

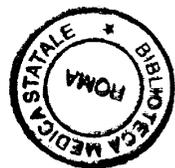
MoB73/

18

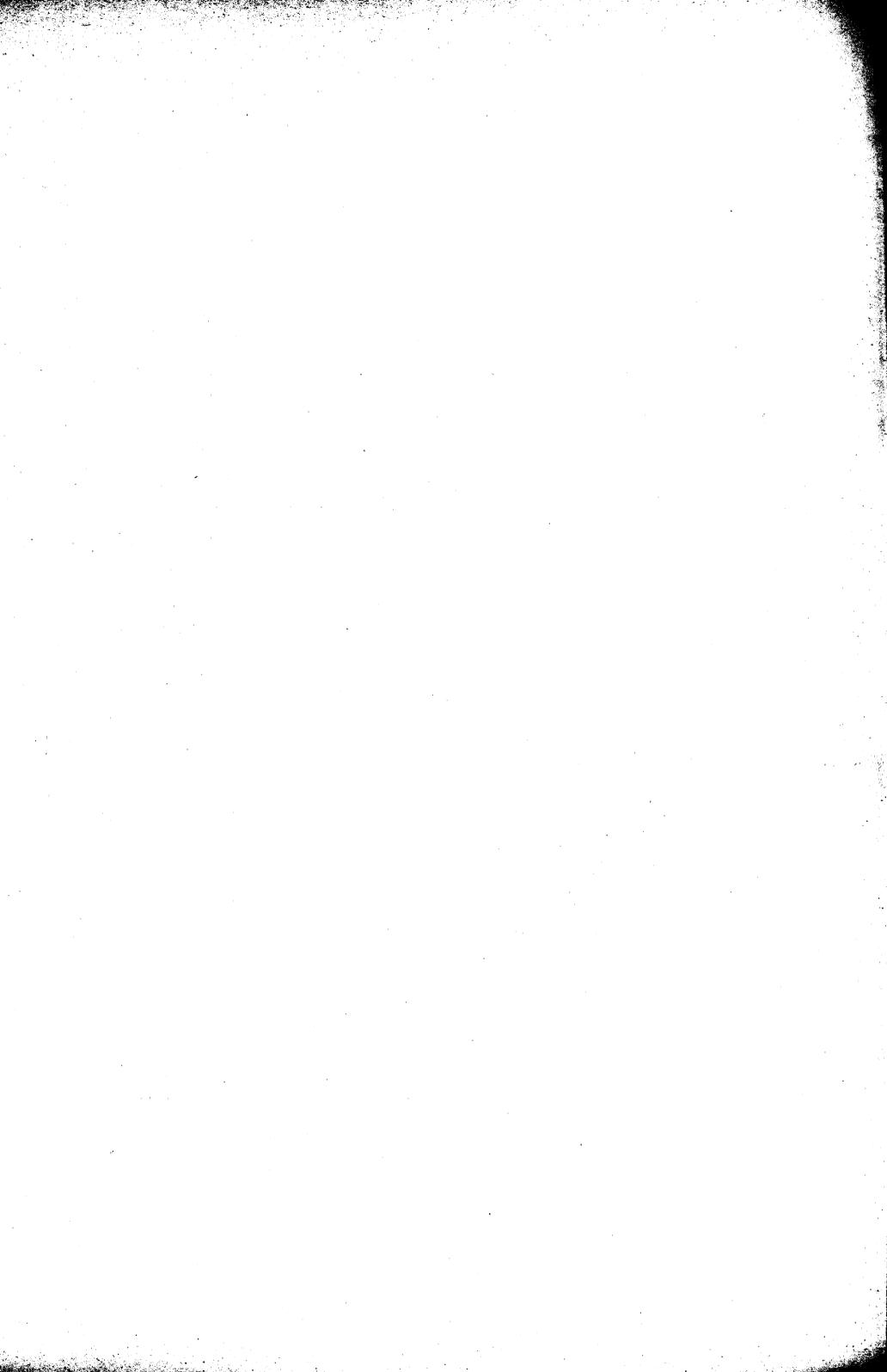
Prof. TULLIO DE SANCTIS-MONALDI
Dott. ROBERTO CANGANELLA

USO DI TERRENI ALLA NOVOCAINA E
ALL'ACIDO PARA-AMINOBENZOICO PER
LA CULTURA DI LIQUIDI PATOLOGICI
DURANTE TRATTAMENTO SULFAMIDICO.

