



CONFEDERAZIONE SVIZZERA

UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

 (51) Int. Cl.³: B 01 F 17/56
 G 01 N 33/48

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
 Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

(12) **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

(11)

632 938

(21) Numero della domanda: 7383/77

(22) Data di deposito: 15.06.1977

(30) Priorità: 28.06.1976 US 700215

(24) Brevetto rilasciato il: 15.11.1982

 (45) Fascicolo del
 brevetto pubblicato il: 15.11.1982

 (73) Titolare/Titolari:
 J. K. and Susie L. Wadley Research Institute and
 Blood Bank, Dallas/TX (US)

 (72) Inventore/Inventori:
 Gordon Lee Dorn, Dallas/TX (US)

 (74) Mandatario:
 Patentanwälte Racheli & Fiammenghi, Lugano

(54) Procedimento per individuare la presenza di organismi patogeni in campioni di fluido polmonare.

(57) Il procedimento per individuare la presenza di organismi patogeni nel tratto respiratorio, prevede di prelevare un campione di fluido polmonare rispettivamente di espettorato e successivamente di miscelarlo con una saponina non tossica in quantità tale da agire come efficace mucolitico e da impartire al campione di fluido polmonare la viscosità desiderata praticamente uniforme.

Si rimescola poi continuamente la miscela in modo da disperdere uniformemente i microbi patogeni contenuti prima del momento in cui il campione viene analizzato.

La saponina atossica comprende preferibilmente una saponina estratta da piante e resa atossica mediante allontanamento dei costituenti dalla sua soluzione acquosa.

E' prevista l'aggiunta di una piccola quantità di agente antischiuma, atossico verso i microbi patogeni.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per individuare la presenza di organismi patogeni in campioni di fluido polmonare rispettivamente espettorato, analizzando dei terreni di cultura inoculati con detti campioni, caratterizzato dal fatto che questi vengono liquefatti uniformemente con una saponina atossica.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato da ciò che la saponina atossica comprende saponina estratta da piante e resa atossica mediante allontanamento dei costituenti tossici da una soluzione acquosa dell'estratto di saponina, che ha un peso molecolare apparente inferiore a 600 nella soluzione acquosa.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, caratterizzato da ciò che la saponina atossica viene mescolata col campione di fluido polmonare in quantità che vanno da 0,1 a 20%, in peso, delle miscele di fluido polmonare e saponina.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato da ciò che la saponina atossica viene mescolata col campione di fluido polmonare in quantità da 5 a 10% in peso della miscela di fluido polmonare e saponina.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 3, caratterizzato da ciò che la saponina atossica è contenuta in una soluzione acquosa.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato da ciò che la soluzione acquosa di saponina atossica comprende inoltre una piccola quantità efficace di un agente antischiuma, che è atossico verso i microbi patogeni.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato da ciò che la miscelazione del campione di espettorato con la saponina atossica viene fatta in quantità tale da degradarne la viscosità prima del momento in cui il campione viene analizzato.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato da ciò che la saponina atossica comprende saponina estratta da piante e resa atossica mediante allontanamento dei costituenti tossici da una soluzione acquosa dell'estratto di saponina, che ha un peso molecolare apparente inferiore a 600 nella soluzione acquosa.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, caratterizzato da ciò che la saponina atossica viene mescolata col campione di espettorato in quantità da 0,1 a 20% in peso della miscela di espettorato e saponina.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato da ciò che la saponina atossica viene mescolata col campione di espettorato in quantità che vanno da 5 a 10% in peso della miscela di espettorato e saponina.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 8, caratterizzato da ciò che la saponina atossica è contenuta in una soluzione acquosa.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11, caratterizzato da ciò che la soluzione acquosa di saponina atossica comprende inoltre una piccola quantità, efficace, di un agente antischiuma, che è atossico per i microbi patogeni.

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento per individuare la presenza di organismi patogeni in campioni di fluido polmonare, rispettivamente di espettorato, analizzando dei terreni di cultura inoculati con detti campioni.

Lo stato di polmonite in un paziente umano comprende generalmente una condizione infiammatoria acuta di un polmone o dei polmoni, che può essere dovuta a microbi patogeni, ad esempio batteri o virus come pure a sostanze chimiche irritanti o corpi estranei. Per determinare l'agente che provoca in un paziente con presunta diagnosi di pol-

monite uno stato infiammatorio è necessario disporre di campioni di fluido polmonare.

I campioni ideali di fluido polmonare sono campioni omogenei che possono ottenersi per intervento chirurgico per esempio per aspirazione transtracheale. Comunemente le tecniche di intervento chirurgico richiedono tempo e presentano un rischio per il paziente. E' risaputo che possono verificarsi reazioni letali dovute ad aspirazione transtracheale. Ad esempio pazienti ipotossici e pazienti che soffrono di malattie delibitanti, come discrasia del sangue, sono particolarmente inclini a gravi complicazioni in seguito all'aspirazione transtracheale.

