les animaux*. Masson, 1938.  
CAPUANI. — « Riforma Medica », 1938, n. 39.

- COSTA. — « Riv. d. Pat. e Clin. d. Tuberc. », 1930.  
DADDI. — Il bacillo di Koch, Cappelli, Bologna, 1938.  
DE ANTONI. — « Policlinico Sez. Prat. », 1933, pag. 725.  
DE SANCTIS MONALDI e NATALI. — « Boll. Sez. It. Soc. Intern. Microb. », fasc. X, ottobre 1937.  
FELDMANN. — « Am. Rev. Tbc. », 1930, n. 3.  
ID. — « Am. Rev. Tbc. », 1934, 29, pag. 400 e 415.  
KASARA. — « Amer. J. Child. Dis. », 1924.  
KNORR, FRIEDRICH. — « Münch. Med. Woch. », 1930, pag. 173.  
MAGATH, FELDMANN. — « Am. Rev. Tbc. », 1930, n. 5.  
SIMPSON GLOYNE. — « Tubercle », 1928.  
SMITHBURN K. — « Am. Rev. Tbc. », 1937, 26, 637.  
SOOPER, DWORSKI. — « Am. Rev. Tbc. », 1930.  
ZAMBONI. — « Riv. d. Pat. e Clin. d. Tuberc. », 1937, pag. 56.

~~333331~~



60607

10000

10000