Estratto dal BOLLETTINO E ATTI
DELLA R. ACCADEMIA MEDICA DI ROMA
Anno LXVIII (1942-XX) - Fasc. 6



DITTA TIPOGRAFIA CUGGIANI
ROMA - VIA DELLA PACE, 35
1942-XX



CLINICA PEDIATRICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
Direttore: SEN. PROF. LUIGI SPOLVERINI

PROF. TULLIO DE SANCTIS-MONALDI
DOTT. ROBERTO CANGANELLA

Uso di terreni alla novocaina e all'acido para-amino-
benzoico per la cultura di liquidi patologici durante
trattamento sulfamidico.

*Comunicazione alla Seduta del 19 giugno 1942-XX
della Reale Accademia Medica di Roma*



Le ricerche di Woods e di numerosi altri studiosi, partite da una ipotesi generale di Fildes secondo cui le sostanze inibenti lo sviluppo batterico agirebbero per fenomeno d'interferenza con metaboliti essenziali alla vita dei germi, hanno messo in evidenza una serie di sostanze che presentano uno specifico antagonismo con i sulfamidici in quanto ne annullano il potere batteriostatico. L'acido p-aminobenzoico, la novocaina, l'ortoformio, alcuni estratti batterici e cellulari hanno dimostrato di esercitare *in vitro* ed *in vivo* questa azione antagonista.

Quale sia il meccanismo con cui tali sostanze agiscono non è ancora ben chiaro: le ricerche fino ad ora compiute fanno pensare che si tratti di una competizione tra il sulfamidico e l'acido p-aminobenzoico (di cui la novocaina e l'ortoformio sono derivati e che è stato riconosciuto il principio attivo dei suddetti estratti) per servire di substrato ad un enzima ovvero per formare un enzima che avrebbe importanza essenziale nella catena di sintesi legate allo sviluppo e specialmente alla riproduzione dei germi. È accertato, comunque, che non si ha a che fare con una pura e semplice neutralizzazione chimica. Le suddette sostanze sono capaci di annullare *in vitro* l'azione batteriostatica dei sulfamidici perfino nella proporzione ponderale di uno a 30.000; d'altra parte, quando vengano aggiunte ai comuni terreni nutritivi, esse non modificano sensibilmente il normale sviluppo dei germi se non a concentrazioni piuttosto elevate.

Nello scorso anno avevamo avuto occasione di osservare alcuni casi di meningite purulenta nei quali nè l'accurata ricerca batterioscopica nè l'esame culturale su terreni albuminati e al sangue ci avevano permesso di stabilire il fattore etiologico; oppure casi nei quali l'indagine batterioscopica aveva rivelato la presenza di germi, per lo più profondamente alterati nella loro morfologia e nelle proprietà tintoriali, ma in cui la cultura era risultata ripetutamente sterile. L'inchiesta anamnestica ci rivelò che a questi pazienti, sin dai primi giorni di malattia e quindi anterior-

mente all'ingresso in Clinica, erano stati somministrati dal medico curante dei sulfamidici sia pure in dosi terapeuticamente insufficienti. Pensammo perciò che la quantità di sulfamide riversatasi nel liquor avesse ridotto notevolmente il numero dei germi (i quali talvolta, specie se trattasi del meningococco, possono essere molto rari indipendentemente dall'azione dei sulfamidici) e che nelle culture essa avesse proseguito ad esercitare la sua azione batteriostatica impedendo così lo sviluppo dei pochi organismi ancora viventi. Volemmo vedere allora se, aggiungendo al terreno nutritivo una delle sostanze dotate di antagonismo verso i sulfamidici, si potevano ottenere culture positive dal liquor e dagli altri liquidi patologici dei malati che erano già in trattamento con i suddetti chemioterapici. E ciò allo scopo non solo di poter stabilire la diagnosi microbica nei casi ad esame batterioscopico negativo, ma anche di accertare, ai fini della prognosi e dell'indirizzo terapeutico, se i germi visibili all'esame diretto e non coltivabili sui terreni ordinari, erano da ritenersi morti o soltanto inibiti temporaneamente dall'azione del farmaco.