Di conseguenza, la maggior parte dei medici, ricorre, come mezzo per ottenere campioni di fluido polmonare, allo sputo o espettorato dalla prima tosse della mattina. Questa tecnica è semplice e molto comune. Sfortunatamente i campioni di sputo espettorato con la tosse possono essere facilmente contaminati dalla flora normale che si trova nella bocca, nel naso, nella faringe posteriore e nello stomaco. Inoltre gli espettorati da pazienti con polmonite sono molto viscosi e di natura eterogenea e quindi difficili da disperdere in maniera riproducibile. Non è possibile effettuare analisi quantitative su espettorati molto viscosi ed eterogenei poiché in genere per l'analisi quantitativa è necessario diluire li campione di espettorato e quindi spalmare (plate) piccole porzioni del campione su vari terreni di cultura e poi determinare il tipo ed il numero delle colonie di organismi microbici che risultano sui terreni di cultura. Generalmente il numero massimo di colonie che si può contare su una scatola Petri è di circa 300. Inoltre si è accertato che i campioni di sputo normali possono contenere microorganismi contaminanti fino a 10^5 per millilitro, mentre, nel caso della polmonite, i microorganismi che la provocano sono in genere presenti in quantità superiori a circa 10^6 per millilitro. Quindi, prima che un campione di espettorato possa venire analizzato quantitativamente, esso deve essere diluito in maniera tale che i microbi patogeni siano dispersi uniformemente nel campione diluito che ne risulta. Perciò, se si analizza quantitativamente una piccola parte dell'espettorato diluito, per determinare il tipo ed il numero di microbi patogeni presenti, si potrà calcolare accuratamente l'esatto numero di microbi patogeni per millilitro del campione di espettorato.

Quindi, allo scopo di ridurre il problema di contaminazione esterna e di eterogeneità del campione di espettorato e fornire una analisi quantitativa dell'espettorato si è cercato in diversi modi di digerire il campione di espettorato con digestori enzimatici e chimici. Si sono sperimentati a tutt'oggi diversi tipi di digestori e tutti presentano uno o più dei seguenti svantaggi: alto costo, breve vita di conservazione, sensibilità alla temperatura, tossicità per uno o più organismi patogeni; essi richiedono inoltre un lungo periodo di digestione. Per esempio si sono esaminati numerosi enzimi proteolitici in espettorato sia purulento sia mucoso. Tra tali sostanze enzimatiche, le più efficaci sembrano la tripsina, l'elastase e la chimotripsina; ed enzimi come la bromelaina, la ficina o la papaina erano efficaci solo in concentrazioni estremamente alte mentre la plasmina non ha effetto riscontrabile sulla viscosità dell'espettorato. Sembra che tutti questi enzimi proteolitici siano più efficaci con espettorati mucoidi che con espettorati purulenti. I digestori più largamente usati per analisi quantitative dell'espettorato sono soluzioni acquose di N-acetil-cisteina ed il reagente di Cleland (1,4 ditio-mesoeritrite). In generale il reagente di Cleland presenta una attività mucolitica superiore a quella della N-acetilcisteina a concentrazioni minori, ma il reagente di Cleland perde generalmente la sua attività mucolitica entro periodi di tempo relativamente brevi in soluzione acquosa. Inoltre,

ambidue questi reagenti sono leggermente tossici per i microbi patogeni alle concentrazioni necessarie per una rapida digestione dell'espettorato.

Di conseguenza la maggior parte dei campioni d'espettorato viene trattata con una tecnica di striscio non quantitativa, che consiste generalmente nello strisciare il campione d'espettorato eterogeneo su diversi terreni di cultura. Queste tecniche portano a un notevole numero di culture positive fittizie e, in molti casi, ad una sovracrescita o crescita sovrapposta (overgrow) degli organismi patogeni dovuta a microorganismi contaminanti.

Con la presente invenzione è stato scoperto che certe saponine purificate presentano attività mucolitica e possono agire efficacemente degradando campioni di sputo o espettorato, comprendenti sputi sia purulenti sia mucoidi, e microbi patogeni dispersi uniformemente in essi senza pericolo per i patogeni.

Il procedimento secondo la presente invenzione è pertanto caratterizzato dal fatto che detti campioni di fluido polmonare, rispettivamente di espettorato vengono liquefatti uniformemente con una saponina atossica.

Secondo una preferita forma di realizzazione il procedimento in oggetto prevede la miscelazione del campione di fluido polmonare rispettivamente di espettorato, con una saponina non tossica in quantità tale da agire come efficace mucolitico, così da impartire al campione di fluido polmonare la viscosità desiderata, praticamente uniforme, e la successiva intima miscelazione del campione risultante così da disperdere uniformemente i microbi patogeni contenutivi prima del moment oin cui il campione viene analizzato.

La saponina non tossica o atossica che è utilizzabile nell'ambito della presente invenzione può essere purificata col procedimento descritto nel brevetto U.S.A. 3 883 425.

