

Misc B70 / 42

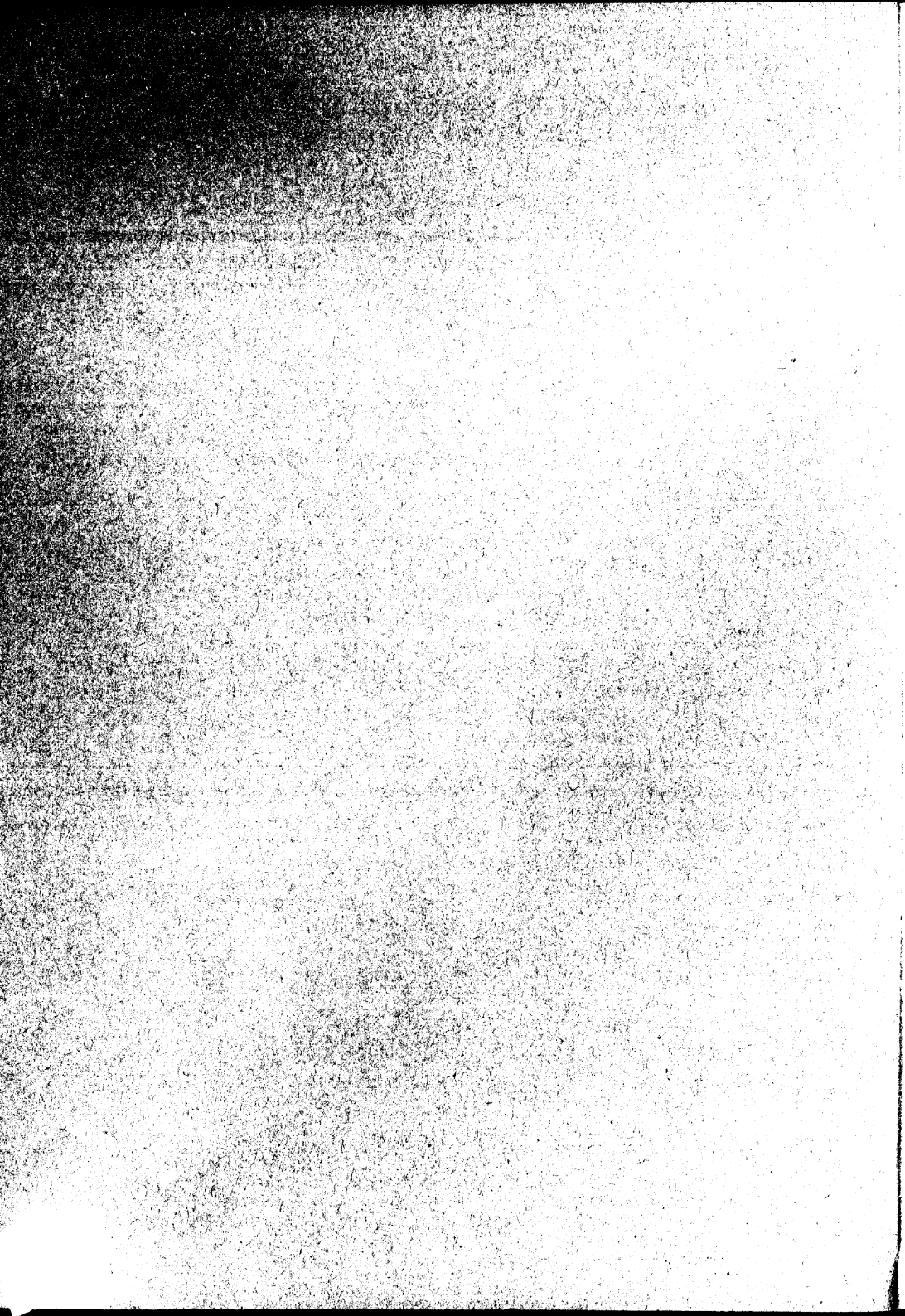
PROF. GIUSEPPE MAZZETTI

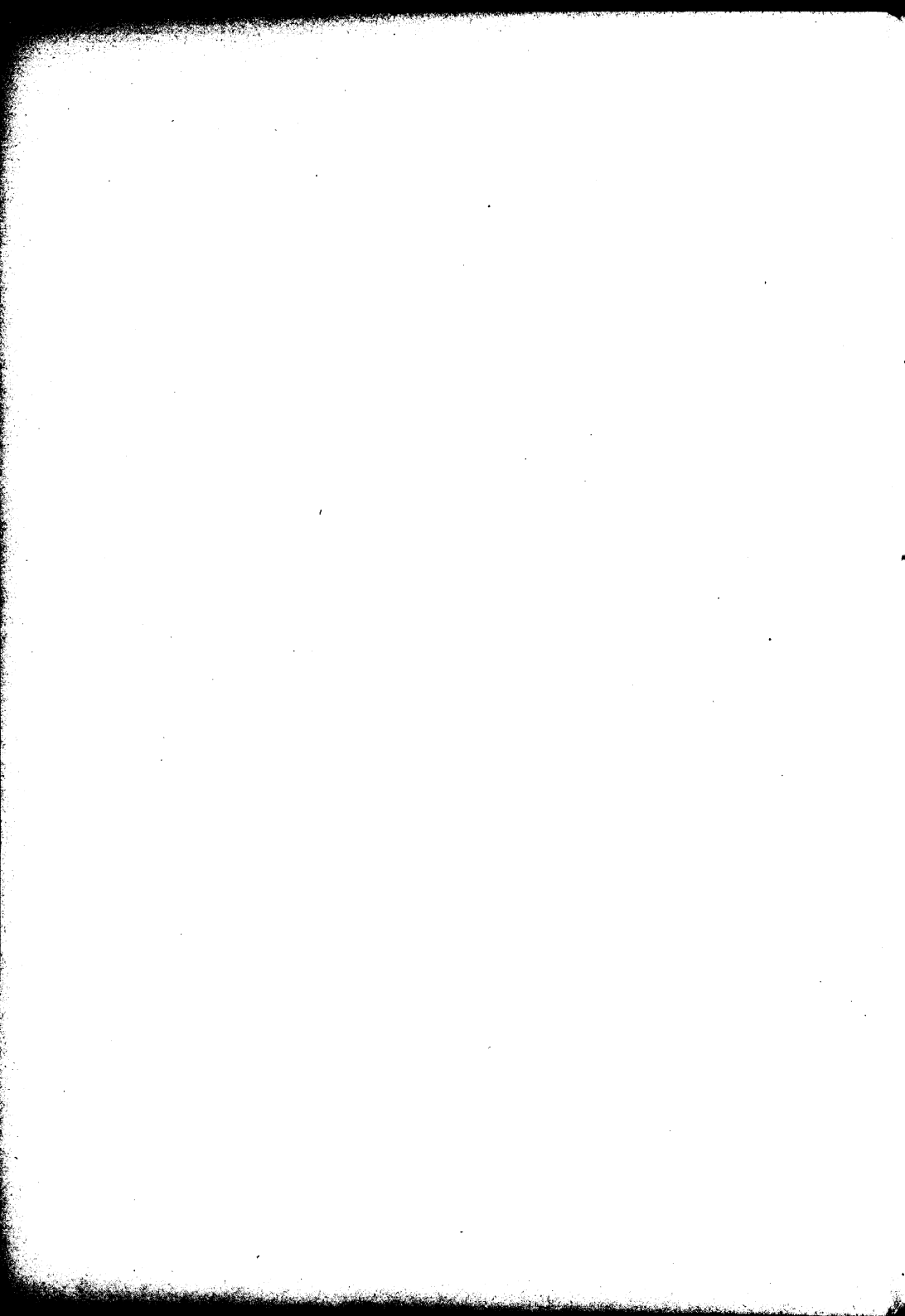


Sulla bacillemia tubercolare sperimentale e sul suo significato

Esemplare fuori commercio per
la distribuzione agli effetti di
legge.

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. III, 1943-XXI





PROF. GIUSEPPE MAZZETTI

Sulla bacillemia tubercolare sperimentale e sul suo significato

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. III, 1943-XXI

GIUSEPPE MAZZETTI

SULLA BACILLEMIA TUBERCOLARE SPE-
RIMENTALE E SUL SUO SIGNIFICATO

FIN da quando l'etiologia batterica della tubercolosi fu dimostrata dalle classiche ricerche di R. Koch, l'attenzione degli studiosi è stata sempre attratta dalla possibilità di dimostrare il B. tubercolare nel sangue circolante e i tentativi si sono moltiplicati seguendo metodi microscopici, biologici, e, infine, culturali. Dall'insieme delle numerosissime ricerche finora esperite in questo senso, risulta indubitabile che il B. di Koch può essere ritrovato nel sangue sia nello stadio iniziale dell'infezione, sia nella fase evolutiva o nel suo stadio terminale. Ma i tentativi di dare un preciso significato alla *bacillemia tubercolare* onde rendersi conto del modo come l'infezione si stabilisce ed evolve, della diffusione del B. di Koch dalle localizzazioni primarie, del meccanismo delle reinfezioni endogene, hanno avuto scarso successo perchè la bacillemia non ha un decorso regolare nelle varie forme e nei vari stadi dell'infezione.

Lo studio della bacillemia tubercolare si è esteso e approfondito specialmente dopo che Löwenstein rese note nel 1930 le sue osservazioni sulla presenza e sul significato del B. di Koch nel sangue. Questo Autore, usando un suo metodo per la cultura del B. di Koch dal sangue, avrebbe ottenuto un'alta percentuale di positività nelle emocolture non solo di tubercolosi, ma anche di individui affetti da altre malattie come la corea, la sclerosi multipla,

la demenza precoce e alcune affezioni dell'occhio; secondo Löwenstein, la ricerca del B. di Koch nel sangue, resa più facile e di più sicura riuscita con un suo particolare metodo, illuminerebbe non soltanto sul modo di stabilirsi e di evolversi delle varie manifestazioni tubercolari, ma anche sull'etiologia di alcune forme morbose fin allora non attribuite al B. di Koch.

I reperti ottenuti da Löwenstein hanno trovato solo parziali conferme nelle ulteriori numerosissime ricerche di controllo e le discussioni che il particolare metodo e i lavori di questo Autore hanno sollevato sono tanto note che non conviene insistervi; ricordo solo che nel capitolo della tubercolosi, nessun altro argomento, dopo quello dell'*ultravirus*, ha portato a risultati sperimentali così discordanti da quelli dell'A., in modo che l'interpretazione data da Löwenstein alla bacillemia non può ritenersi, in linea di massima, accettata.

*
* *

Petragnani è stato fra gli italiani il primo a condurre ricerche sistematiche sulla bacillemia. Egli, con la collaborazione di numerosi allievi, la ricercò sia nel sangue di animali infettati sperimentalmente, sia nel sangue di persone malate.

Per quanto fosse convinto da una larga e diretta sperimentazione della notevole diversità del quadro anatomo-patologico della tubercolosi sperimentale della cavia da quello del coniglio e ancor più da quello della tubercolosi umana e che, pertanto, essendo nelle varie specie animali molto diversa l'evoluzione dell'infezione, l'andamento della bacillemia dovesse avere caratteri particolari, tuttavia Petragnani ritenne che la ricerca della bacillemia negli animali da esperimento, in ordine alle diverse vie di inoculazione, alla virulenza dello stipite usato e alla recettività o resistenza dell'ospite, fosse molto utile per far luce sul diverso grado di bacillemia nelle varie forme e nei vari stadi della tubercolosi umana. Le ricerche di Petragnani trovarono la loro prima ragione nel fatto che, avendo Löwenstein insistito su una presunta azione battericida o inibente del sangue verso il B. di Koch, egli, che già nel 1926 aveva comunicato che i B. di Koch si conservano a lungo

vivi nel sangue e aveva raccomandato di fare la ricerca del B. di Koch dal sangue seminando il sangue stesso *in toto* sul suo terreno (metodo seguito da Bacialli [1926] e che tornava a conferma delle precedenti osservazioni di Rondoni [1924] che pure escludevano un'azione battericida o inibente del sangue verso il B. di Koch) aveva ben legittimi motivi per dubitarne.

Secondo Löwenstein, una delle ragioni per le quali, con le ordinarie tecniche culturali, non si riesce a mettere in evidenza il B. di Koch nel sangue o vi si riesce con difficoltà, consiste in questa proprietà del sangue stesso e di qui tutta l'indaginoso tecnica per allontanare l'emoglobina e adoperare per la semina il residuo del sangue così trattato.

Secondo Petragnani, invece, a seguito anche di ulteriori ricerche condotte con tecnica originale e con la collaborazione degli allievi Mazzetti, Buonomini, Di Mauro e Gentile e pubblicate dal 1933 al 1935, *il sangue non solo non esercita alcuna azione battericida o inibente verso il B. tubercolare, ma il sangue stesso, sia di animali normali che tubercolosi o vaccinati contro la tubercolosi, dimostra un'azione favorente lo sviluppo del B. di Koch*, sì da poter essere usato molto proficuamente come terreno di arricchimento nella ricerca della bacillemia (metodo Petragnani).

La bacillemia, secondo tali ricerche della Scuola del Petragnani, anzichè con la frequenza e l'intensità proclamata da Löwenstein, ricorre con varia frequenza e con una così modesta carica, da riuscirne praticamente difficile la dimostrazione o quanto mai limitata a percentuali proporzionate alla fase della malattia e al metodo impiegato. Tali risultati sono conformi anche ai risultati delle ricerche di Bingold (1928), Barelli (1931), Kirchner e Li (1932), Ninni e Brefey (1933), Proca (1933), Saenz e Costil (1935), De Santis (1934), Daddi (1935), Mishulow, Siegel, Singer, Melman e Romano (1935) e Bingold (1937), questi ultimi impiegando il metodo di Petragnani.