Come sostanza antisulfamidica ci servimmo in un primo tempo, non avendo avuto la possibilità di procurarci l'acido p-aminobenzoico, della novocaina. Istituimmo allora delle ricerche comparative. Ogni campione di liquor o di altro materiale, inviato in laboratorio per l'esame, e proveniente da paziente in cui era in corso terapia sulfamidica, veniva diviso in due parti: l'una serviva per la ricerca batterioscopica diretta sul sedimento di centrifugazione, mentre il liquido sovrastante era utilizzato per le comuni ricerche chimiche; dell'altra frazione, una identica quantità (all'incirca cc. 0,5) veniva seminata in un tubo di agar-sangue (terreno A.S.) ed in un tubo di agar-sangue addizionato dell'1‰ di novocaina cloridrato (terreno A.S.N.). Questa sostanza era aggiunta all'agar nel momento in cui si mescolava ad esso il sangue. Dal 17 maggio al 16 giugno 1941 studiammo così 15 casi di meningite acuta a liquor torbido (8 pneumococciche e 7 meningococciche), 2 di empiema pleurico pneumococcico ed un flemmone stafilococcico. I risultati di queste ricerche sono riportati nelle tabelle 1 (A) ed 1 (B): nella prima figurano quelli relativi al primo esame praticato sul materiale patologico; nella seconda invece sono riuniti quelli di tutti gli esami complessivamente eseguiti sullo stesso materiale durante la degenza del paziente in clinica.

Abbiamo proceduto alla suddetta distinzione, anzitutto perchè ci interessava mettere in particolare evidenza il risultato del primo esame che è quello dal quale si attende la diagnosi microbica, ed in secondo luogo perchè talvolta questo primo esame venne eseguito su materiale patologico prelevato prima ancora che il paziente fosse sottoposto a terapia sul-

famidica. I campioni invece che servirono per gli esami successivi provenivano tutti da ammalati sotto trattamento.

Diciamo subito che non furono mai notate differenze di sviluppo tra i due terreni quando la sulfamido-terapia non era stata ancora attuata. Quasi sempre sensibili risultarono invece tali differenze nel caso opposto.

In un liquido pleurico ed in un liquor, nei quali l'esame batterioscopico diretto era stato negativo, soltanto la cultura su A.S.N. permise di fare la diagnosi microbica dando luogo a sviluppo di pneumococchi nel primo e di meningococchi nel secondo. Di un pus d'empima pleurico, che all'esame microscopico presentava pneumococchi, la cultura fu positiva solo in A.S.N. Mentre tre liquor, che nel sedimento di centrifugazione aveva mostrato meningococchi e pneumococchi alterati e prevalentemente intraleucocitari, non dettero sviluppo culturale nè sul terreno ordinario al sangue nè sull'altro. In tutti i casi nei quali la cultura riuscì positiva su entrambi i terreni, il numero delle colonie o dei germi sviluppati nell'acqua di condensazione dell'A.S. fu sempre molto più scarso rispetto a quello dei germi nati sull'A.S.N. dove molto spesso le colonie confluivano a formare delle estese e rigogliose patine culturali. Il pus di un flemmone, dopo tre giorni di trattamento con sulfamido-metiliazolo dette sviluppo a 20 colonie di stafilococco aureo sull'A.S. e ad oltre 100 colonie, in alcuni punti confluenti, sull'A.S.N.