Le saponine sono glucosidi, largamente distribuiti nelle piante e sono capaci di formare emulsioni del tipo olio-in-acqua, e agiscono come colloidii protettivi. Ogni molecola di saponina consiste di una sapogenina, che costituisce la parte di aglucone della molecola, e di uno zucchero.

La sapogenina è una struttura triterpenoido (di solito con una struttura pentaciclica, come l'acido quillaico), oppure una struttura di steroide (avente una catena laterale spiroacetale come quella nella diosgenina). La parte costituita da uno zucchero del glucoside saponina comprende uno o più zuccheri come glucosio, saccarosio, xilosio, pentosio o un metilpentosio, oppure altri zuccheri. Per idrolisi, le saponine danno la sapogenina e uno o più di questi zuccheri.

Saponine disponibili in commercio comprendono una polvere, amorfa, da bianca a bruna, che è pungente ed ha un sapore e un odore sgradevoli. Questa polvere è molto solubile in acqua e forma schiuma molto resistente quando viene scossa con acqua.

Le saponine commerciali vengono preparate mediante estrazione del tessuto della pianta con acqua e/o con solventi organici, come alcole, ed isolamento della saponina mediante precipitazione, ricristallizzazione e simili. Le saponine sono largamente distribuite nelle piante. Per esempio, le saponine sono molto largamente distribuite nella famiglia delle cariofillacee. Esempi specifici di fonti di saponina comprendono la quillaria saponaria, il «legno di panama» (panama wood), il frutto di certe piante del genere *Sapindus*, *liquerizia* e simili. Un esempio specifico di un procedimento per produrre saponina commerciale è descritto nella Enciclopedia chimica di Kingzette (Kingzette's Chemical Encyclopedia), d.H. Hey, 9na edizione, (1966) che comprende sia l'estrazione della corteccia di saponaria polverizzata (*Quillaja saponaria*) con alcole caldo o mediante ebollizione dell'estratto acquoso essiccato, polverizzato di

tale pianta con alcole, e cristallizzazione della saponina dell'alcole col raffreddamento.

Le saponine praticamente non sono tossiche per l'uomo in seguito ad ingestione orale, ma agiscono come potente emolitico quando vengono iniettate nella corrente sanguigna, dissolvendo in tal modo i corpuscoli rossi del sangue. Per questa caratteristica le saponine sono state usate convenzionalmente nei laboratori ematologici per la lisi delle cellule rosse (eritrociti) dovunque la loro presenza interferisca con altri procedimenti, per esempio determinazioni dell'emoglobina e conteggio delle cellule bianche (linfociti).

Come esposto nel brevetto citato, U.S.A. 3 883 425, si fornisce una tecnica per allontanare tossine microbiche da saponina, estratta da una sorgente vegetale, allontanando i costituenti da una soluzione acquosa di questa saponina, che abbia un peso molecolare apparente inferiore a circa 600, per esempio una dimensione molecolare in soluzione acquosa tra circa 140 e circa 600. Una delle tecniche descritte in tale brevetto consiste nel formare una soluzione acquosa di un estratto di saponina commerciale da piante e successivamente far passare la soluzione attraverso una membrana microporosa di un filtro, che abbia una dimensione media effettiva dei pori che non sia inferiore ad un diametro di circa 11 angström e non sia superiore ad un diametro di circa 24 angström. La soluzione acquosa, che passa attraverso la membrana microporosa del filtro, conterrà la tossina antimicrobica ed il filtro escluderà il materiale saponinico.

E' stato ora trovato che questi estratti vegetali di saponina, purificati, sono agenti mucolitici efficaci in quanto degradano efficientemente tutti i tipi di espettorato e disperdono microbi patogeni contenutivi senza danneggiare i patogeni.

Il procedimento secondo la presente invenzione è pertanto caratterizzato dalla parte caratterizzante della rivendicazione 1.

Nell'esecuzione del procedimento secondo la presente invenzione il campione di espettorato viene raccolto secondo una qualunque tecnica convenzionale. Successivamente esso viene mescolato con una quantità mucolitica piccola, ma efficace, della saponina non-tossica su descritta. Di preferenza la saponina si trova in soluzione acquosa quando viene mescolata con l'espettorato. La soluzione acquosa può essere di qualunque concentrazione conveniente, tale che, quando si mescoli la quantità desiderata di soluzione col campione di sputo, sia presente una quantità di saponina sufficiente a degradarlo. In generale, è necessario che sia contenuto da circa 0,1% in peso, a circa 20% in peso, e, di preferenza, da circa 1,0% in peso a circa 10% in peso ed ancor meglio da circa 5% in peso a circa 10% in peso di saponina nella miscela risultante di saponina ed espettorato.