In due note riassuntive, Petragnani, in collaborazione con Mazzetti (1935), riferiva dettagliatamente la tecnica per la cultura del B. di Koch dal sangue, basata sulla semina del sangue totale nel terreno di Petragnani, sia subito appena prelevato e prima che coaguli, sia dopo qualche giorno che, addizionato a liquido di Sau-

ton, è stato lasciato incubare in termostato. La tecnica fissata da Petragnani è la seguente: il sangue, appena prelevato dalla vena con siringa sterilizzata, viene distribuito su alcuni provettoni di terreno Petragnani (con cera nel caso di ceppi bovini), nella quantità di cc. 1 per provettone (seminare almeno due tubi per campione di sangue) e il restante viene versato in provetta con liquido di Sauton (senza glicerina nel caso di ceppi bovini) in modo che si

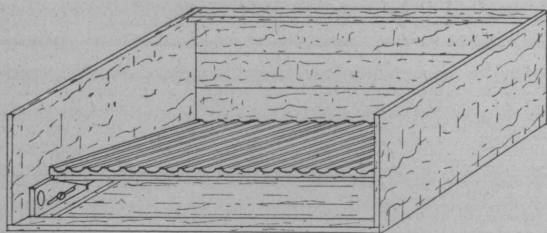


Fig. 1.

abbia un volume di sangue su 4 volumi di Sauton. Se deve essere seminata una forte quantità di sangue (cc. 10-12 o più) lo si distribuisce in palloncini contenenti la quantità voluta di Sauton e perle di ve-

tro; l'emulsione sangue-Sauton, agitata convenientemente per evitare la coagulazione, va tenuta a 37° C. per 5-7 giorni e agitata quotidianamente; al 5°-7° giorno si eseguono preparati microscopici e semine su terreno di Petragnani.

I tubi seminati direttamente col sangue devono essere posti in termostato in posizione inclinata in modo che il sangue si stenda uniformemente sulla superficie del terreno; per dare ai tubi una corretta posizione, è necessario fare uso di speciali sostegni col piano inclinabile a volontà, come quello rappresentato nella fig. 1. Secondo i dati ottenuti, l'arricchimento nel sangue quadruplica, in media, il numero dei risultati positivi rispetto alla semina diretta. Questa tecnica si è mostrata molto utile nello studio della bacillemia, non solo sperimentale, ma anche di quella umana (Barsini, 1934; Bonaudi e Cuniberti, 1936; Daprà, 1936).

Le ricerche eseguite da Petragnani e collaboratori sulla bacillemia sperimentale della cavia mostrano costantemente che nello studio evolutivo dell'infezione, il reperto di B. di Koch nel sangue è raro, mentre nel periodo agonico e preagonico il numero di casi positivi raggiunge il 70 %. Tale risultato fu confermato da ricerche di Petragnani, Mazzetti e Mariani (1934) eseguite sul sangue di conigli

infettati per via endovenosa con ceppi bovini di recente isolamento e perciò molto virulenti; nel sangue del cuore destro, prelevato dopo la morte di questi animali, avvenuta per polmonite tubercolare, il B. di Koch fu potuto dimostrare nell'89 % dei casi, il che parla per una vera e propria *poussée* bacillemica nel periodo agonico.

Mazzetti e Buonomini (1935), dietro consiglio di Petraggiani, ricercarono, invece, il B. di Koch nel sangue del cuore destro di conigli morti per inoculazione endovenosa e sottocutanea di un vecchio ceppo di collezione (Vallée) e dimostrarono che il reperto del B. di Koch nel sangue dell'animale agonico era molto più modesto e precisamente del 14,2 % negli animali inoculati per via endovenosa e dell'11 % in quelli inoculati per via sottocutanea; evidentemente, dunque, il ricorrere più o meno frequente della bacillemia è in ordine diretto alla virulenza del ceppo infettante.

Tali ricerche costituiscono il punto di partenza di una serie di esperienze, istituite da Mazzetti e svolte in collaborazione con i suoi allievi, di Carinci e di Puccioni, sul significato della persistenza in circolo del B. di Koch, negli animali inoculati per via endovenosa. Carinci (1937), Cavallari e Gozzini (1938), studiando la diffusione dei B. di Koch nel sangue e nei visceri di conigli inoculati con dosi massive e con piccole dosi di stipiti di B. di Koch a diverso grado di virulenza, dimostrarono che il reperto dei B. di Koch nel sangue è legato essenzialmente alle caratteristiche patogenetiche dello stipite e alla dose. Infatti l'inoculazione per via endovenosa di dosi massive di stipiti poco virulenti dette luogo a reperti negativi o ad una bacillemia di scarsa entità, mentre con l'inoculazione per la stessa via di dosi analoghe di stipiti virulenti, la bacillemia è persistente e rappresentata da numerosi B. di Koch per cc. di sangue: con dosi piccole (da 248 a 1.200 bacilli) il reperto dei B. di Koch nel sangue è stato sempre negativo anche a sole 48 ore dall'inoculazione.

Mazzetti, in una Relazione al VI Congresso Nazionale per la Lotta contro la tubercolosi (1937), rese noti i risultati di nuove ricerche. Ritenendo come dimostrato il diverso comportamento della bacillemia sperimentale a seconda della virulenza dello stipite infettante, è sembrato opportuno studiare comparativamente la bacil-

lemia negli animali normali e in quelli vaccinati contro la tubercolosi. Si poteva presumere, infatti, che l'inoculazione in un animale normale di uno stipite poco virulento, dovesse essere comparata, nei suoi effetti bacillemici, a quella di uno stipite virulento in un animale vaccinato contro la tubercolosi. Nel primo caso la diffusione dei bacilli nel sangue è facilmente ostacolata dai poteri difensivi naturali; nel secondo caso l'aggressività dello stipite e le sue capacità diffusive sarebbero state neutralizzate dalle difese organiche potenziate nella loro efficacia dal trattamento vaccinale.

L'osservazione che la comparsa del B. di Koch nel sangue e le sue capacità diffusive siano in stretta relazione con i rapporti tra substrato organico più o meno recettivo e qualità patogenetiche del ceppo infettante, era già nota dai lavori di Krause e Peters (1920), Krause (1924), Krause e Willis (1924), Willis (1925), Corper, Damerow e Cohn (1926) e si ricollegano alle classiche ricerche di Wright (1927) sui pneumococchi; questo ultimo Autore, infatti, ha dimostrato che il numero dei pneumococchi circolanti si abbassa rapidamente, mentre aumenta quello dei pneumococchi fagocitati, nei conigli immunizzati attivamente contro questo germe, in confronto ai conigli normali.

Una simile ricerca sul differente comportamento degli animali normali recettivi e di quelli immunizzati rispetto alla bacillemia, acquista una speciale importanza nel campo della tubercolosi perchè con essa possiamo valutare speciali stati difensivi dell'organismo legati a trattamenti immunitari e perchè si può entrare nel meccanismo intimo di difesa verso l'infezione tubercolare, così difficilmente valutabile attraverso le comuni reazioni sierologiche.

Tenendo conto specialmente delle deduzioni tratte dalle esperienze di Cavallari e Gozzini, che avevano dimostrato come la possibilità di coltivare il B. di Koch dal sangue negli animali inoculati per via endovenosa e salassati sia a 48 ore sia a un tempo più lungo dal momento dell'infezione, è tanto maggiore quanto più alta è la virulenza del ceppo infettante, è stato ritenuto opportuno di studiare, più che la bacillemia nello stadio evolutivo dell'infezione, sempre incostante e irregolare, piuttosto la discesa della carica bacillare del sangue dal momento dell'inoculazione, presu-

mendo che questa discesa fosse tanto più rapida quanto più efficienti sono i poteri difensivi dell'organismo. Tale ipotesi era dedotta direttamente dalle citate esperienze di Cavallari e Gozzini, i cui risultati, però, abbisognavano di conferma e di uno studio più esteso.

Con questa tecnica non sembra troppo esatto parlare di bacille-mia, quanto piuttosto di *persistenza in circolo dei B. di Koch*.

Descriveremo qui brevemente la tecnica di queste prime esperienze, premettendo che essa non si è dimostrata molto esatta nei suoi particolari e che è stata modificata per tentativi nelle ulteriori ricerche. Nell'ultima parte di questo lavoro, infatti, daremo la tecnica dettagliata, che è risultata idonea nelle numerose prove eseguite; questa tecnica è quella introdotta da Petraghani nelle già citate ricerche sulla cultura del B. di Koch dal sangue.

Agli animali in esperimento, sia normali (controlli) che vaccinati contro la tubercolosi, si inocula, per via endovenosa (giugulare), mediante siringa sterilizzata in autoclave, una sospensione bacillare allestita pesando in bilancia di precisione una certa quantità del velo culturale dello stipite prescelto, lasciato sviluppare per 15 giorni su liquido di Sauton e cercando di ottenere la disgregazione del materiale bacillare con sbattimento in provettoni con granuli di quarzo, previa aggiunta di terreno di Sauton; la sospensione, che al controllo microscopico appare ancora imperfettamente omogenea, viene filtrata sterilmente per carta; la sospensione si presenta allora costituita da unità bacillari ben isolate, ma si perde ogni riferimento al peso; la carica bacillare inoculata verrà, perciò, indicata in unità coltivabili su terreno di Petraghani, secondo il controllo batteriologico allestito seminando quantità note di diluizioni della sospensione in Sauton. Per queste esperienze sono stati usati due stipiti di B. tubercolare, tipo umano, uno poco virulento (Landis) e uno molto virulento (Escreato).

A 24, 48 e 72 gli animali vengono salassati dalla giugulare ed il sangue seminato nella quantità di cc. 0,5 per provettone di terreno di Petraghani; i provettoni, con tappo di cotone, vengono subito stesi sull'apposito sostegno in posizione inclinata in modo che il sangue si distenda uniformemente sulla superficie del terreno; si lascia coagulare il sangue e si pongono poi i provettoni a 37°C.,

fino a che il siero formatosi non sia completamente asciugato, il che avviene in 3-4 giorni. I provettoni vengono allora tolti di termostato, i tappi di cotone sostituiti con tappi di sughero previamente sterilizzati e i provettoni messi definitivamente a 37° C. I risultati ottenuti in questa serie di prove sono esposti schematicamente nel seguente specchio.

I GRUPPO: *Animali (cavie) di controllo.*

	Emoculture		
	Positive	Negative	% positive
a) <i>Inoculati con Landis.</i>			
(Dose inoc.: 88.000 bac. colt.):			
dopo 24 ore (camp. di sangue: n. 8) . .	2 (6-18 col.)	6	25,0
dopo 48 ore (camp. di sangue: n. 8) . .	4 (2-5-10-14 col.)	4	50,0
dopo 72 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	1 (15 col.)	2	33,5
b) <i>Inoculati con Eacreato.</i>			
(Dose inoc.: 77.000 bac. colt.):			
dopo 24 ore (camp. di sangue: n. 11)	11 (7-9-10-10-15-14- 15-17-31-35-49 col.)	0	100
dopo 48 ore (camp. di sangue: n. 10)	10 (5-6-9-9-15-17- 18-24-24-55 col.)	0	100
dopo 72 ore (camp. di sangue: n. 7)	7 (8-10-15-15-18- 20-55 col.)	0	100

II GRUPPO: *Animali (cavie) vaccinati*
a) Vaccinati con *anatubercolina integrale*.

SULLA BACILLERIA TUBERCOLARE ECC.

a) <i>Inoculati con Landis.</i>	Emoculture		% positive
	Positive	Negative	
(La stessa dose dei controlli):			
dopo 24 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	2 (1-1 col.)	1	66,6
dopo 48 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	1 (1 col.)	2	55,5
dopo 72 ore (camp. di sangue: n. 1) . .	0	1	0

b) *Inoculati con Ecreato.*

(La stessa dose dei controlli):

dopo 24 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	2 (2-6 col.)	1	66,6
dopo 48 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	1 (5 col.)	2	55,5

b) Vaccinati con una dose submortale del ceppo *Landis*.

a) <i>Inoculati con Landis.</i>	Emoculture		% positive
	Positive	Negative	
(La stessa dose dei controlli):			
dopo 24 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	1 (1 col.)	4	20,0
dopo 48 ore (camp. di sangue: n. 4) . .	0	4	0
dopo 72 ore (camp. di sangue: n. 5) . .	1 (1 col.)	2	55,5

b) *Inoculati con Ecreato.*

(La stessa dose dei controlli):

dopo 24 ore (camp. di sangue: n. 7) . .	5 (1-6-8 col.)	4	42,8
dopo 48 ore (camp. di sangue: n. 6) . .	2 (1-2 col.)	4	55,5
dopo 72 ore (camp. di sangue: n. 4) . .	2 (2-2 col.)	2	50,9

Benchè le percentuali dei casi positivi, tratti per il gruppo degli animali vaccinati con *anatubercolina*, pecchino forse di posa esattezza per lo scarso numero dei componenti il gruppo, in ogni modo risulta bene evidente che mentre il ceppo attenuato ha dato negli animali normali reperti scarsamente positivi, per numero di colonie e percentuale, e risultati ancor minori negli animali vaccinati (se si tiene conto specialmente del numero dei bacilli circolanti), il ceppo virulento, invece, ha dato il 100 % di reperti positivi negli animali di controllo con un numero ragguardevole di colonie e reperti di molto minori del gruppo degli animali vaccinati (se si tiene conto specialmente del numero dei bacilli circolanti).