Se teniamo poi conto degli esami complessivamente praticati nei 18 casi anzidetti durante tutto il periodo di degenza (v. Tab. 1 (B)), si vede che ben otto volte la cultura riuscì positiva soltanto sul terreno alla novocaina. Il che sta ad indicare come, col progredire della terapia sulfamidica durante il decorso della malattia, l'azione batteriostatica del medicamento si faccia risentire sempre più sui terreni nutritivi ordinari. Il poter coltivare il germe in questi casi è importante, specie se il liquor è già tornato quasi limpido e se la ricerca batterioscopica negativa si accompagna con un notevole miglioramento clinico del paziente; ciò si verifica spesso nelle forme meningococciche quando il numero dei germi nel liquor non è molto grande. In queste circostanze si potrebbe essere tentati, se non a sospendere, per lo meno a ridurre notevolmente le dosi giornaliere del sulfamidico. Nei casi da noi seguiti, grazie al terreno con novocaina ciò si poté fare quando anche la cultura su quest'ultimo era rimasta sterile e già nei giorni precedenti i germi si erano sviluppati nella sola acqua di condensazione. La positività o meno della cultura sul terreno speciale servì di guida alla terapia riducendo o impedendo la possibilità di ricadute.

TABELLA I (A). — Risultato del primo esame.

Materiale esaminato e germe	Numero dei casi	Esame batterioscopico		Cultura in agar-sangue				Cultura in agar-sangue-novocaina					
		positivo	negativo	Apprezzamento macroscopico		Apprezzamento microscopico		Apprezzamento macroscopico		Apprezzamento microscopico			
				cultura positiva	cultura negativa	cultura positiva	cultura negativa	cultura positiva	cultura negativa	cultura positiva	cultura negativa		
<i>Liquor c. r.</i>													
Pneumococco . .	8	7	1	6	2	7	1	6+0	1	6+0	1	6+0	1
Meningococco . .	7	5	2	3	4	4	3	2+0	4	4+0	2	4+0	2
<i>Pus d'empiera</i>													
Pneumococco . .	2	1	1	—	2	—	2	—	2	2	—	2	—
<i>Pus di femmone</i>													
Stafilococco . .	1	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—
TOTALE	18	14	4	10	8	12	6	9+00	7	13+00	3	13+00	3

TABELLA I (B). — Risultato degli esami complessivi.

<i>Liquor c. r.</i>													
Pneumococco . .	11	9	2	6	5	8	3	9+0	1	9+0	1	9+0	1
Meningococco . .	16	8	8	4+0	11	5+0	10	4+0	11	9+0	6	9+0	6
<i>Pus d'empiera</i>													
Pneumococco . .	2	1	1	—	2	—	2	—	2	2	—	2	—
<i>Pus di femmone</i>													
Stafilococco . .	1	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—
TOTALE	30	19	11	11+0	18	14+0	15	14+00	14	21+00	7	21+00	7

Sono indicati col segno 0 i casi in cui la cultura non fu eseguita.

Avevamo esaurito le suddette ricerche con la novocaina quando ci pervenne un lavoro di JANEWAY (pubblicato sul « J.A.M.A. » 116, p. 941, 1941) il quale si era servito dell'acido p-aminobenzoico, aggiunto ai comuni terreni di cultura, per ottenere egualmente sviluppo batterico dai materiali patologici provenienti da pazienti sotto trattamento sulfamidico.

In un secondo gruppo di esami abbiamo allora fatto anche noi uso di questa sostanza aggiungendola all'agar-sangue sotto forma di sale sodico al momento di sciogliere l'agar nel brodo, nella proporzione del 0,05 ‰ (terreno A.S.P.). Dal 22 gennaio al 22 maggio 1942 abbiamo studiato 36 nuovi casi così ripartiti :

Meningiti meningococciche . . .	19
» pneumococciche . . .	7
» da B. di Pfeiffer . . .	4
» streptococciche . . .	2
» stafilococciche . . .	1
Empiemi pleurici pneumococcici . . .	3