Inoltre, è preferibile aggiungere alla miscela risultante di saponina ed espettorato da circa 0,1% in peso a circa 20% in peso e meglio ancora da circa 5% in peso a circa 10% in peso, di un antischiumogeno, che non sia deleterio per i microbi patogeni. Agenti antischiuma di questo tipo adatti comprendono materiali venduti col nome di fabbrica di Dow X Antifoam B e Dow X H 10. Questi agenti contengono polimeri chimici di dimetilsilossano e di un emulsionante sterilizzabile, per esempio trattabile in autoclave, non-ionico, come il tipo venduto col nome di fabbrica di Triton X. Il materiale venduto col nome di fabbrica di Dow X H 10 può essere preferito in quanto è molto stabile alla sterilizzazione mediante trattamento in autoclave. La saponina degrada efficacemente tutti i tipi di espettorato, sia mucoide sia purulento, molto rapidamente formando una miscela di viscosità uniforme.

Il campione di espettorato viene poi mescolato intimamente così da disperdere uniformemente in esso i microorganismi. Se lo si desidera, si possono spalmare direttamente su vari terreni porzioni del campione di espettorato degradato risultante in modo da ottenere un'analisi dell'espettorato qualitativa perfezionata, che non è esposta al notevole numero di culture positive fittizie e alla sovracrescita di flora patogena in seguito all'azione di microorganismi contaminanti come avviene nella tecnica quantitativa convenzionale, che non utilizza espettorato degradato.

Nell'esecuzione dell'analisi quantitativa perfezionata dell'espettorato secondo la presente invenzione, l'espettorato trattato con saponina viene diluito a piacere, per esempio, a 1 : 100 - 1 : 1000, con soluzione salina normale, tamponata con fosfato, pH 7,2 o con qualunque altro diluente adatto, che non interferisca nella tecnica analitica e non sia tossico per i microbi patogeni. Il campione diluito risultante viene mescolato intimamente così da assicurare una distribuzione uniforme dei microbi patogeni in tutta la soluzione. Successivamente si aggiungono campioni della soluzione diluita a terreni di cultura convenzionali e si fa incubare. Successivamente si possono identificare sui terreni le colonie risultanti e conteggiarle e, conoscendo l'entità della diluizione del campione di espettorato, è possibile in tal modo calcolare facilmente la quantità totale di tipi differenti di microbi patogeni. Oppure, se lo si desidera, si possono sottoporre ad esame microscopico i campioni non diluiti.

Gli esempi che seguono vengono presentati per illustrare più in particolare la presente invenzione.

Esempio I

In questo esempio, si confrontò la tossicità di vari agenti mucolitici noti con quella della saponina. In ciascun caso i ceppi di batteri, riportati nella tabella 1, che segue, vennero fatti crescere per una notte nei terreni di cultura indicati nella tabella 1 e si regolò con soluzione salina sterile, la torbidità dei terreni di crescita risultanti di fronte ad uno standard di solfato di bario approssimativamente a 10^8 batteri per millilitro. Successivamente il brodo risultante venne

diluito a 1 : 200 in brodo nutriente. Quindi si aggiunse una soluzione 40% in peso di saponina, che era stata purificata secondo il procedimento esposto nel brevetto U.S.A.

3 883 425 (allo scopo di allontanare da essa i contaminanti tossici, che avevano un peso molecolare apparente inferiore a circa 600 in soluzione acquosa), al tipo di brodo di cultura adatto per i particolari batteri indicati nella tabella 1. Successivamente, si aggiunse un millilitro di ciascuna sospensione di brodo di cultura batterica ad 1 millilitro della soluzione di saponina sopra descritta, così da ottenere una concentrazione finale di 20% in peso di saponina e successivamente si fece incubare per una notte a 37°C. Si fece pure uno striscio con sospensione di confronto e di prova su agar ricco contenente 1% in peso di glucosio o agar sangue.

15 Gli altri composti di cui si determinò la tossicità erano il reagente di Cleland (1,4-ditio-mesoeritrite), N-acetilcisteina, e sodio laurilsolfato. Questi agenti mucolitici vennero preparati nelle concentrazioni e nel brodo di cultura per ciascun microorganismo come indicato nella tabella 1 e se ne esaminò la tossicità nello stesso modo descritto sopra per la saponina.

Se i particolari batteri crescevano nel brodo contenente la quantità indicata di agente mucolitico, si ripeteva l'operazione per vedere se la crescita poteva venire raddoppiata in una seconda marcia. Se non si otteneva crescita nel primo e nel secondo tempo, si rifaceva l'operazione in un terzo tempo nel tentativo di far crescere i batteri. In alcuni casi, una terza marcia viene effettuata anche se i batteri crescevano nelle prime due. Perciò, nella tabella un più indica una marcia con crescita positiva e un meno indica una marcia con crescita negativa. Più in particolare:

+++ = crescevano tre volte su tre

--- = non crescevano nemmeno una volta su tre

35 --+ = crescevano una volta su tre

+-+ = crescevano due volte su tre.