Si deve ammettere, dunque, che il *ceppo virulento inoculato negli animali vaccinati si è comportato analogamente ad un ceppo attenuato inoculato negli animali normali*.

Dagli accertamenti collaterali eseguiti, è risultato, inoltre, che *gli animali nei quali il B. di Koch ha persistito in circolo più lungamente, cioè hanno mostrato un maggior numero di bacilli circolanti e per un tempo più lungo, sono morti precocemente rispetto agli altri*.

I risultati ottenuti in queste prime ricerche rendono edotti sulla importanza dell'argomento preso in studio, perchè, specialmente nel campo dell'infezione tubercolare sperimentale, ove il significato delle reazioni umorali appare discutibile e le reazioni istiocitarie sono difficilmente controllabili, la maggiore o minore persistenza in circolo dei B. di Koch può essere in grado di esprimere un valore per la prognosi degli animali da esperimento ed essere presa come un indice di misura nella determinazione delle capacità difensive dell'organismo, specialmente utile nel controllo dell'efficacia dei processi di immunizzazione.

I risultati ora esposti portavano come corollario indispensabile una nuova serie di ricerche volte a studiare con maggiore accuratezza i fattori che determinano la maggiore o minore persistenza in circolo dei B. di Koch negli animali normali o sottoposti a trattamenti vaccinali.

Lo studio dell'intimo meccanismo con il quale l'organismo si difende dall'infezione tubercolare ha seguito fino ad oggi due diversi indirizzi: quello cellulare e quello umorale. Ma, a differenza di molti

altri problemi immunitari per i quali si è cercata una spiegazione in un compromesso cellulo-umorale, nel campo della tubercolosi, invece, incondizionati favori ricevono quei dati clinici e sperimentali che vedono nella attività istiocitaria la base del sistema difensivo organico verso l'azione patogena del B. di Koch. Il fatto è che l'ipotesi di un meccanismo umorale non ha trovato, in questo campo, il conforto di reperti sperimentali significativi.

Se il B. di Koch è capace di dare luogo, come gli altri microrganismi, alla formazione di anticorpi, non si è arrivati alla dimostrazione sperimentale sicura che questi abbiano un'azione diretta o indiretta su questo batterio.

I risultati degli esperimenti perseguiti ormai da molti anni nella Scuola di Petragani e ora esposti, sono interessanti in quanto essi potrebbero portare a conclusioni, in un certo senso, contrastanti: infatti nel sangue di un individuo o animale allergico alla tubercolina, in quanto infettato di tbc. o vaccinato contro la tubercolosi, è dimostrabile un contenuto di anticorpi (*precipiline, agglutinine, anticorpi fissanti il complemento*), mentre non si può dimostrare *in vitro* alcun fattore importante di difesa organica contro l'infezione tubercolare.

In complesso, i contributi che le varie Scuole, pur con differenti indirizzi, hanno voluto portare alla dimostrazione della partecipazione dei fattori umorali nella difesa organica verso il B. di Koch non si sono tradotti in risultati affermativi o si sono tradotti in risultati che necessitano di ulteriori conferme.

La sola *reazione alla tubercolina*, che sintetizza, in un meccanismo non ancora ben chiarito, lo stato di reattività organica verso i veleni tubercolari, ha non solo un significato diagnostico e prognostico, confermato nelle prove sull'organismo malato o infettato sperimentalmente di tubercolosi, ma anche un significato come indice del decorso e dell'efficacia della vaccinazione antitubercolare, poichè è osservabile, salvo alcune eccezioni, un parallelismo fra attività profilattica dei vaccini e la loro capacità allergizzante. Le nuove possibilità per una più fine indagine che potevano derivare dallo studio della persistenza in circolo dei B. di Koch, specialmente nel confronto fra animali normali e vaccinati contro la tubercolosi, ha spinto Mazzetti a riprendere in esame alcuni aspetti

del problema. Mazzetti e Davoli (1940) hanno, infatti, eseguito una ulteriore serie di ricerche onde confermare le prove eseguite precedentemente, mettere in rilievo il significato della più o meno rapida scomparsa dei B. di Koch dal circolo, in rapporto specialmente con lo stato allergico degli animali vaccinati e con il tempo di sopravvivenza in confronto a quelli normali e ricercare, altresì, l'importanza di eventuali fattori umorali nel determinismo del fenomeno.

A tale scopo furono messe sotto esperimento 60 cavia divise in 4 lotti di 15 ciascuna, dei quali uno fu vaccinato con *anatubercolina integrale*, uno con una dose submortale del ceppo umano attenuato *Landis* e gli altri tenuti come controllo dei due lotti sottoposti al trattamento vaccinale. Le cavia furono seguite nella fenomenologia locale al punto di inoculazione dei vaccini, nell'andamento del peso e, periodicamente, saggiate nella reattività alla tubercolina. Una parte di questi animali (l'altra fu adoperata per altri esperimenti che saranno riferiti più oltre), a 70 giorni dalla fine del trattamento vaccinale, fu inoculata per via endovenosa con cc. 1 di una sospensione di B. di Koch contenente 367.000 bacilli coltivabili per cc., allestita spappolando in mortaio di agata, con tutte le cautele dell'asepsi, una certa quantità di patina tubercolare fresca da terreno di Petragnani, riprendendo con soluzione fisiologica sterile e filtrando per carta; al controllo microscopico del filtrato si osservano rarissimi piccolissimi gruppetti di bacilli in mezzo a numerosissimi altri isolati.

Dopo 24 e 48 ore le cavia vennero salassate dal cuore destro e il sangue seminato, nella quantità di cc. 0,5 ciascuno, su due provettoni di terreno Petragnani; dopo coagulazione del sangue, i tubi, negli appositi sostegni, venivano portati a 37^a C. e paraffinati dopo completo asciugamento del siero.

I risultati delle emocolture sono riportati nel seguente specchio:

Cavie vaccinate.

SULLA BACILLERIA TUBERCOLARE ECC.

	Emoculture		% positive
	Positive	Negative	
a) <i>Con anatubercolina.</i>			
(Dose inoculata per via endovenosa : 547.000 bacilli coltiv.):			
24 ore (camp. di sangue: n. 12) . . .	10 (1, 2, 6, 7, 17, 18 19, 20, 24, 27 col.)	2	85
48 ore (camp. di sangue: n. 12) . . .	6 (1, 1, 2, 6 8, 10, 1 col.)	6	50

b) *Con Landis.*

(Dose inoculata per via endovenosa;
come per il gruppo a atubercolina):

24 ore (camp. di sangue: n. 9) . . .	7 (4, 4, 9, 13, 16, 30, 50 col.)	2	77,7
48 ore (camp. di sangue: . 9) . . .	6 (1, 5, 6, 6, 7, 11, 11 col.)	5	66,6

Cavie normali di controllo.

	Emoculture		
	Positive	Negative	% positive
(Dose inoculata per via endovenosa: come nei gruppi vaccinati):			
24 ore (camp. di sangue: n. 11) . . .	11 (49, 67, 84, 220 200, patina, nume- rose, numerose, nu- merose, numerose col.)	0	100
48 ore (camp. di sangue: n. 11) . . .	11 (17, 21, 54, 65, 78, < 80, < 100, 128, 142, < 200, > 200 col.)	0	100

(< = circa . . . ; > = più di . . .)

A scopo dimostrativo, si riportano nella tavola acclusa alcuni reperti di emoculture in cavie vaccinate e in cavie normali.

Le considerazioni che se ne possono dedurre sono le seguenti.

1. — La positività dell'emoculture è più frequente fra gli animali di controllo che fra gli animali vaccinati, ferme restando tutte le altre condizioni di esperimento.

2. — Fra i casi positivi, la quantità di bacilli coltivabili da eguali volumi di sangue è nettamente inferiore nei gruppi di animali vaccinati rispetto a quelli di controllo.

3. — La bacillemia negli animali vaccinati tende ad esaurirsi con ritmo sensibilmente più rapido che negli animali di controllo, inoculati con la stessa sospensione di B. di Koch, il che conferma le nozioni risultanti dalle precedenti ricerche.

4. — Per quel che riguarda la ricerca di un eventuale rapporto fra intensità di reazione alla tubercolina e persistenza in circolo dei B. di Koch, non è possibile, da queste ricerche, affermare che una qualunque relazione sia evidente.

5. — Riguardo al tempo di sopravvivenza dalla inoculazione di prova, data la dose bacillare inoculata, assai superiore a quella usata nelle prove precedenti, i risultati sono stati dimostrativi solo per il gruppo di animali fortemente immunizzati con una dose submortale di un ceppo vivo e attenuato. Ecco, infatti, i tempi medi di sopravvivenza.

1. — Cavie vaccinate con *a. i.*: media = 20,5 giorni.

2. — Cavie vaccinate con il ceppo *Landis*: media = 38,5 giorni.

3. — Cavie di controllo: media = 15,5 giorni.

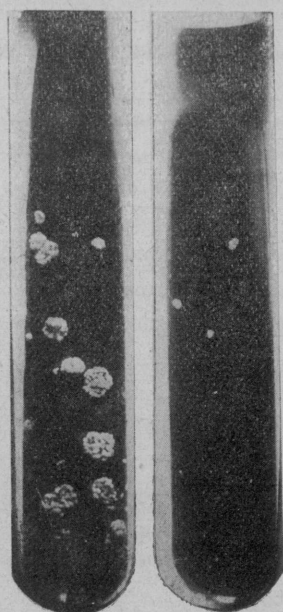
In linea generale risulta perciò confermato che *esiste una relazione tra sopravvivenza degli animali e rapidità di scomparsa dal circolo dei bacilli inoculati per via endovenosa.*

In una seconda serie di ricerche, Mazzetti e Davoli si sono preoccupati di trovare una spiegazione del diverso comportamento della persistenza in circolo dei B. di Koch fra animali vaccinati contro la tubercolosi e animali normali.

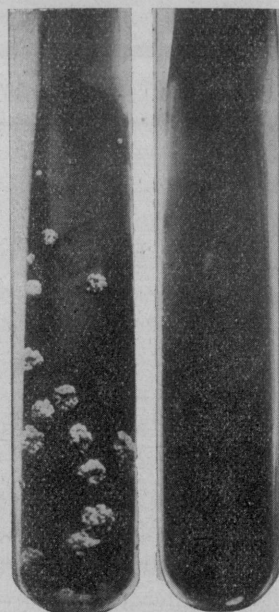
Queste prove hanno avuto due indirizzi differenti:

1. — Ricericare una eventuale attività battericida dei vari tessuti, comparativamente negli animali vaccinati e gli animali normali e sperimentando con un ceppo virulento e uno attenuato.

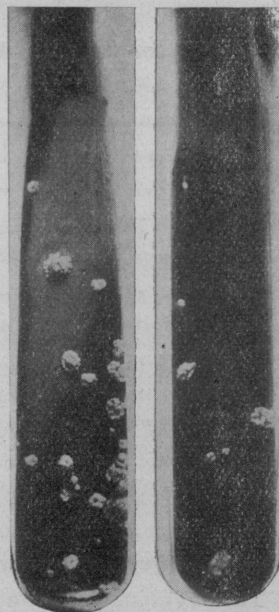
*Emoculture di cavie vaccinate e di cavie normali
dimostranti il diverso grado di persistenza in circolo dei B. di Koch dopo 24 e 48 ore.*



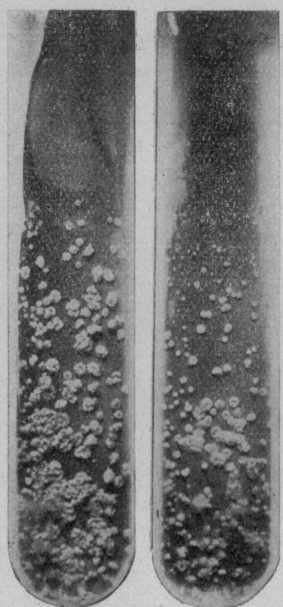
24 h 48 h
Cavia vacc. anatub.



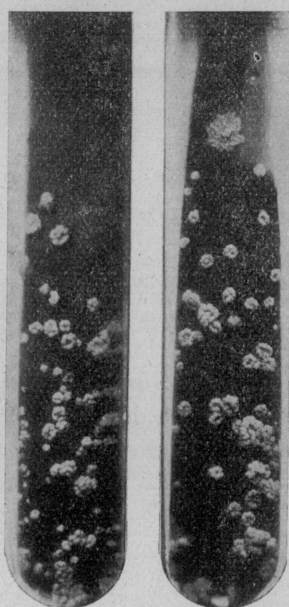
24 h 48 h
Cavia vacc. anatub.



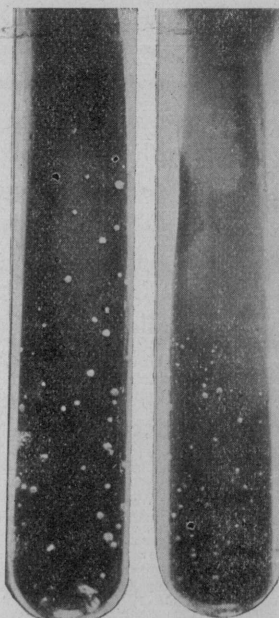
24 h 48 h
Cavia vacc. con Landis



24 h 48 h
Cavia normale



24 h 48 h
Cavia normale



24 h 48 h
Cavia normale

2. — Ricercare comparativamente nei sieri di animali vaccinati e in quelli di animali normali, una eventuale azione sensibilizzante i B. di Koch alla attività dei fagociti.