In questi casi ben 13 volte (vedi tabella 11 (A)) la diagnosi batteriologica si è potuta fare, al primo esame praticato, grazie al terreno con acido p. a. b. perchè, sia l'esame microscopico del sedimento, che le culture su A.S. semplice non ci avevano svelato l'agente causale della malattia. Questa eventualità non si è presentata, come si potrebbe pensare, soltanto in casi già intensamente assoggettati a sulfamidoterapia e prossimi alla guarigione. Più volte invece è avvenuto il contrario; di particolare interesse a tale proposito, dato l'esito fatale del piccolo paziente, ci sembra la seguente storia: un bambino di 12 mesi riceve, durante tre giorni, sulfamidici in scarsa quantità (gr. 0,50 *pro die*) per una affezione febbrile diagnosticata come faringo-tonsillite. Al quarto giorno è colto da convulsioni e viene condotto in ospedale. La puntura lombare dà esito a liquor fortemente ematico; l'esame del sedimento centrifugato dimostra presenza di numerose emazie, alcuni polinucleati, parecchi linfociti, ma non di germi. Le culture, praticate in un primo momento solo su A.S., risultano sterili dopo 24 ore. Le condizioni del bambino permangono stazionarie per altre 24 ore poi peggiorano; nuova puntura lombare: liquor xantocromico. Nonne + + +. Pandy + + +, Takata a tipo meningitico, albumina 0,90 ‰, Glucosio 0,35 ‰, Cloruri 6,70 ‰. Il sedimento centrifugato dimostra presenza di numerose emazie, rari linfociti, alcuni polinucleati, non germi. La cultura su A.S. dopo 24 ore è sterile, mentre quella su A.S.P. dà luogo

a numerose colonie di pneumococco. Viene subito iniziata intensa terapia con sulfamido-piridina, ma il giorno successivo si ha l'obitus. Di notevole interesse si sono anche dimostrati due dei quattro casi di meningite da B. di Pfeiffer perchè, in seguito alla terapia sulfamido-piridinica ad alte dosi, si sono visti scomparire i germi dal sedimento e rimanere ben presto sterili le culture su A.S.; mentre quelle su A.S.P. risultavano ancora positive. Ciò stava ad indicare che i germi, sia pure notevolmente ridotti di numero, erano semplicemente inibiti ma non distrutti. Ed infatti in uno dei suddetti casi, dopo 5 giorni di terapia intensa e quando anche su A.S.P. la cultura era rimasta sterile, si dovette sospendere per 3 giorni la somministrazione del medicamento: subito le culture tornarono ad essere positive su entrambi i terreni.

In altre due meningiti, una da meningococco ed una da streptococco, l'esame microscopico diretto faceva vedere rari germi intracellulari piuttosto alterati; le culture sono state positive solo sul terreno all'acido p. a. b. Ma in tutti e due i casi sono risultate sterili anche su questo terreno nell'esame immediatamente successivo praticato il giorno seguente. In un'altra meningite meningococcica, anch'essa con esame batterioscopico positivo, le colture sono rimaste invece sterili su entrambi i terreni. La stessa eventualità si era verificata, come si è detto, per tre volte nel precedente gruppo di ricerche condotte con la novocaina. Si potrebbe pensare che la quantità di acido p. a. b. o di novocaina libera nel terreno sia stata insufficiente in tali casi per neutralizzare l'azione batteriostatica della sulfamide presente nel liquor seminato; ciò appare però improbabile per il fatto che minime quantità delle suddette sostanze dimostrano spiccatissimo potere di antagonismo di fronte a concentrazioni molto elevate di sulfamide, come abbiamo potuto accertare anche noi con prove sperimentali. Ora, se si considera che la percentuale di sulfamide presente nel liquor, con le dosi terapeutiche abitualmente usate, si aggira al massimo intorno ai 10-15 mgr. % e che perciò la quantità trasportata nel terreno di cultura non può essere che assai piccola (non superiore ai 0,5-0,7 mgr. %) appare evidente come la quantità di acido p.a.b. o di novocaina aggiunta al terreno stesso sia più che sufficiente per esercitare in pieno la sua azione antagonista. Perciò se i germi non si sviluppano, pure essendo presenti nel sedimento, ciò dimostra che sono definitivamente incapaci di riprodursi. D'altro canto mai si è verificato il caso, anche usando la novocaina, che la cultura sia riuscita positiva in A.S. e negativa in A.S.N. o in A.S.P. Ciò attesta che la concentrazione di novocaina o di acido p.a.b. nel terreno da noi usato non disturbava lo sviluppo batterico.