I risultati sono esposti nella tabella 1 che segue:

Organismo	Tipo del brodo di cultura °	Agente mucolitico e concentrazione percentuale						
		Saponina di Cleland			N-acetilcisteina		Laurilsolfato sodico	
		20%	0,1%	0,5%	0,5%	5,0%	2,5%	10,0%
<i>Escherichia coli I</i>	1	++	+++	-++	+ - +	---	+++	+++
<i>Staphylococcus XIII</i>	1	++	+++	---	+ + -	---	---	---
<i>Pseudomonas species</i>	1	++	+++	---	+ + -	---	+ - +	+ - +
<i>Candida species</i>	1	++	+++	-++	+++	---	+ - -	---
<i>Torulopsis glabrata</i>	1	++	+++	- + -	+++	---	---	---
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	++	++	--	+ -	+ -	--	--
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	++	++	--	--	--	--	--
<i>Citrobacter freundii</i>	1	++	+++	+++	- + +	---	+++	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	++	+++	-++	+++	---	+++	+++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	++	+++	-++	+++	---	+++	+++
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1	++	+++	-++	- - +	---	+++	+++
<i>Proteus mirabilis</i>	1	++	+++	-++	+++	---	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	++	+++	+ + -	+ - -	---	---	---
<i>Neisseria meningitidis</i>	4	++	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella suis</i>	4	++	- +	--	+ -	--	--	--
<i>Bacteroides fragilis</i>	5	++	++	+ -	+ -	--	--	--
<i>Clostridium perfringens</i>	5	++	++	+ -	+ -	-	-	-
<i>Propionibacterium shermanii</i>	5	++	+ -	+ -	--	--	--	--
<i>Mycoplasma hominis</i>	6	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT

- ° 1 - cresceva in brodo ricco contenente 1% in peso di glucosio
 2 - cresceva in brodo Todd-Hewett e veniva strisciato successivamente su sangue
 3 - cresceva in brodo ricco contenente 1% in peso di glucosio e veniva successivamente strisciato su sangue
 4 - cresceva in brodo ricco contenente 1% in peso di glucosio e veniva successivamente strisciato su sangue in un contenitore con CO₂
 5 - cresceva in un brodo di peptone, lievito, glucosio, maltosio e veniva successivamente strisciato su sangue in un contenitore (jar) anaerobico
 6 - cresceva originariamente in un brodo PPLO e successivamente veniva strisciato su agar PPLO in un contenitore con CO₂
 NT - non analizzato.

Come si può osservare dalla tabella 1 su riportata, la concentrazione relativamente elevata della saponina purificata non uccideva o inibiva la crescita di alcuno dei microorganismi esaminati. Invece, ciascuno degli altri agenti mucolitici esaminati impediva la crescita di parecchi dei microorganismi a concentrazione molto più bassa di quella della saponina. Si dovrebbe pure notare che anche alla concentrazione d'uso raccomandata degli agenti mucolitici attualmente usati (0,5% N-acetilcisteina e 0,1% del reagente di Cleland) si verificò tossicità di fronte a parecchi organismi.

Esempio II

Si effettuarono analisi cliniche di parecchi campioni di espettorato dopo che i campioni erano stati disciolti in saponina non tossica e si confrontarono i risultati con la normale analisi di laboratorio dell'espettorato che si conduce convenzionalmente in un comune ospedale. Inizialmente si raccolse un campione di espettorato emesso il mattino presto e si effettuarono un preparato umido e una spalmatura (prep

and smear) per graduare l'espettorato ed osservarne le caratteristiche, come spore. Si graduarono gli espettorati da 1 a 4 secondo le seguenti caratteristiche:

Grado 1: saliva - schiumosa, limpida, incolore, per la maggior parte con celle epiteliali su un campo di 40X

Grado 2: mucoide - incolore, da limpida a translucida, in maggioranza eosinofili e macrofagi, cellule polimorfonucleari meno di 60%, e meno di 1/2 di un campo di 40X avente cellule.

Grado 3: mucopurulento - da incolore a verdastro, leggermente translucido e approssimativamente 1/2 del campo riempito con cellule.

Grado 4: purulento - da giallo a verdastro, torbido, cellule polimorfonucleari più di 70%, e più di 1/2 del campo ricoperto con cellule.

In ciascun caso venne determinata la densità cellulare osservando quale percentuale di un campo di 40X era riempita con cellule su un preparato di campione bagnato. Si determinò la citologia colorando (Papanicolaou) un vetrino, conteggiando 200 cellule del campione e identificando le cellule polimorfonucleari (PMN), eosinofili, basofili, macrofagi, monociti e linfociti.

Dopo la graduazione di ciascun campione di espettorato, si effettuò su di esso un'analisi di routine o analisi normale, che comprende l'operazione di sei strisci semiquantitativi con parte del campione di espettorato su una piastra di agar-sangue (BA); su una piastra di agar di cioccolato (CHOC); su una piastra di blu di metilene eosina (EMB); su una piastra di sali di mannitolo (MAN); su una piastra di penicillina contenente sali di mannitolo (MAN-PEN); e su una piastra di Sabourand + gentamicina (SDA-GENT), e lasciando crescere eventuali batteri sulla piastra e successivamente identificandoli. La parte residua di ciascun campione venne successivamente fatta digerire con una quantità uguale di saponina 10% in peso (che era stata purificata secondo il brevetto U.S.A. 3 833 425) e citrato sodico 0,1 M, e un agente antischiuma (Antifoam B Emulsion - Dow Corning), così da ottenere una concentrazione finale di 5% in peso di saponina in essa. Successivamente la miscela di saponina-espettorato venne sottoposta a movimento vorticoso per almeno 30 secondi.