Riguardo al primo punto, dopo che era stata dimostrata da Petraghani l'assenza di ogni attività battericida del sangue verso il B. di Koch e che lo stesso Petraghani (1935-1937), in collaborazione con Citerni, aveva dimostrato con adatta tecnica, che neppure da parte degli organi di animali normali o tubercolosi viene svolta un'azione battericida sul B. di Koch, era logico ritornare ancora sull'argomento per ricercare un'eventuale attività battericida degli organi degli animali vaccinati contro la tubercolosi; le ricerche di Mazzetti e Davoli, eseguite con la tecnica indicata da Petraghani, hanno portato alla conclusione che *non vi è nessuna differenza di comportamento fra gli organi di cavie rese allergiche alla tubercolina mediante un trattamento vaccinale e gli organi di cavie normali*. Anche un'altra prova, a corollario della precedente, eseguita, ricercando, a tempi determinati, il contenuto bacillare negli organi di cavie vaccinate e di cavie normali, previamente inoculate per via endovenosa con uno stipse tubercolare virulento, non ha fatto vedere un comportamento diverso nei due gruppi di animali.

Queste esperienze acquistano tuttavia un certo interesse se messe in rapporto con i reperti del sangue circolante.

La rapida scomparsa dal circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa, non è dunque dovuta, almeno nelle condizioni di tempo dell'esperimento, ad una eventuale attività battericida, nè da parte del sangue circolante, nè da parte degli elementi dei tessuti. Nè, d'altra parte, si può parlare solo di un arresto meccanico dei bacilli circolanti, indipendente da fenomeni immunitari, poichè si è visto esservi un diverso comportamento fra animali vaccinati contro la tubercolosi e animali normali.

Restava da determinare se negli animali vaccinati, la minore persistenza in circolo dei B. di Koch, rispetto a quelli normali, si fondasse sulla presenza nel sangue di anticorpi sensibilizzanti i bacilli all'attività dei fagociti.

In un primo tempo è stato pensato di rivolgersi alla determinazione dell'indice opsonico ma, a parte le difficoltà di tecnica che si incontrano in una simile ricerca, quando sia condotta sul B. di Koch,

è sembrato che i dati tratti dalla osservazione del fenomeno a carico degli elementi bianchi del sangue (con i quali generalmente la reazione viene allestita) non fossero comparabili con quelli forniti dai nostri esperimenti e riferibili a fenomeni che probabilmente si avverano principalmente a livello dei tessuti.

La tecnica più favorevole per mettere in evidenza l'eventuale partecipazione di un fattore umorale, del tipo delle opsonine, al fenomeno della graduale scomparsa dei B. di Koch nel sangue degli animali inoculati per via endovenosa, è sembrata quella di determinare il comportamento degli stessi B. di Koch tenuti a contatto con il siero di animali normali o vaccinati contro la tubercolosi e poi inoculati per via endovenosa ad animali normali. Per questa nuova serie di ricerche sono state eseguite tre prove, variando volta a volta la tecnica per renderla più adatta allo scopo prefisso.

1^a prova:

a) Inoculazione per via endovenosa a cavie normali di una sospensione, allestita estemporaneamente, di B. di Koch virulenti in siero di cavie allergiche alla tubercolina, costituito da una miscela di sieri di cavie vaccinate con *anatubercolina* e di cavie tubercolose.

b) Inoculazione per via endovenosa a cavie normali di una sospensione della stessa dose di B. di Koch nella stessa quantità dello stesso siero allergico, ma precedentemente adsorbito con lo stesso ceppo di B. di Koch.

c) Inoculazione per via endovenosa a cavie normali di una sospensione della stessa dose di B. di Koch adsorbiti con lo stesso siero, poi lavati alla centrifuga e riscossi in soluzione fisiologica sterile. Prove identiche sono state allestite con sieri di cavie normali ed infine, per controllo, è stata inoculata la stessa dose di B. di Koch non trattati e semplicemente sospesi in soluzione fisiologica.

Da tutti gli animali viene eseguito, a 17 ore dall'inoculazione, un salasso dal cuore destro e consecutiva semina diretta del sangue in due tubi di terreno Petraghiani.

2^a prova:

a) Inoculazione per via endovenosa in cavie normali di una sospensione, allestita estemporaneamente, di B. di Koch virulenti in

siero di cavie allergiche alla tubercolina (miscela di sieri di cavie vaccinate con *anatubercolina*)

b) Inoculazione, con le stesse modalità, della stessa dose di B. di Koch sospesi in siero di cavie normali.

c) Inoculazione, con le stesse modalità, della stessa dose di B. di Koch sospesi in soluzione fisiologica sterile.

Si eseguono, per ogni animale, tre emocolture (sangue del cuore destro): la prima a circa 2 ore, la seconda a 17 ore, la terza a 40 ore dall'inoculazione.

3^a prova:

a) Inoculazione per via endovenosa a cavie normali di una sospensione in soluzione fisiologica sterile di B. di Koch virulenti, tenuti previamente a contatto con siero di cavie vaccinate contro la tubercolosi.

b) Inoculazione, con le stesse modalità, della stessa dose di B. di Koch tenuti a contatto con siero di cavie normali.

Emocolture (sangue del cuore destro) a 5,24 e 32 ore dall'inoculazione. Per i particolari di tecnica, si rimanda, per brevità, alla pubblicazione originale.

Le prove hanno portato tutte e tre a risultati identici, dai quali si può dedurre che i B. di Koch, tenuti a contatto con siero di cavie allergiche alla tubercolina o perchè tubercolose o perchè vaccinate contro la tubercolosi, e poi inoculati per via endovenosa a cavie normali non mostrano di permanere in circolo per un tempo più breve di quando sono trattati con sieri di cavie normali, cioè sembrerebbe che non venissero sensibilizzati in special modo all'attività dei fagociti. Alcune differenze riscontrate da animale ad animale sono, verosimilmente, da imputare ad una diversa reattività individuale.

Benchè queste prove sembrano negare la partecipazione di un fattore umorale alla fissazione dei bacilli circolanti nel sangue, è da far notare, tuttavia, come alcune osservazioni collaterali sulla sopravvivenza degli animali inoculati con bacilli trattati con sieri di animali allergici alla tubercolina in confronto a quella dimostrata da animali inoculati con bacilli trattati con sieri di animali normali, lascino aperta la questione.

Benchè la severità della inoculazione infettante (nella terza prova, per esempio, sono stati inoculati 740.000 bacilli coltivabili), abbia portato in pochi giorni a morte gli animali per polmonite tubercolare, cioè si sia mostrata poco adatta a mettere in evidenza differenze nella sopravvivenza fra i vari gruppi di animali, tuttavia è risultato che gli animali trattati con bacilli tenuti a contatto con sieri di animali resi allergici alla tubercolina mediante la vaccinazione antitubercolare, sono sopravvissuti più a lungo di quelli inoculati con B. di Koch tenuti a contatto con i sieri di cavie normali. La differenza nei giorni di sopravvivenza è piuttosto scarsa, ma è da tener di conto, tuttavia, della regolarità con cui il fenomeno si è verificato, come risulta dal seguente specchio.

*Tempo medio di sopravvivenza in giorni, dal giorno
dell'inoculazione infettante.*

	1 ^a prova	2 ^a prova	3 ^a prova
Cavie inoculate con B. di Koch tenuti a contatto con sieri di animali normali	10,5	20	15
Cavie inoculate con B. di Koch tenuti a contatto con sieri di animali vaccinati contro la tubercolosi	15,5	24	17,2

Questo dato sperimentale, tratto non dalla maggiore o minore persistenza in circolo dei B. di Koch ma dalla sopravvivenza degli animali inoculati, meritava di essere precisato e studiato in maniera più estesa. L'opportunità di un simile studio si è presentata durante alcune ricerche eseguite recentemente da Puccioni a corollario di quelle di Mazzetti e Davoli. Questo Autore ha studiato l'azione sul B. di Koch di sieri di individui tubercolosi a vario stadio della malattia, con tecnica analoga a quella seguita da Mazzetti e Davoli, usando però tre diverse dosi infettanti, rispettivamente di 88.000, 180.000 e 230.000 bacilli coltivabili. Per controllo ai sieri di individui tubercolosi sono stati usati sieri di neonati da madri non tubercolose.

I risultati sono stati molto interessanti, inquantochè gli animali inoculati con B. di Koch trattati con sieri di tubercolosi non hanno

mostrato una persistenza in circolo dei bacilli inoculati minore dei controlli, mentre, invece, hanno sopravvissuto ai controlli in maniera più o meno manifesta a seconda della dose bacillare inoculata o, più precisamente, essi hanno sopravvissuto tanto più lungamente quanto più scarsa è stata la dose inoculata.

È stata, insomma, confermata l'osservazione di Mazzetti e Davoli ed è stato meglio messo in evidenza che esiste un'azione dei sieri tbc. sul B. di Koch, azione che non è possibile studiare attraverso l'andamento della persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa, ma tenendo conto della sopravvivenza degli animali inoculati con bacilli trattati con sieri tbc. o di animali vaccinati contro la tubercolosi, in confronto ad altri animali inoculati con eguali dosi di bacilli trattati con sieri normali.

I risultati di queste prove sono riuniti nella tabella seguente.

	1° Gruppo Animali inoc. con 88.000 B. di Koch	2° Gruppo Animali inoc. con 180.000 B. di Koch	3° Gruppo Animali inoc. con 250.000 B. di Koch
Giorno della morte dell'ultimo controllo (animali inoculati con B. di Koch trattati con sieri di neonati da madri non tbc.)	47 ⁰	28 ⁰	17 ⁰
Sopravvivenza degli animali trattati con B. di Koch + siero tbc., alla morte dell'ultimo controllo	71,4 %	20 %	11 %
Sopravvivenza media in giorni degli ani- mali trattati con B. di Koch + siero tbc.	51	26,6	16
Sopravvivenza media in giorni degli ani- mali trattati con B. di Koch + siero normale	33	21,8	15
Differenza di sopravvivenza in giorni fra gli animali trattati con B. di Koch + siero tbc. e i controlli	+ 18	+ 4,8	+ 1

Considerando, nei loro aspetti generali, i risultati delle ricerche di Mazzetti e Davoli e di Puccioni, si può ritenere come sufficientemente dimostrata una partecipazione dei fattori umorali al mec-

canismo di difesa dell'organismo verso l'azione del B. di Koch, almeno nelle condizioni sperimentali riportate. Questi fattori non sono anticorpi batteriolitici, da escludersi per le numerose esperienze negative i cui risultati sono assolutamente concordanti in proposito; probabilmente sono anticorpi sensibilizzanti i B. di Koch all'attività dei fagociti. Queste esperienze non hanno portato prove decisive in questo senso, dati i risultati negativi della ricerca sulla persistenza in circolo dei B. di Koch, ma sembrano trovare una conferma se si tiene conto specialmente della sopravvivenza degli animali inoculati con B. di Koch tenuti a contatto con sieri di individui tubercolosi o di animali vaccinati contro la tubercolosi, in confronto a quella dimostrata da animali inoculati con B. di Koch trattati con sieri normali.

I risultati delle ricerche ora riferite hanno spinto Mazzetti e Vigni (1940) ad approfondire lo studio del rapporto tra persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa ed alcuni aspetti delle reazioni immunitarie date dai sieri di animali vaccinati contro la tubercolosi, come la reazione di Bordet-Gengou, l'indice opsonico e l'enzimoreazione, unitamente allo studio dell'allergia alla tubercolina e della capacità di sopravvivenza degli animali vaccinati contro la tubercolosi all'inoculazione di una dose mortale di B. di Koch. Per quanto riguarda la reazione di fissazione del complemento, essa sembrava costituire, specialmente se allestita con un antigene di squisita sensibilità come il *fenballacin integrale* di Petraghani, uno dei migliori metodi per determinare il movimento umorale consecutivo al trattamento con un antigene tubercolare.

Anche l'enzimoreazione si mostrava degna di esser provata, specialmente per studiare il suo comportamento negli animali vaccinati con bacilli tubercolari uccisi, i quali, permanendo a livello del focolaio vaccinale sottocutaneo per un tempo più o meno lungo, si dovrebbero trovare nelle migliori condizioni per promuovere l'attività di quei fermenti specifici organici che, secondo la Scuola di Maragliano, agirebbero sulle proteine tubercolari con un meccanismo tale da renderle assimilabili ed eliminabili. Benchè il concetto su cui è impostata tale reazione sia stato criticato, tuttavia è da notare che Salvioli ha considerato tale reazione come significativa nel corso della vaccinazione antitubercolare nell'uomo.

La ricerca dell'*indice opsonico* ha richiamato pure l'attenzione dei due autori, specialmente in seguito alle osservazioni di Mazzetti e Davoli; invero, i risultati ottenuti dai vari Autori che si sono accinti a determinare tale reazione sui sieri di individui o animali tubercolosi non sono stati concordanti; non è stato cioè chiaramente dimostrato che nell'organismo tubercoloso, parallelamente allo stabilirsi dell'allergia alla tubercolina e alla comparsa di anticorpi nel sangue, si verifichi con eguale costanza un aumento dell'indice opsonico del siero; eppure, data come dimostrata l'assenza di un potere battericida del siero e ammessa almeno come dubbia la partecipazione di altri anticorpi circolanti alla difesa organica verso il B. di Koch, l'importanza di anticorpi del tipo delle opsonine, sensibilizzanti i bacilli ai processi difensivi cellulari, non può essere messa in dubbio. Era da vedere perciò se le osservazioni in proposito fatte sull'animale da Mazzetti e Davoli e da Puccioni collimassero con i valori dell'indice opsonico.