Considerando gli esami complessivamente praticati negli anzidetti 36 casi durante tutto il decorso della malattia (v. Tab. II (B)), si può constatare come 24 volte la cultura abbia dato luogo a sviluppo soltanto sul terreno all'acido p.a.b., mentre anche l'esame batterioscopico era spesso negativo. Dell'importanza e del significato di questo risultato, per quello che riguarda prognosi ed indirizzo terapeutico, abbiamo già detto.

In tutti i casi poi nei quali si è avuto sviluppo su entrambi i terreni, le culture sull'A.S.P., sia che l'agente etiologico fosse il meningococco o il pneumococco, o il b. di Pfeiffer, o lo streptococco, o lo stafilococco aureo, si sono sempre mostrate molto più abbondanti e rigogliose. Molte volte si è verificato il caso che nel terreno ordinario si sia avuto sviluppo soltanto nell'acqua di condensazione, mentre in quello all'acido p.a.b. si siano potute osservare numerose colonie sulla superficie dell'agar.

Dal punto di vista della morfologia dei germi, abbiamo inoltre osservato che mentre, come è noto, nei comuni terreni il meningococco, il pneumococco, il b. di Pfeiffer e lo stesso streptococco, se provengono da ammalati in trattamento sulfamidico, presentano con estrema facilità forme di degenerazione, sul terreno all'acido p.a.b. (ed anche su quello alla novocaina) hanno una morfologia classica più spiccata e mostrano in maniera ben netta e decisa le proprie caratteristiche tintoriali rispetto alla colorazione del Gram. In un prossimo lavoro ritorneremo con maggiori dettagli su queste particolarità morfologiche.

Riassumendo, e come risulta dalle unite tabelle, possiamo dire che in 48 liquor di meningiti acute ed in altri sei liquidi patologici l'esame microscopico diretto solo in 30 aveva messo in evidenza al primo esame l'agente causale, mentre negli altri 23 casi era risultato negativo (una volta non fu potuto eseguire).

Sui terreni ordinari (A.S.) si ottennero culture macroscopiche in 22 casi e sviluppo microscopico in 32; mentre *sui terreni alla novocaina (A.S.N.) e all'acido p-aminobenzoico (A.S.P.)* risultarono positive 29 culture macroscopicamente e 46 microscopicamente (due volte non fu potuta allestire la cultura su terreno speciale).

Complessivamente furono praticati sui suddetti liquidi patologici 124 esami con i seguenti risultati:

Esame batterioscopico diretto: positivo in 51 casi.

Cultura su A.S.: positiva macroscopicamente in 33 casi e microscopicamente in 51 (4 volte non venne eseguita).

Cultura su A.S.N. o su A.S.P.: positiva macroscopicamente in 49 casi e microscopicamente in 83 (8 volte non venne eseguita).

TABELLA II (A). — Risultato del primo esame.

Materiale esaminato e germe	Numero dei casi	Esame batterioscopico				Cultura in agar-sangue				Cultura in agar-sangue-ac.-p.-aminobenzoico			
		positivo	negativo	Apprezzamento macroscopico		Apprezzamento microscopico		Apprezzamento macroscopico		Apprezzamento microscopico			
				cultura positiva	cultura negativa	cultura positiva	cultura negativa	cultura positiva	cultura negativa	cultura positiva	cultura negativa		
<i>Liquor c. r.</i>													
Pneumococco . .	7	4	3	2	5	5	2	3+0	3	6+0	—	—	
Meningococco .	19	7	12	5	14	9	10	11+0	7	17+0	1	1	
B. di Pfeiffer . .	4	2	2	2	2	3	1	2	2	4	—	—	
Streptococco . .	2	1	1	—	2	—	2	1	1	2	—	—	
Stafilococco . .	1	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—	—	
<i>Liquido pleurico</i>	3	1	2	2	1	2	1	2	1	3	—	—	
TOTALE	36	16	20	12	24	20	16	20+00	14	33+00	1	1	

TABELLA II (B). — Risultato degli esami complessivi.