Successivamente, l'espettorato originale, digerito, venne strisciato sulle seguenti piastre: BA; CHOC; EMB; MAN; MAN-PEN; e SDA-GENT. Successivamente si effettuarono

due diluizioni 1 : 100 da una porzione dell'espettorato digerito in bottiglie contenenti soluzione salina così da ottenere diluizioni 10^2 e 10^4 , per esempio si introdussero 0,1 millilitri di espettorato in una soluzione salina di 9,9 millilitri per la diluizione di 10^2 e si introdussero 0,1 millilitri della diluizione 10^2 in 9,9 millilitri di soluzione salina per ottenere la diluizione 10^4 . Successivamente, si usò un anello di 0,01 millilitri per lo striscio dalla bottiglia di diluizione 10^4 sulle piastre seguenti: BA; CHOC; EMB; MAN; MAN+PEN; ed SDA+GENT, così da ottenere una diluizione finale definita di 10^6 . Successivamente si striscò un altro campione di 0,01 millilitri su gentamicina SDA dalla bottiglia di diluizione 10^2 così da ottenere una diluizione definita di 10^4 . Tutte le piastre vennero incubate e lette in 24-48 ore. Le piastre SDA vennero pure lette dopo una settimana. Le piastre vennero interpretate come segue:

- un'interpretazione della flora normale (livello e tipo normale di microorganismi trovati in passaggi nasofaringei) per Alpha streptococcus e Neisseria e difteroidi che compaiono nel campo di 10^6 e 10^7 .
- infezione positiva per tutti gli altri organismi non lieviti [diversi da quelli esposti sopra in (a)] che compaiono nel campo di 10^6 e in un campo superiore.
- 10^5 si interpretò come 1-5 organismi trovati casualmente su una serie di piastre come eventualmente positivi.
- 10^3 e più che corrisponde a 1-5 organismi trovati casualmente su una serie di piastre rappresenta una possibilità di presenza positiva per *Candida Albicans*, e positiva per tutti gli altri lieviti.

I risultati sono esposti nella tabella 2 che segue.

TABELLA 2

Risultati clinici di analisi ed espettorato mediante analisi di routine e quantitativa

Caso n.	Grado dello sputo	Analisi normale (di routine)	Conclusione	Analisi quantitativa	Conclusione
1	2	Scarsa presenza di <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas</i>	Flora normale	Flora normale	Flora normale
2	4	Scarsa presenza di <i>Staphylococcus aureus</i>	Flora normale	2×10^7 <i>Neisseria perflava</i>	Eventualmente positiva per <i>Neisseria perflava</i>
3	1	Moderata presenza di <i>Serratia marcescens</i> , scarsa presenza di <i>Pseudomonas</i>	Crescita significativa di <i>Serratia marcescens</i>	1×10^5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 1×10^5 <i>Serratia marcescens</i>	Positiva per <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , eventualmente positiva per <i>Serratia marcescens</i>
4	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
5	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
6	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
7	1	Scarsa presenza di <i>Pseudomonas</i> , e <i>Candida albicans</i>	Flora normale	1×10^5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Eventualmente positiva per <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	4	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Candida tropicalis</i> , <i>Enterococcus</i>	Positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	$2,5 \times 10^5$ lievito (<i>Candida krusei</i> e <i>Torulopsis glabrata</i>), 1×10^8 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 4×10^7 <i>Enterococcus</i>	Positiva per lievito, <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Enterococcus</i> (D)

TABELLA 2 (Continuazione)