Per quanto riguarda la tecnica seguita per l'allestimento di queste reazioni si rimanda al lavoro originale.

Per le ricerche sono state impiegate 60 cavia, divise in 4 lotti di 15 ciascuna.

Il primo lotto è stato vaccinato con *anatubercolina integrale*.

Il secondo lotto è stato vaccinato con una dose submortale del ceppo umano attenuato *Landis*.

Il terzo e quarto lotto sono stati tenuti di controllo ai due primi. A 20 giorni dalla fine del trattamento, gli animali sono stati saggiati nella reattività alla tubercolina, poi, suddividendoli in gruppi, sono stati prelevati campioni di sangue per le reazioni sierologiche e, dopo, ogni gruppo inoculato per via endovenosa con una dose diversa di un ceppo umano virulento.

Le emoculture sono state allestite a 24 e 48 ore dall'inoculazione infettante. I risultati delle reazioni sierologiche, delle emoculture e i valori medi della sopravvivenza rispetto ai controlli, sono riportati nelle tabelle I e II. Da queste si può vedere che, per quel che riguarda gli accertamenti eseguiti sui sieri, i due gruppi sottoposti a trattamento vaccinale (uno con *a. i.* e l'altro con il ceppo attenuato) si sono comportati in maniera pressappoco eguale, mentre per la reattività alla tubercolina e per la resistenza all'inoculazione

di prova, vi è stata una sensibile differenza fra i due gruppi. Mentre, infatti, il gruppo degli animali vaccinati con il ceppo attenuato *Landia* ha mostrato una notevole resistenza esplicitasi, rispetto ai controlli, sia con una maggiore sopravvivenza, sia con una minore persistenza in circolo dei bacilli inoculati per via endovenosa, il gruppo degli animali vaccinati con *a. i.* si è comportato all'incirca come i controlli ed ha presentato una scarsissima reattività alla tubercolina, molto minore rispetto al primo gruppo.

Questo comportamento, che contrasta con i risultati di Petragliani e collaboratori, di Mazzetti, Mazzetti e Davoli ecc. sulla efficacia preventiva della *a. i.*, è dovuto, molto probabilmente, al fatto che in queste prove la dose di *anatubercolina* è stata troppo elevata; mentre, infatti, nelle ricerche precedenti gli animali sono stati sempre trattati con inoculazioni settimanali di cc. 0,5 di *a. i.* diluita 1:10 in soluzione fisiologica sterile, per un complesso di 10-12 inoculazioni, in queste la dose settimanale è stata di cc. 0,5 di *a. i.* diluita 1:5; ciò è stato fatto per tentare di abbreviare il tempo utile per lo stabilirsi di un notevole stato allergico. Ma, come si è visto, il risultato è stato contrario e, dato che nel siero di questi animali è stato riscontrato un tasso notevole di anticorpi, gli Autori hanno espresso l'opinione di aver conferito agli animali, con un simile trattamento, se non uno stato di *iperrecettività* secondo i concetti di Zironi, almeno una condizione organica molto simile ad esso. Si vedrà come tale osservazione sia stata convalidata da ulteriori prove.

Per quanto riguarda l'*enzimoreazione*, è notevole il fatto che essa è stata sempre negativa, dal che si deduce quanto poco tale reazione si presti all'analisi dello stato di immunità acquisita, almeno nelle cavie.

TABELLA I. — Risultati delle prove eseguite sul gruppo delle

LOTTE DI CAVIE IN ESPERIMENTO	Reazione alla tubercolina (media)	Numero delle cavia che hanno avuto fissazione del compl. positiva		Enzimoreazione	Indice opsonico (media)
		fino a 1/32	parziale		
<i>Landis</i> (N. 5)	+ + —	5		negativa	0,10
<i>Landis</i> (N. 5)	+ + —	5	1 (fino a 1:6)	negativa	0,21
<i>Landis</i> (N. 5)	+ + +	5		negativa	0,40
<i>Controlli Landis</i> (N. 5)		0	0	negativa	0,17
<i>Controlli Landis</i> (N. 4)		0	0	negativa	0,14
<i>Controlli Landis</i> (N. 5)		0	1 (+ — in ogni diluizione)	negativa	0,15

cavie vaccinate con Landis e sul gruppo dei rispettivi controlli.

Numero dei Bacilli di Koch inoculati	Numero delle cavia che hanno presentato bacillemlia		Sopravvivenza media in giorni
	nelle 24 ore	nelle 48 ore	
258.000	2 (= 40 %) (risp. 1, 2, colonie; 3 emoc. negative)	5 (= 60 %) (risp. 1, 1, 2, colonie; 2 emoc. negative)	78,6
280.000	5 (= 60 %) (risp. 2, 4, 12, colonie; 2 emoc. negative)	0 (= 0 %) (1 emocultura non eseguita)	71,5 (1 vivente)
5.360.000	5 (risp. 7, 20, numerosis- sime colonie; 2 emocul- ture non eseguite)	1 (numerosissime colonie; 4 emoculture non ese- guite)	57,9 (una morta in seguito a salasso)
258.000	5 (= 100 %) (risp. 1, 2, 2, 12, 14, colonie)	4 (risp. 1, 5, 7, 42, colonie; 1 emocultura non ese- guita)	41,8
280.000	4 (= 100 %) (risp. 5, 6, 6, numerose colonie)	4 (= 100 %) (risp. 5, 3, 4, numerose colonie)	52,
5.360.000	5 (= 100 %) (risp. 3, numerose e numerosissime colonie)	5 (= 100 %) (risp. 4, 74, numerosis- sime colonie)	26

TABELLA II. — Risultati delle prove eseguite sul gruppo delle cavie

LOTTE DI CAVIE IN ESPERIMENTO	Reazione alla tubercolina	Numero delle cavie che hanno avuto fissazione del compl. positiva		Enzimoreazione	Indice opsonico (media)
		fino a 1:52	parziale		
Anatubercolina (N. 7) . .	+ — —	7		negativa	0,15
Anatubercolina (N. 5) . .	+ — —	2	1 1 : 4 + + — 1 : 8 + — — 1 : 16 + — — 1 : 52 — — —	negativa	0,16
Anatubercolina (N. 3) . .	+ + —	5		negativa	0,14
Controlli Anatubercolina (N. 5)		0	4 (in tutte e quattro + — — a 1:4)	negativa	0,22
Controlli Anatubercolina (N. 4)		0	0	negativa	0,15
Controlli Anatubercolina (N. 5)		0	5 (+ — — in ogni dilui- zione)	negativa	0,19

vaccinate con anatubercolina e sul gruppo dei relativi controlli.

Numero dei bacilli di Koch inoculati per via endovenosa	Numero delle cavie che hanno presentato bacilemia		Sopravvivenza media in giorni
	nelle 24 ore	nelle 48 ore	
258.000	2 (= 28,5 %) (risp. 1, 4, colonie; 5 emoc. negative)	4 (= 57,1 %) (risp. 1, 2, 3, 3, colonie; 3 emoc. negative)	49 (2 viventi)
560.000	0 (= 0 %)	2 (= 40 %) (risp. 4, 13, colonie; 3 emoc. negative)	59 (2 cavie non computate perchè morte rispettiva- mente a 2 e 7 giorni dalla inoculazione per cause non accertate)
.			
258.000	1 (= 20 %) (1 colonia; 4 emoc. negative)	2 (= 40 %) (risp. 4, 16, colonie; 3 emoc. negative)	50,7 (1 vivente)
560.000	2 (= 50 %) (risp. 6, 20, colonie; 2 emoc. negative)	3 (= 75 %) (risp. 2, 6, 36, colonie; 1 emoc. negativa)	52,5
.			

La reazione di Bordet-Gengou ha confermato anche in queste esperienze la sua alta sensibilità, mostrando una positività quasi uguale nei due gruppi.

La reazione alla tubercolina, dando valori molto più alti negli animali vaccinati col ceppo vivo e attenuato che non in quelli vaccinati con *a. i.*, sembra uno specchio molto più fedele che la reazione di fissazione del complemento delle capacità difensive dell'organismo, avendo mostrato una notevole concordanza con lo stato di resistenza degli animali verso l'inoculazione di prova, benchè alcune osservazioni inducano a pensare che questo non trovi nemmeno nella reattività alla tubercolina una esteriorizzazione completamente fedele.

La ricerca dell'indice opsonico, per la quale queste ricerche erano state, in parte, istituite, ha mostrato valori molto bassi e poco dimostrativi; in linea generale, però, esso è apparso più alto nelle cavie vaccinate con il ceppo vivo e attenuato che non in quelle trattate con *a. i.* in relazione, perciò, alla diversa capacità di resistenza dei due gruppi, ma, anche per le difficoltà di tecnica che si riscontrano allestendo questa reazione col B. di Koch, essa non sembra destinata a dire qualche cosa di più delle altre reazioni sierologiche. Secondo le osservazioni Mazzetti e Davoli, la ricerca della capacità di resistenza, rispetto ai controlli, degli animali inoculati con B. di Koch tenuti a contatto con sieri di animali o individui allergici alla tubercolina, sembra portare a risultati molto più dimostrativi che la ricerca dell'indice opsonico.

La persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa si è dimostrata in relazione con la capacità di resistenza degli animali e ha portato a risultati dimostrativi specialmente nei gruppi trattati con dosi non troppo elevate di B. di Koch. Infatti, nei due gruppi del lotto di animali vaccinati col ceppo vivo e attenuato e inoculati con 238.000 e 280.000 bacilli coltivabili, si sono ottenute, dopo 24 ore, emocolture positive rispettivamente nel 40 % e nel 50 % degli animali e dopo 48 ore nel 60 % e nel 0 %, con scarso numero di colonie, mentre nei rispettivi gruppi di controlli le emocolture sono state positive nel 100 % con un numero molto elevato di colonie.

Nel gruppo di animali vaccinati con *anatubercolina*, i risultati delle emocolture si sono discostati in scarsa misura da quelli del gruppo

dai controlli e ciò in concordanza con la debole resistenza offerta dagli animali così vaccinati.

La sopravvivenza mostrata dagli animali vaccinati si è prestata ad interessanti osservazioni specialmente se messa in rapporto con la persistenza in circolo dei B. di Koch e con il grado di allergia alla tubercolina. La sopravvivenza media di ogni gruppo, espressa in giorni, risulta dal seguente specchio:

Gruppi	Animali vaccinati con il ceppo vivo e attenuato <i>London</i>	Animali di controllo
1. - Inoculazione di 258.000 B. di Koch	78,6	41,8
2. - Inoculazione di 280.000 B. di Koch	71,5	52,5
3. - Inoculazione di 5.560.000 B. di Koch	59,7	26,0

Gruppi	Animali vaccinati con <i>Anatubercolina</i>	Animali di controllo
1. - Inoculazione di 258.000 B. di Koch	49	50
2. - Inoculazione di 560.000 B. di Koch	59 (2 animali viventi)	52

Se si mettono in relazione questi risultati con quelli ottenuti con la ricerca della persistenza in circolo del B. di Koch e con quelli della reattività alla tubercolina, si vede che essi sono strettamente concordati. Da queste esperienze si può concludere dunque che nel controllo dei processi di vaccinazione antitubercolare nel campo sperimentale, la ricerca della persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa, il saggio della reattività cutanea alla tubercolina, unitamente alle osservazioni sulla capacità di sopravvivenza degli animali vaccinati, sempre rispetto ai controlli, formano un insieme di ricerche e di reazioni capaci di determinare con sufficiente esattezza il grado di immunità acquisita verso il B. di Koch. Nei lavori di Mazzetti e collaboratori è fatta menzione di ricerche anatomo-patologiche sugli animali oggetto delle riferite

esperienze; si può ora dire con sicurezza che mentre, il quadro anatomo-patologico macroscopico ha fatto, vedere, talvolta, qualche differenza tra animali vaccinati e quelli normali, i reperti istologici non hanno aggiunto niente di specialmente interessante ai fini delle ricerche in questione.

Mazzetti, dietro i risultati di queste ultime ricerche, ha voluto indagare meglio il comportamento degli animali inoculati con forti dosi di *anatubercolina integrale* ripetute a brevi intervalli di tempo, in confronto ad animali sottoposti al trattamento con lo stesso vaccino inoculato nella stessa dose ma ad intervalli settimanali, che nelle ricerche di Petraghani e collaboratori si era dimostrato meglio confacente per conferire agli animali un notevole stato di resistenza. Si sarebbe così potuto stabilire se gli animali sottoposti ad un trattamento intensivo con il vaccino entrassero in uno stato di iperrecettività; nello stesso tempo si sarebbe potuto ancora studiare il comportamento della reattività alla tubercolina, della reazione di Bordet-Gengou e i loro rapporti con lo stato di resistenza degli animali e con la persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa.

40 cavia, all'incirca dello stesso peso, sono state divise in 4 gruppi di 10 ciascuno e trattate nel modo seguente:

Gruppo A. — Ogni animale viene inoculato per via sottocutanea con cc. 1 di *anatubercolina integrale* diluita 1:20 in soluzione di NaCl. Le inoculazioni sono state 10, eseguite settimanalmente. La quantità totale di *a. i.* inoculata è stata di cc. 0,5.

Gruppo B. — Gli animali di questo gruppo vengono trattati con una quantità di vaccino eguale al gruppo precedente ma suddivisa in dosi minori che vengono ripetute a giorni alterni e precisamente con cc. 0,014 di *a. i.* diluita in cc. 1 di soluzione fisiologica sterile.