<i>Liquor c. r.</i>													
Pneumococco . .	13	6	7	4	9	7	6	6+00	5	9+00	2	2	
Meningococco .	52	10	42	6+000	43	13+000	36	16+0000	32	26+0000	22	22	
B. di Pfeiffer . .	18	9	9	6	12	11	7	6	12	17	1	1	
Streptococco . .	6	4	2	2	4	2	4	3	3	5	1	1	
Stafilococco . .	2	2	—	2	—	2	—	2	—	2	—	—	
<i>Liquido pleurico</i>	3	1	2	2	1	2	1	2	1	3	—	—	
TOTALE	94	32	62	22+000	69	37+000	54	35+000000	53	62+0000000	26	26	

Sono indicati col segno 0 i casi in cui la cultura non fu eseguita.

Queste cifre bastano da sole a raccomandare l'uso abitudinario di terreni addizionati con sostanze antagoniste per la cultura di liquidi patologici (liquor — sangue — essudato pleurico — pus — urina — ecc.) provenienti da pazienti sotto trattamento sulfamidico. Con tali terreni non solo riusciamo a svelare l'agente etiologico nei casi in cui il germe non si mette in evidenza con gli ordinari mezzi culturali, e quindi ad istituire la terapia appropriata, ma anche a seguire il decorso dell'affezione e a regolare la terapia stessa in maniera molto più precisa e più sicura.

RIASSUNTO. — L'uso di terreni alla novocaina e all'acido p-aminobenzoico ha permesso di ottenere culture positive dai liquidi patologici (liquor — pus — essudato pleurico) provenienti da pazienti trattati con preparati sulfamidici, anche quando l'esame microscopico diretto e la cultura su terreni ordinari sono risultati negativi.

BIBLIOGRAFIA

- AUSBACHER, « Science », 93, p. 164, 1941.
FILDES, « Brit. J. Exp. Path. », 21, p. 67, 1940.
— « Lancet », 1, p. 995, 1940.
FLEMING, « Lancet », 11, p. 74, 1938.
— « Lancet », 11, p. 564, 1938.
— « J. Path. & Bact. », 50 p. 69, 1940.
GREEN, « Brit. J. Exp. Path. », 21, p. 38, 1940.
KUHN e SCHWARZ, « Chem. Ber. », 74, p. 1617, 1941.
KUHN, WIELAND e MOELLER, « Chem. Ber. », 74, p. 1605, 1941.
JANEWAY, « J.A.M.A. », 116, p. 941, 1941.
LANDY e WYENO, « Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. », 46, p. 59, 1941.
LOCKWOOD, « J. Immunol. », 35, p. 155, 1938.
LOCKWOOD e LYNCH, « J.A.M.A. », 114, p. 935, 1940.
LOCKWOOD, COBURN e STOKINGER, « J.A.M.A. », 111, p. 2259, 1938.
MAZZA e LENTI, « R. Sc. Scient. », 12, p. 1046, 1941.
MC CARTY, « Proc. Soc. Exp. Biol. e Med. », 46, p. 133, 1941.
MC INTOSH e WHITBY, « Lancet », 1, p. 431, 1939.

- MC LEOD, « J. Exp. Med. », 72, p. 217, 1940.
- MILLER, « J. Pharm. & Exp. Ther. », 71, p. 14, 1941.
- MOELLER, « Z. Physiol. Chem. », 260, p. 246, 1939.
- MOELLER e SCHWARZ, « Chem. Ber. », 74, p. 1612, 1941.
- RUBBO e GILLESPIE, « Nature », 146, p. 838, 1940.
- SELBIE, « Brit. J. Exp. Path. », 21, p. 90, 1940.
- STAMP, « Lancet », 11, p. 10, 1939.
- STRAUSS, DINGLE e MAXWELL, « Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. », 46, p. 131.
1941.
- STRAUSS, LOWELL e FINLAND, « J. Clin. Investig. », 20, p. 189, 1941.
- WOODS, « Brit. J. Exp. Path. », 21, p. 74, 1940.

347359