Caso n.	Grado dello sputo	Analisi normale (di routine)	Conclusione	Analisi quantitativa	Conclusione
9	4	Moderata presenza di <i>Candida albicans</i>	Positiva per <i>Candida albicans</i>	TNTC <i>Hansenula polymorpha</i> , 1×10^5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positiva per lievito, eventualmente positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	1	Flora normale	Flora normale	1×10^5 <i>Staphylococcus aureus</i>	Flora normale
11	3	Moderata presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>	Positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 1×10^5 <i>Candida albicans</i>	Positiva per <i>Candida albicans</i> , eventualmente positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	1	Scarsa presenza di <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Candida albicans</i>	Flora normale	1×10^6 <i>Candida albicans</i> , 1×10^6 <i>Pseudomonas fluorescens</i> , 1×10^5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positiva per <i>Candida albicans</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> , eventualmente positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
14	3	Moderata <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>	Positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^6 <i>Candida albicans</i> ,	Positiva per <i>Candida albicans</i>
15	2	Scarsa presenza di <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	Flora normale	1×10^6 <i>Candida albicans</i> , 1×10^6 <i>Staphylococcus aureus</i>	Positiva per <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>
16	2	<i>Candida albicans</i>	Positiva per <i>Candida albicans</i>	1×10^3 <i>Candida albicans</i>	Eventualmente positiva per <i>Candida albicans</i>
17	2	Scarsa presenza di <i>Beta streptococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i>		2×10^5 <i>Torulopsis magii</i> , 4×10^5 <i>Candida albicans</i>	Positiva per <i>Torulopsis magii</i> e <i>Candida albicans</i>
18	4	<i>Haemophilus influenzae</i>	Positiva per <i>Haemophilus influenzae</i>	6×10^8 <i>Haemophilus influenzae</i> , 1×10^3 <i>Torulopsis glabrata</i>	Positiva per <i>Haemophilus influenzae</i> , eventualmente positiva per <i>Torulopsis glabrata</i>
19	1	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
20	3	Notevole presenza di <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positiva per <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	$> 10^8$ <i>Klebsiella pneumoniae</i> , $> 10^8$ <i>Enterobacter cloacae</i> , 10^5 <i>Candida krusei</i> , 10^5 <i>Torulopsis glabrata</i> , 10^4 <i>Candida tropicalis</i>	Positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Torulopsis glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i>
21	3	Flora normale	Flora normale	1 <i>Penicillium humulii</i>	Flora normale
22	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
23	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
24	2	Scarsa presenza di <i>Candida tropicalis</i>	Flora normale	$2,5 \times 10^4$ <i>Candida tropicalis</i> , $1,5 \times 10^4$ <i>Torulopsis glabrata</i>	Positiva per <i>Candida tropicalis</i> e <i>Torulopsis glabrata</i>
25	4	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 3 col. <i>Staphylococcus aureus</i>	Flora normale	$\sim 10^5$ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Eventualmente positiva per <i>Klebsiella pneumoniae</i>

TABELLA 2 (Continuazione)

Caso n.	Grado dello sputo	Analisi normale (di routine)	Conclusione	Analisi quantitativa	Conclusione
26	3	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
27	4	Scarsa presenza di <i>Candida tropicalis</i>	Flora normale	10^6 <i>Escherichia coli</i> 10^3 <i>Torulopsis glabrata</i>	Eventualmente positiva per <i>Escherichia coli</i> e <i>Torulopsis glabrata</i>
28	4	Flora normale	Flora normale	6×10^7 <i>Haemophilus</i> , 1×10^3 <i>Torulopsis glabrata</i>	Eventualmente positiva per <i>Haemophilus</i> e <i>Torulopsis glabrata</i>
29	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
30	3	Moderata presenza di <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (H)	Positiva per <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (H)	2×10^8 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (H), 1×10^8 <i>Haemophilus</i>	Positiva per <i>Acinetobacter</i> e <i>calcoaceticus Haemophilus</i>
31	4	Flora normale	Flora normale	1×10^8 <i>Diplococcus</i>	Positiva per <i>Diplococcus</i>
32	3	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
33	2	<i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>	1×10^5 <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>
34	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
35	3	Scarsa presenza di <i>Enterobacter cloacae</i>	Flora normale	10^6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 10^5 <i>Proteus mirabilis</i>	Eventualmente positivo per <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Proteus mirabilis</i>
36	3	Scarsa presenza di <i>Proteus vulgaris</i>	Flora normale	1×10^6 <i>Proteus vulgaris</i>	Eventualmente positivo per <i>Proteus vulgaris</i>
37	3	Scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>	Flora normale	Flora normale	Flora normale
38	2	Flora normale	Flora normale	1×10^3 <i>Candida Albicans</i>	Eventualmente positivo per <i>Candida albicans</i>
39	3	Moderata presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Enterococcus</i> e <i>Candida tropicalis</i>	Positivo per <i>Klebsiella</i>	10^5 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 10^5 <i>Enterococcus</i> 10^5 <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i> , eventualmente positivo per <i>Enterococcus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>
40	3	Notevole presenza di <i>Candida albicans</i> , scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>	10^9 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , $> 10^5$ <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Candida albicans</i>
41	4			10^6 <i>Haemophilus</i>	Eventualmente positivo per <i>Haemophilus</i>
42	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
43	4	Scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>	Flora normale	10^5 <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>
44	4	Notevole presenza di <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>	$> 10^6$ <i>Candida albicans</i> , 10^5 <i>Serratia liquefaciens</i> , 10^5 <i>Pseudomonas</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i> , eventualmente positivo per <i>Serratia liquefaciens</i> e <i>Pseudomonas</i>
45	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
46	4	<i>Proteus mirabilis</i> e cocci gram positivi (impossibile isolare)	Positivo per <i>Proteus mirabilis</i>	10^6 <i>Proteus mirabilis</i>	Eventualmente positivo per <i>Proteus mirabilis</i>

TABELLA 2 (Continuazione)