Gruppo C. — Viene istituito per controllo al gruppo B; le cavia sono inoculate negli stessi giorni sostituendo l'*a. i.* con soluzione fisiologica sterile.

Gruppo D. — Viene istituito per controllo del gruppo A; viene inoculato con gli stessi intervalli di tempo sostituendo l'*a. i.* con soluzione fisiologica sterile.

Gli animali trattati con dosi piccole e ripetute di vaccino hanno mostrato precocemente larghe zone di infiltrazione sottocutanea,

raccolte caseose abbondanti, ma tali reperti hanno variato notevolmente da animale ad animale; se ne sono osservati alcuni, infatti, nei quali la reazione è stata scarsissima, l'infiltrato e le raccolte caseose quasi assenti; questi animali hanno reagito debolmente anche alla tubercolina.

L'intradermo alla tubercolina, il prelevamento dei campioni di sangue per la r. f. c. sono stati eseguiti periodicamente quando gli animali dei gruppi *A* e *B* avevano ricevuto una eguale quantità di *a. i.*

Dopo un certo numero di giorni di riposo dall'ultima inoculazione di vaccino, gli animali di tutti i gruppi hanno ricevuto per via endovenosa una dose mortale di *B. di Koch* virulenta in due quantità diverse una pari a 40.000.000 e l'altra a 60.000.000 di bacilli coltivabili. La sospensione bacillare, allestita sbattendo in provettoni con grani di quarzo e chiusi alla fiamma, una certa quantità di cultura di 15 giorni su Sauton, si è mostrata, in verità, troppo concentrata e poco omogenea e a questi difetti di allestimento sono dovuti certamente alcuni risultati contrastanti di queste prove e alcune morti troppo precoci riscontrate negli animali così inoculati. I risultati sono riportati dettagliatamente nella tabella III.

TABELLA III. — Risultati delle prove eseguite su cavie vaccinate con
e inoculate a giorni alterni (Gruppo B)

CAVIE IN TRATTAMENTO	Risultati intradermo alla tubercolina (1)					Risultati della reazione di fiss. del compl. (1)			
	21 g.	48 g.	63 g.	90 g.	115 g.	21 g.	45 g.	63 g.	115 g.
Gruppo A:						(2)	(2)	(2)	(3)
N. 1.	—	+	+	—	±	—	+++ (1 : 3)	—	+++ (1 : 6)
" 2.	—	+	±	±	±	—	+++ (1 : 9)	±— (1 : 9)	+++ (1 : 6)
" 3.	+	±	+	+	+	± (1 : 5)	compl.	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 48)
" 4.	—	±	+	+	+	—	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 48)
" 5.	±	±	+	+	+	± (1 : 6)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 9)	±— (1 : 3)
" 6.	±	+	—	+	+	—	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 96)
" 7.	—	±	+	+	+	± (1 : 6)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 24)
" 8.	+	+	+	+	+	± (1 : 5)	compl.	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 48)

(1) In giorni dall'inizio del trattamento vaccinale.

(2) Diluizioni del siero: 1 : 5; 1 : 6; 1 : 9. Tra parentesi sono espressi i limiti di positività.

(3) Diluizioni del siero: 1 : 5; 1 : 6; 1 : 12; 1 : 24; 1 : 48; 1 : 96.

(4) Numero di colonie in cc. 0,2 di sangue.

Compl. = lettura impossibile per attività complementare del siero.

c. 0.5 di anatubercolina inoculata in dosi distanziate (Gruppo A)
e i rispettivi controlli (Gruppi C e D).

SULLA BACIL-
LEMIA TUBER-
COLARE ECC.

Emoculture (inoc. di 40.000.000 B. K.)		Emoculture (inoc. di 80.000.000 B. K.)		Sopravvivenza in giorni
24 h	48 h	24 h	48 h	
(4)	(4)	(4)	(4)	
183	15			48
....		190	24	54
num.	14			26
....		210	70	38
19	—			36
....		140	110	
....		85	11	(vive)
97	7			48

Valore medio: 41
(esclusa la cavia soprav-
vivente)

CAVIE IN TRATTAMENTO	Risultati intradermo alla tubercolina (1)					Risultati della reazione di fiss. del compl. (1)			
	21 g.	48 g.	63 g.	90 g.	115 g.	21 g.	43 g.	63 g.	115 g.
Gruppo B:						(2)	(2)	(2)	(3)
N. 11.	+ --	± --	+++	+++	+++	± -- (1 : 3)	compl.	+++ (1 : 9)	
" 12.	---	---	+++	+++	++++	---	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 96)
" 13.	---	+ --	+ --	+++	++++	---	+++ (1 : 9)	± -- (1 : 3)	+++ (1 : 48)
" 14.	---	---	+ --	+ --	+++	---	+ -- (1 : 9)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 96)
" 15.	---	---	---	---	± --	---	compl.	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 3)
" 16.	---	---	++-	++-	+++	---	compl.	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 96)
" 17.	---	+ --	+ --	+++	++++	---	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 9)	+++ (1 : 96)
" 18.	---	± --	---	+ --	+++	---	+++ (1 : 3)	± -- (1 : 3)	+++ (1 : 96)
" 19.	± --	---	± --	± --	---	---	+++ (1 : 9)	± -- (1 : 3)	compl.
" 20.	± --	± --	± --	± --	+++	---	± -- (1 : 3)	± -- (1 : 3)	+++ (1 : 24)

Emoculture (inoc. di 40.000.000 B. K.)		Emoculture (inoc. di 80.000.000 B. K.)		Sopravvivenza in giorni
24 h	48 h	24 h	48 h	
(4)	(4)	(4)	(4)	
140	152			8
277	115			9
rum.	81			16
61	42			14
....		num.	126	8
....		num.	154	20
....		97	90	69
numss.	numss.			14
....				
....		num.	158	21

Valore medio: 20 circa

CAVIE IN TRATTAMENTO	Risultati intradermo alla tubercolina (1)					Risultati della reazione di fiss. del compl. (1)			
	21 g.	48 g.	65 g.	90 g.	115 g.	21 g.	45 g.	65 g.	115 g.
Gruppo C:						(2)	(2)	(2)	(5)
N. 21.						---	± --- (1 : 3)	---	---
» 22.						---	---	---	---
» 23.						---	---	---	---
» 24.						---	+ --- (1 : 6)	---	---
» 25.						---	---	---	---
» 26.						---	---	---	---
» 27.						---	---	± --- (1 : 6)	---
» 28.						---	---	---	---
» 29.						---	---	---	---
» 30.						---	---	---	---
Gruppo D:									
N. 31.						---	---	---	---
» 32.						---	---	---	---
» 33.						---	---	---	---
» 34.						---	---	+ --- (1 : 5)	---
» 35.						---	---	---	---
» 36.						---	---	---	---
» 37.						---	---	---	---
» 40.						---	---	---	---

*SULLA BACIL-
LEMLA TUBER-
COLARE ECC.*

Emoculture (inoc. di 40.000.000 B. K.)		Emoculture (inoc. di 80.000.000 B. K.)		Sopravvivenza in giorni
24 h	48 h	25 h	48 h	
(4)	(4)	(4)	(4)	
....				
....				
num.	num.			9
....				
num.	num.			50
num.	153			14
....		154	120	22
....		num.	85	20
....		117	148	10
....		num.	num.	42
Valore medio: 24 circa				
120	139			11
52	61			13
num.	num.			8
....		num.	124	10
....		85	139	35
....		num.	142	35
....				
....		num.	16	21
Valore medio: 19				

Le principali deduzioni che si possono trarre da queste prove sono le seguenti.

1. — Gli animali trattati con piccole dosi di *a. i.* ripetute a breve intervallo di tempo hanno reagito alla tubercolina e hanno presentato in circolo anticorpi fissanti il complemento più tardivamente che gli animali vaccinati ad intervalli di tempo più distanziati; alla fine del trattamento, però, i valori si sono mostrati all'incirca equivalenti.
2. — La persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa si è mostrata decisamente diversa nei due gruppi di animali vaccinati. Negli animali trattati con inoculazioni più distanziate, la concentrazione di B. di Koch nel sangue è stata molto inferiore che nell'altro gruppo di animali e nel gruppo dei controlli e, inoltre, i B. di Koch sono rapidamente diminuiti in circolo.
3. — La sopravvivenza all'inoculazione infettante è stata parimenti molto superiore nel primo gruppo che nel secondo e molto superiore che nei controlli.
4. — Il gruppo degli animali vaccinati con piccole dosi di vaccino ripetute a giorni alterni ha mostrato una sopravvivenza e una persistenza in circolo dei B. di Koch all'incirca eguale al gruppo di controllo. Questo comportamento è oltremodo curioso e torna a conferma delle osservazioni di Mazzetti e Vigni. Non si può perciò dire dimostrata la comparsa di uno stato di iperrecettività ma piuttosto è mancato ogni aumento di resistenza all'inoculazione infettante, nonostante una marcata reattività alla tubercolina e una notevole concentrazione nel sangue di anticorpi fissanti il complemento.

* * *

Le sistematiche ricerche ora riferite sono state fatte conoscere non solo per mettere in evidenza alcuni aspetti del meccanismo di difesa organico verso il B. di Koch, ma anche per indicare come nel controllo dei tentativi sperimentali di vaccinazione contro la tubercolosi, due fattori devono specialmente essere presi in considerazione: la sopravvivenza degli animali vaccinati all'inoculazione di prova e lo studio della persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per

via endovenosa; in ambedue i casi sempre in rapporto al comportamento di animali normali presi per controllo. I due metodi di controllo si rendono utili e si integrano a vicenda; si è visto anche come in alcuni casi la valutazione della resistenza degli animali vaccinati, tenendo conto della loro sopravvivenza all'inoculazione di prova, si presti meglio dello studio della resistenza in circolo dei B. di Koch. In verità, quest'ultima prova non è scevra di difficoltà tecniche e vi è una non lieve difficoltà a trovare la dose giusta dei bacilli da inoculare per via endovenosa; infatti, una dose elevata è utile per dar luogo ad emocolture dimostrative, ma porta troppo rapidamente a morte gli animali e rende poco evidenti le differenze nella capacità di sopravvivenza fra animali vaccinati e animali normali; all'inverso, una dose meno elevata di B. di Koch, mentre si presta meglio a mettere in evidenza la sopravvivenza degli animali, è da scartarsi per lo studio della persistenza in circolo dei bacilli, data la rapidità con la quale un gran numero di essi scompare dal circolo anche negli animali normali. Sicchè, in definitiva, la tecnica giusta è resa di difficile riuscita per la scelta di una dose opportuna per studiare contemporaneamente ambedue i fenomeni. Vi sono, inoltre, da tenere presenti alcuni fattori collaterali. L'inoculazione di una stessa dose bacillare, anche elevata, in animali normali, mentre dà luogo nella maggior parte di essi ad emocolture analoghe per concentrazione in B. di Koch e per persistenza nel tempo, in altri, che tuttavia sono in numero minore e talvolta un'eccezione, dà luogo ad emocolture scarse o anche negative. Questo fatto è apparso talvolta legato ad uno speciale stato di resistenza, tant'è vero che questi animali sono sopravvissuti più a lungo degli altri, talvolta è apparso di difficile interpretazione, data l'assenza di ogni riferimento ad una qualsiasi condizione organica.

Altro problema è quello legato alla necessità di avere a disposizione sospensioni omogenee di B. di Koch, per l'inoculazione endovenosa. La difficoltà di una adatta tecnica per ottenere un tal genere di sospensioni è nota a tutti coloro che lavorano sul B. di Koch. Esistono ceppi cosiddetti omogenei, quelli per esempio descritti da Arloing e Courmont (1898) da Petagnani (1934) ecc. . . . ma si tratta di stipiti lisci di B. di Koch, cioè variati, generalmente poco virulenti e che, perciò, non si adattano a tal genere di prove. Con gli

stipiti tubercolari tipici e virulenti è molto difficile ottenere sospensioni omogenee, quando si voglia tener conto del peso bacillare; in caso contrario, la tecnica non è difficile; basta filtrare la sospensione per carta, ma in tal caso il controllo della concentrazione bacillare resta affidato al procedimento culturale.

Mazzetti, in collaborazione con Vigni, ha eseguito numerose prove per determinare con precisione una tecnica esatta, fondandosi sui seguenti concetti.

1. - Allestimento di una sospensione bacillare che sia capace di dare luogo, inoculata per via endovenosa alle cavie, ad emocolture dimostrative ma, nello stesso tempo, che non porti troppo rapidamente a morte gli animali e che permetta, perciò, di mettere in evidenza le differenze di resistenza da animale ad animale attraverso la differente capacità di sopravvivenza all'inoculazione infettante.

2. - Allestimento di una sospensione bacillare omogenea nella quale i corpi bacillari siano isolati il più possibile, cioè omogeneamente dispersi nel mestruo di sospensione.

Si deve tuttavia confessare che i tentativi non hanno portato al risultato sperato, specialmente perchè è apparso impossibile ottenere una sospensione omogenea rispettando il peso bacillare ed è stato preferito perciò filtrare opportunamente la sospensione e controllare culturalmente il numero dei B. di Koch viventi.

Gli esperimenti sono stati eseguiti adottando i più svariati procedimenti: uso di quantità diverse di patina bacillare, agitazione, filtrazione per cotone, filtrazione per carta. Le sospensioni così ottenute, controllate nella loro concentrazione in B. di Koch o con procedimento opacimetrico o con procedimento culturale, sono state inoculate per via endovenosa a numerosi lotti di cavie normali; gli animali sono stati salassati dal cuore destro o dalla giugulare a 24 e 48 ore dalla inoculazione e col sangue allestite emocolture su terreno di Petraghiani per accertare il numero medio di bacilli circolanti nel sangue dopo questi tempi.

Non vengono riportati qui, per brevità, i risultati di ogni singola prova, ma si crede opportuno, invece, portare a conoscenza le principali osservazioni sortite da queste ricerche.

Si deve sottolineare, in primo luogo, la necessità di lavorare con stipiti ben conosciuti nella loro virulenza e che non siano in preda

a fenomeni di variazioni. È stato osservato, infatti, che questi possono insorgere bruscamente negli stipiti tubercolari con comparsa di colonie a carattere liscio più o meno evidente; a tale fenomeno si accompagna sempre una notevole perdita del grado di virulenza. I due Autori si sono trovati, in una prova, ad avere risultati quasi completamente negativi nelle emoculture; ricercando la ragione di questo inatteso risultato, essi notarono che le emoculture avevano dato luogo a sviluppo di colonie in maggior parte con caratteri lisci; anche le caviglie inoculate ebbero tempi di sopravvivenza molto irregolari ed un certo numero di esse sopravvisse.

Nel proseguo delle ricerche è stato osservato che il fenomeno si ripeteva, in maniera più o meno evidente, specialmente quando la sospensione era stata sottoposta all'agitazione. Per ottenere una sospensione omogenea, è stato adottato, infatti, in alcune prove, questo procedimento: la patina bacillare, dopo spappolamento in mortaio di agata, veniva ripresa con soluzione di NaCl al 0,85 % o con liquido di Sauton e poi messa in bottiglia sterile con perline di vetro e sottoposta all'agitazione per 15'-20' in agitatore meccanico. Alla fine del trattamento, si notò nella bottiglia un'abbondante schiuma e al controllo microscopico i bacilli apparvero ben isolati, ma molti di essi avevano perduto l'acido-resistenza; al controllo culturale le sospensioni così allestite dettero sviluppo ad un numero di colonie molto superiore a quello di sospensioni di eguale peso bacillare, ma non agitate. Inoculate per via endovenosa agli animali, però, non si notarono differenze notevoli nel numero dei bacilli circolanti a 24 e 48 ore, ma le caviglie inoculate con le sospensioni sottoposte all'agitazione sopravvissero più lungamente di quelle inoculate con le sospensioni non agitate.

Sembra perciò che l'agitazione, pur dando luogo a sospensioni bacillari omogenee, come è confermato dai reperti culturali, porti un danno non indifferente alla vitalità dei bacilli e renda almeno una parte di essi più sensibile ai meccanismi difensivi dell'organismo, osservazione tratta specialmente dai risultati delle prove biologiche. In seguito a queste considerazioni, l'allestimento delle sospensioni mediante l'agitazione è stato abbandonato.

L'inoculazione della sospensione nella vena giugulare porta la massa bacillare a contatto del filtro polmonare e la sua consecua-

tiva diffusione negli altri distretti dell'organismo è, almeno in parte, in ragione anche della sua omogeneità. Se la sospensione contiene grossi ammassi bacillari, i fenomeni embolici si sommano a quelli puramente infiammatori nel parenchima polmonare e si possono avere rapidissime morti degli animali e soprattutto tempi di sopravvivenza molto differenti da animale ad animale.

Si è creduto opportuno di non eseguire i prelievi di sangue per le emocolture dalla giugulare, dato che essa raccoglie il sangue solo di alcuni distretti dell'organismo, ma di rivolgersi al sangue del cuore destro. Sono stati eseguiti anche esperimenti per conoscere se vi fossero differenze di concentrazione bacillare fra sangue venoso del cuore destro e sangue arterioso del cuore sinistro; benchè i risultati non abbiano fatto vedere differenze degne di rilievo, si consiglia tuttavia di eseguire i prelevamenti dal cuore destro, dato che quello sinistro raccoglie solo il sangue del territorio polmonare.

In base a queste considerazioni, Mazzetti consiglia di seguire la tecnica indicata da Petraghani, sia per la preparazione delle sospensioni di B. di Koch, sia per la cultura del b. di Koch dal sangue.

Da una cultura di B. di Koch di 15 giorni di sviluppo su terreno di Sauton, si preleva una certa quantità di velo bacillare che viene liberato dal liquido di imbibizione premendolo tra fogli di carta bibula sterile; una certa quantità di questo materiale bacillare viene portato su un vetrino coprioggetto sterile posto su un vetrino da orologio pure sterile e ambedue assieme previamente tarati alla bilancia di precisione; si pesa ora il tutto alla bilancia di precisione e si porta il materiale bacillare in un mortaietto di agata sterile, si spappola accuratamente e si aggiunge goccia a goccia soluzione di NaCl al 0,85 % sterile fino a pochi cm^3 (4-5).

La sospensione così ottenuta non è omogenea, ma tiene in sospensione grossi frustoli però di consistenza lassa e facilmente emulsionabili; la sospensione viene ora portata in provettone sterile in cui si trovano granuli di quarzo; con altri pochi cm^3 di soluzione fisiologica sterile si lava il mortaio di agata per 1-2 volte e si aggiungono nel provettone alla sospensione. Il provettone viene ora chiuso alla fiamma, lasciato raffreddare, poi agitato per qualche minuto fino a sospensione omogenea e infine aperto per portare la sospensione in un palloncino sterile; lavando i granuli di quarzo

per 2-3 volte, si aggiungono nel palloncino tanti cm^3 di soluzione fisiologica sterile in modo da ottenere una sospensione che contenga per ogni cm^3 , mmgr. 1 di materiale bacillare. La sospensione così ottenuta viene ora sottoposta alla filtrazione. A seconda se si vuole ottenere una sospensione più o meno concentrata, si seguono a questo punto due procedimenti diversi di filtrazione.

Per ottenere una sospensione concentrata, la sospensione deve essere filtrata attraverso cotone. A questo scopo, in un imbuto di vetro, si pone un supporto costituito da un frammento di reticella metallica a maglie molto fitte e su di esso si depongono 10 piccole falde di cotone idrofilo di buona qualità pressate fortemente l'una sull'altra, inumidendole volta per volta con soluzione fisiologica, in modo da costituire un buon materasso filtrante (vedi fig. 2); il filtro viene sterilizzato in autoclave. La sospensione bacillare viene filtrata in recipiente sterile e contenente palline di vetro, versandola accuratamente nel centro del filtro così allestito. Con questo procedimento si ottiene una sospensione abbastanza omogenea, ma nella quale si possono notare ancora numerosi piccoli ammassi bacillari. Nelle fig. 3 e 4 è mostrato come appare al microscopio la sospensione avanti e dopo la filtrazione per cotone.

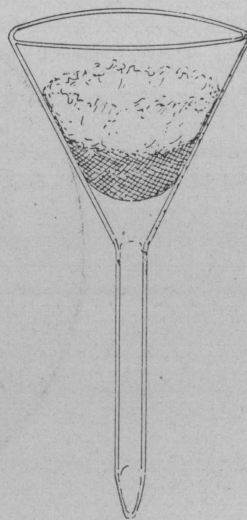


Fig. 2.

Per ottenere una sospensione meno concentrata, la filtrazione viene eseguita per filtro di carta piuttosto porosa. Per ottenere risultati relativamente costanti, si consiglia di usare il filtro *Schleicher e Schüll, Selecta* n. 589¹.

Per il controllo culturale vengono eseguite con la sospensione bacillare diluizioni in soluzione fisiologica sterile da $1:10^{-1}$ fino a $1:10^{-6}$ e delle diluizioni $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$ e $1:10^{-6}$ seminati cc. 0,5 in due provettoni di terreno di Petraghani; a sviluppo avvenuto, si contano le colonie e si detrae il contenuto bacillare per cc. di sospensione. È evidente che più la sospensione è omogenea, maggiormente il controllo culturale sarà esatto, cioè vi sarà maggiore probabilità che ogni colonia derivi da una singola unità bacillare.

Con i procedimenti ora esposti ogni riferimento al peso è perduto, ma, in ogni modo, è opportuno tenere costante la pesata di mmgr. 1 di velo bacillare per cc. di sospensione e seguire sempre la stessa tecnica nelle varie prove per ottenere risultati comparativi.

La sospensione, allestita nel modo suddetto e filtrata per cotone, ha mostrato nelle presenti ricerche, un contenuto da circa 5.000.000

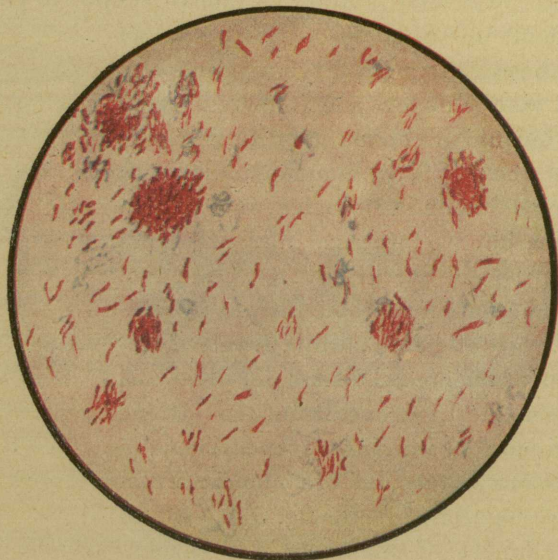


Fig. 3. — Sospensione di B. di Koch prima della filtrazione per cotone.

a circa 20.000.000 di bacilli coltivabili per cc.; la sospensione filtrata per carta, da circa 100.000 a circa 1.000.000. Si deve osservare però che il contenuto bacillare varia notevolmente a seconda della accuratezza con la quale il materiale bacillare è stato spappolato in mortaio; specialmente la regolare filtrazione per carta viene notevolmente impedita da una imperfetta omogeneizzazione.

Per ottenere emocolture dimostrative, è preferibile l'allestimento della sospensione mediante filtrazione per carta; tuttavia è notevole il fatto che sospensioni a diverso contenuto bacillare, ab-

biano dato spesso emoculture con reperti analoghi; il numero di colonie ha variato da 10 a 200 e più per cc. di sangue con notevoli differenze da animale ad animale, il che porta ad indicare la necessità di sperimentare contemporaneamente su numerosi animali per trarre medie sulle quali potere contare per mettere in evidenza differenze, secondo l'intendimento dello sperimentatore. No-

*SULLA BACIL-
LEMLIA TUBER-
COLARE ECC.*

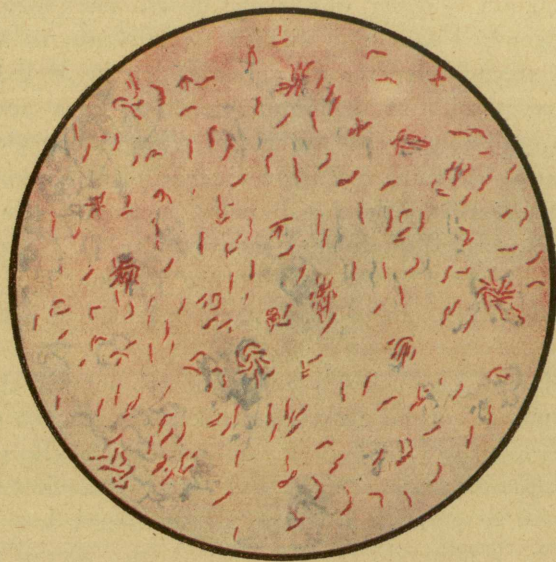


Fig. 4. - Sospensione di B. di Koch dopo la filtrazione per cotone.

tevoli differenze si osservano anche nella sopravvivenza degli animali, sempre maggiore, tuttavia, per quelli inoculati con la sospensione filtrata per carta, cioè meno concentrata, sopravvivenza che è in rapporto non solo con la dose bacillare, ma anche con la virulenza dello stipite adoperato. La dose utile per ottenere, nel contempo, emoculture dimostrative e per la migliore osservazione della capacità di sopravvivenza degli animali, sembra essere di 100.000-400.000 B. di Koch di uno stipite virulento.

È ovvio dire che, seguendo il procedimento della filtrazione per carta, si può inoculare più cm^3 di sospensione per via endovenosa

e così mettersi in condizioni di sperimentare con dosi bacillari abbastanza elevate.

Per l'inoculazione endovenosa nella cavia si consiglia di ricercare la vena giugulare. Nelle presenti ricerche sono state sempre adoperate cavia non sotto i gr. 300 e non oltre i gr. 500; da esperimenti eseguiti, risulta però che il peso ha scarsa importanza nei reperti emoculturali.

I salassi vengono eseguiti dal cuore destro che sarà facilmente trovato infiggendo l'ago della siringa (sterilizzata in autoclave) a destra dello sterno (rispetto all'animale) fra la 3^a e la 6^a costa. Per eliminare possibilità di inquinamenti, si raso accuratamente il pelo sulla regione toracica anteriore, si bagna con alcool e, dopo qualche minuto, al punto ove deve essere infisso l'ago, si asporta, con istrumenti sterili, un lembo di pelle, mettendo allo scoperto il sottocute attraverso il quale sarà fatto passare l'ago della siringa. I salassi devono esser fatti a 24 e 48 ore dall'inoculazione; salassi oltre tale tempo riescono in gran parte negativi e non hanno più significato.

- Il sangue, appena prelevato, viene seminato in provettoni Petragnani con tappi di cotone nella quantità di cc. 0,1-0,2 e subito lasciato stendere su tutta la superficie del terreno, meglio se mischiandolo con l'acqua di condensazione, ove essa esista. Si è creduto opportuno ridurre la quantità di sangue da seminare, dato che è stato osservato come seminando cc. 0,5-1 di sangue, alcune colonie vengano ostacolate nel loro completo sviluppo dallo spesso strato di sangue coagulato; un effetto, perciò, puramente meccanico, a cui può essere facilmente ovviato seminando quantità di sangue non superiori a cc. 0,3 per provettone. ;

I provettoni vengono stesi nell'apposito sostegno e lasciati a 37° C. fino a completo asciugamento; a questo punto i tappi di cotone sono sostituiti asetticamente con tappi di sughero sterili e i provettoni di nuovo posti a 37° C. fino a sviluppo che, generalmente, si fa manifesto a 15-20 giorni dalla semina. Saranno eseguite letture periodiche fino a sviluppo completo.

Per rendere più semplice la tecnica e specialmente per tentare di rispettare il peso bacillare, è stato provato ad allestire la sospensione spappolando il materiale bacillare in mortaio di porcellana

insieme ad un frammento di coagulo di sangue sterile, secondo la tecnica di Petragnani, ma, al controllo microscopico, la sospensione è risultata ancora imperfettamente omogenea, si da richiedere la filtrazione.

Anche come mestruo di sospensione, è stato pensato di usare il terreno di Sauton, data la notevole attività battericida della soluzione di NaCl; ma specialmente per questo genere di esperimenti, si è creduto opportuno di non inoculare un mestruo così complesso come il terreno di Sauton, i cui costituenti potevano interferire nei risultati delle esperienze.

Certo è però che la tecnica esposta non è scevra di difficoltà e i risultati possono risultare soddisfacenti solo quando l'operatore abbia acquistata una certa pratica nelle varie manualità.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.

In questa nota sono riportati e commentati i risultati di due serie di ricerche.

La prima è dovuta a Petragnani e ha dimostrato l'infondatezza delle asserzioni di Löwenstein sulla attività inibente o battericida sul B. di Koch del sangue sia di individui e animali normali che tubercolosi o vaccinati contro la tubercolosi; questi risultati hanno portato Petragnani a proporre il sangue, asetticamente prelevato e addizionato ad acqua fisiologica o liquido Sauton, come mezzo veramente utile, ed anche molto semplice, per la coltura dei B. di Koch che vi venissero seminati in piccolissimo numero e a vitalità ridotta, come anche per le ricerche della bacillemia per l'arricchimento di rari B. di Koch presenti nel sangue. In numerose prove eseguite applicando questo metodo, gli allievi di Petragnani poterono dimostrare che con esso si quadruplicano in media, i risultati positivi conseguibili con la semina diretta. Lungi all'ostacolare lo sviluppo dei B. di Koch, il sangue dà incitamento allo sviluppo di questo batterio. Con questa tecnica è stato dimostrato che la bacillemia nell'uomo e negli animali da esperimento è, nello stadio evolutivo dell'infezione, di scarsa entità e irregolare, mentre nel periodo agonico o preagonico esiste una vera *pousseé* bacillemica con reperto di numerosi B. di Koch nel sangue del cuore destro.

Questo reperto è in diretto rapporto con la virulenza dello stipite adoperato. Animali inoculati con stipiti a scarsa virulenza presentano, alla morte, punti o scarsi di Koch nel sangue del cuore destro.

Basandosi su queste osservazioni, Mazzetti e Collaboratori hanno svolto una ulteriore serie di ricerche per studiare il rapporto tra persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa e capacità di resistenza degli animali, secondo una ipotesi di lavoro per la quale l'inoculazione di uno stipite attenuato in animali normali avrebbe dovuto comportarsi, riguardo alla persistenza in circolo, come uno stipite virulento inoculato in animali potenziati nei loro potere difensivi da un trattamento vaccinnale.

Le esperienze, eseguite con tecnica adatta, hanno confortato pienamente la detta ipotesi ed hanno, inoltre, permesso di studiare i rapporti tra persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa e i poteri difensivi dell'organismo esplicitandosi, specialmente, con la capacità di sopravvivenza all'inoculazione infettante; è stato così determinato che la persistenza dei B. di Koch in circolo è tanto minore quanto più alto è lo stato di resistenza dell'organismo.

Questo metodo di analisi dell'efficienza dello stato difensivo organico si è mostrato adatto al controllo dei processi di vaccinazione contro la tubercolosi negli animali da esperimento ed ha portato Mazzetti ad elaborare una tecnica adatta che è stata esposta dettagliatamente nella presente nota e che è basata sulla determinazione della persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa e della capacità di sopravvivenza degli animali alla inoculazione infettante.

Nel corso di ricerche collaterali, istituite per determinare i fattori che influiscono sulla più o meno rapida scomparsa dei B. di Koch dal sangue a vario tempo dalla inoculazione endovenosa, è stato messo in evidenza come gli animali inoculati con B. di Koch, tenuti a contatto con sieri di animali vaccinati contro la tubercolosi, sopravvivano più lungamente degli animali inoculati con eguali dosi di B. di Koch trattati con sieri normali; analoga attività è stata potuta determinare nei sieri di individui tubercolosi. Nonostante che lo studio della persistenza in circolo dei B. di Koch

non abbia mostrato differenze tra animali inoculati con B. di Koch trattati con sieri di animali vaccinati o di individui tubercolosi e con sieri normali, tuttavia sembra lecito affermare che in questi sieri esiste un fattore umorale attivo sui B. di Koch; di che natura e quale sia la precisa azione di questo fattore, è difficile dire; non si tratta di un anticorpo batteriolitico, data come dimostrata l'assenza di una simile attività da parte del sangue di individui o animali normali o tubercolosi o vaccinati contro la tubercolosi; anche la enzimoreazione ha portato a risultati del tutto negativi, mentre, come è noto, gli anticorpi fissanti il complemento, presenti regolarmente in questi sieri, hanno un significato tuttora dubbio. In via di esclusione, è probabile trattarsi di anticorpi sensibilizzanti i B. di Koch ai processi di fagocitosi; ma tale affermazione non trova a suo suffragio prove sperimentali dirette, almeno per quanto riguarda gli elementi bianchi del sangue, per i quali la ricerca dell'indice opsonico ha dato risultati poco dimostrativi. D'altra parte è da notare che nelle numerose prove eseguite da Petraghiani e collaboratori, mettendo a contatto B. di Koch e sangue di animali tubercolosi e vaccinati contro la tubercolosi, solo eccezionalmente sono stati osservati al microscopio B. di Koch fagocitati dai globuli bianchi del sangue. Non è da escludere che i processi di fagocitosi si avverino specialmente a livello dei tessuti ma nessuna dimostrazione abbiamo per potere confermare tale ipotesi; tuttavia essa può essere ritenuta come probabile, dato il significato che viene attribuito ai processi difensivi cellulari nella immunità tubercolare.

BIBLIOGRAFIA

- ARLOING e COURMONT, « C. r. Acc. Sc. », 1898, 126, 1938.
 BACIALLI, « Rivista It. Ginec. », 1920, 4, 539.
 BANAUDI e CUNIBERTI, « Giorn. Batt. Imm. », 1936, 16, 564.
 BARELLI, « Boll. Ist. Sier. Milanese », 1931, 10, 251.
 BARSINI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1934, S. XI, 2, 147; « Lo Sperimentale », 1935, 89, 365.
 BINGOLD, « Beitr. Klin. Tub. », 1928, 68, 754 (citato da Daddi).
 CARINCI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena e Studi Fac. Med. Senese », 1957, 5, 80.
 CAVALIARI e GOZZINI, « Lo Sperimentale », 1938, 92, 95.
 CITERNI, « Lotta contro la tubercolosi », 1937, 8, 651.

**SULLA BACIL-
LEMIA TUBER-
COLARE ECC.**

- CORPER, DAMEROW e COHN, « Am. Rev. Tub. », 1936, 33, 679, 694, 701, 709, 721.
DADDI, « Lotta contro la tubercolosi », 1935, 6, 921, 1029.
DAPRÀ, « Giorn. Batt. Immunol. », 1936, 16, 556.
DE SANTIS, « Boll. Ist. Sier. Milanese », 1935, 14, 60.
GALTON, « Am. Journ. Hyg. », 1937, 26, 259.
KIRCHNER e LI, « Beitr. Klin. Tub. », 1932, 80, n. 4 (citato da Daddi).
KRAUSE, « Am. Rev. Tub. », 1934, 9, 83.
KRAUSE e PETERS, « Am. Rev. Tub. », 1920, 4, 551.
KRAUSE e WILLIS, « Bull. Un. Int. Tub. », 1934, 1, 3.
MAZZETTI, « Atti VI Congr. Naz. contro la tubercolosi », Tripoli, 1937; « Lo Sperimentale », 1938, 92, 116.
MAZZETTI e BUONOMINI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1935, S. XI, 3, 94.
MAZZETTI e DAVOLI, « Lo Sperimentale », 1940, 95, 331.
MAZZETTI e VIGNI, « Lo Sperimentale », 1940, 95, 545.
MISHULOW, SINGER, SIEGEL, MELMAN e ROMANO, « J. Lab. a. Med. », 1935, 20, 106.
NINNI e BRETEY, « C. r. Soc. Biol. », 1933, 113, 572, 694, 986, 1135.
PETRAGNANI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1926, S. X, 1, n. 4-5-6; idem, 1934, S. XI, 2, 108, 231; idem, 1935, S. XI, 3, 8.
PETRAGNANI e BUONOMINI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1935, S. XI, 3, 89, 92, 169.
PETRAGNANI e CITERNI, « Lotta contro la tubercolosi », 1937, 8, 305.
PETRAGNANI, DI MAURO e GENTILE, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1934, S. XI, 2, 144.
PETRAGNANI e MAZZETTI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1933, S. XI, 1, 201; idem, 1934, S. XI, 2, 24, 114, 172; idem, 1935, S. XI, 3, 26; « Boll. Sez. It. Soc. Int. Micr. », 1935, 7, 23; « Atti V Congr. Naz. contro la tubercolosi », Roma, 1935; « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena », 1935, S. XI, 3, 204.
PETRAGNANI, MAZZETTI e MARIANI, « Atti R. Acc. Fisiocr. in Siena e Studi Fac. Med. Senese », 1934, 2, 615.
PROCA, « C. r. Soc. Biol. », 1933, 114, 280, 1203.
PUCCIONI, « Lo Sperimentale », 1942, 96, 175.
RONDONI, « Lo Sperimentale », 1924, 78, 509; « Boll. Ist. Sier. Milanese », 1935, 14, 386.
SAENZ e COSTIL, « C. r. Soc. Biol. », 1933, 113, 1135.
WILLIS, « Am. Rev. Tub. », 1925, 11, 427.
WRIGHT, « J. Path. Bact. », 1927, 30, 185.

RIASSUNTO

L'A., in una nota riassuntiva, espone le ricerche della Scuola di Petragrani sulla bacilleemia tubercolare e sull'azione del sangue sul B. di Koch. Da queste ricerche risulta in modo evidente che il sangue di individui o animali normali o tubercolosi o vaccinati contro la tubercolosi non mostra nessuna attività inibente o battericida verso il B. di Koch; anzi Petragrani ha reso noto un metodo per la cultura del B. di Koch dal sangue, fondato sulla semina diretta del sangue sul suo terreno e un metodo per l'arricchimento del B. di Koch nel sangue stesso dell'animale o individuo tubercoloso; risulta,

inoltre, che la bacillemia è di scarsa entità e irregolare durante lo studio evolutivo dell'infezione; nel periodo preagonico o agonico si ha invece una *possée* bacillemica che è tanto più notevole quanto più alta è la virulenza dello stipite infettante.

L'A. e collaboratori, basandosi su queste osservazioni e seguendo il metodo di Petraggiani per la cultura del B. di Koch dal sangue, hanno studiato, sotto vari aspetti, il significato della persistenza in circolo dei B. di Koch inoculati per via endovenosa in animali normali e vaccinati contro la tubercolosi.

Con queste ricerche viene dimostrato come l'inoculazione endovenosa dei B. di Koch e la loro ricerca nel sangue a 24 e 48 ore, sia un metodo adatto per valutare la capacità di resistenza acquisita dall'organismo animale mediante un processo di vaccinazione, perchè vi è un rapporto fra rapidità della scomparsa dei B. di Koch dal circolo e la capacità di sopravvivenza degli animali all'inoculazione di prova; più l'animale si mostra resistente all'infezione e più rapidamente scompaiono dal circolo i B. di Koch inoculati per via endovenosa.

In ricerche collaterali, istituite per studiare quali siano i fattori che determinano la rapida scomparsa dei B. di Koch dal sangue degli animali vaccinati contro la tubercolosi, è stato messo in evidenza come nei sieri di animali vaccinati contro la tubercolosi e di individui tubercolosi, sia presente un fattore attivo sui B. di Koch; gli animali inoculati con B. di Koch, tenuti a contatto con questi sieri, sopravvivono più lungamente degli animali inoculati con B. di Koch trattati con sieri di animali e individui normali. Ritenuto come dimostrato che il sangue non possieda alcuna attività battericida sul B. di Koch, è ammissibile che questo fattore sia da identificarsi in anticorpi sensibilizzanti i B. di Koch ai processi di fagocitosi che tanta parte hanno nel meccanismo di difesa organica verso l'infezione tubercolare. Questa affermazione non è, però, suffragata da prove sperimentali dirette, in quanto lo studio della persistenza in circolo dei B. di Koch così trattati e lo studio dell'indice opsonico hanno portato a risultati dubbi o negativi.

97932

Esemplare non per la distribuzione
per la distribuzione degli enti di
legge.

349938