Caso n.	Grado dello sputo	Analisi normale (di routine)	Conclusione	Analisi quantitativa	Conclusione
47	4	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Flora normale	10^7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Basisdiomycetes</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>
48	3	<i>Staphylococcus aureus</i>		Flora normale	Flora normale
49	4	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^8 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>
50	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
51	3	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Beta Streptococcus</i> , moderata presenza di <i>Citrobacter freundii</i>	Positivo per <i>Citrobacter freundii</i>	1×10^6 <i>Pseudomonas putida</i>	Eventualmente positivo per <i>Pseudomonas putida</i>
52	3	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
53	4	Moderata presenza di <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>	2×10^5 <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i>
54	3	Scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>	Flora normale	1×10^3 <i>Candida albicans</i>	Eventualmente positivo per <i>Candida albicans</i>
55	2	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Escherichia coli</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^8 specie <i>Neisseria</i> , 1 specie <i>Fusarium</i>	Eventualmente positivo per la specie <i>Neisseria</i>
56	3	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Candida tropicalis</i>	Flora normale	$\sim 3 \times 10^5$ <i>Candida parapsilosis</i>	Positivo per <i>Candida parapsilosis</i>
57	3	Scarsa presenza di <i>Haemophilus</i> , <i>Candida albicans</i>	Flora normale	1×10^3 <i>Candida albicans</i> , 1×10^8 <i>Haemophilus</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i> eventualmente positivo per <i>Candida albicans</i>
58	4	Moderata presenza di <i>Haemophilus</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i>	$1,0 \times 10^8$ <i>Haemophilus</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i>
59	2	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Escherichia coli</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Eventualmente positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>
60	4	Scarsa presenza di <i>Haemophilus</i>	Flora normale	$> 3 \times 10^8$ <i>Haemophilus</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i>
61	2	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Flora normale	1×10^6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 1×10^3 <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i> , eventualmente positivo per <i>Candida albicans</i>
62	4	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
63	4	<i>Haemophilus</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i>	1×10^7 <i>Haemophilus</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i>
64	2	Scarsa presenza di <i>Serratia liquefaciens</i>	Flora normale	Flora normale	Flora normale
65	4	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
66	3	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale

TABELLA 2 (Continuazione)

Caso n.	Grado dello sputo	Analisi normale (di routine)	Conclusione	Analisi quantitativa	Conclusione
67	3	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , scarsa presenza di <i>Enterococcus</i>	Positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^7 <i>Enterococcus</i> (D) 3×10^8 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo per <i>Enterococcus</i> (D) e <i>Klebsiella pneumoniae</i>
68	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
69	2	Moderata presenza di <i>Staphylococcus aureus</i> , scarsa presenza di <i>Alpha streptococcus</i>	Positivo per <i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^7 <i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo per <i>Staphylococcus aureus</i>
70	2	Notevole presenza di <i>Serratia liquefaciens</i> , scarsa presenza di <i>Alpha streptococcus</i>	Positivo per <i>Serratia liquefaciens</i>	$> 10^8$ <i>Serratia liquefaciens</i>	Positivo per <i>Serratia liquefaciens</i>
71	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
72	3	Moderata presenza di <i>Enterobacter aerogenes</i>	Positivo per <i>Enterobacter aerogenes</i>	1×10^7 <i>Enterobacter aerogenes</i> , 1×10^6 <i>Serratia liquefaciens</i>	Positivo per <i>Enterobacter aerogenes</i> , eventualmente positivo per <i>Serratia liquefaciens</i>
73	2	Flora normale	Flora normale	1×10^7 <i>Serratia liquefaciens</i>	Positivo per <i>Serratia liquefaciens</i>
74	4	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> , e di <i>Enterococchi</i>	Flora normale	Flora normale	Flora normale
75	2	<i>Enterobacter</i> , <i>Candida albicans</i>		1×10^4 <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Candida albicans</i>
76	4	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Candida albicans</i>		$> 1 \times 10^8$ <i>Enterobacter cloacae</i> , $1,5 \times 10^5$ <i>Candida albicans</i>	Positivo per <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Candida albicans</i>
77	4	Scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	Flora normale	1×10^8 <i>Haemophilus</i> , 1×10^6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> e Specie <i>Hor-modendrum</i> , 1×10^6 <i>Pasteurella</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i> , eventualmente positivo per <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Pasteurella</i>
78	3	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
79	2	Flora normale	Flora normale	Flora normale	Flora normale
80	3	<i>Alpha streptococcus</i> , <i>Neisseria</i>	Flora normale	1×10^8 <i>Haemophilus</i> , 1×10^7 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo per <i>Haemophilus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Come si può osservare nella tabella 2, il metodo clinico normale o di routine e il metodo quantitativo (che utilizzava lo stadio di digestione con saponina) vennero applicati a 80 campioni di espettorato e 29 risultati differivano. In 26 casi, il metodo quantitativo valutò un positivo quando il metodo clinico comune di laboratorio non lo riscontrava ed in tre casi il metodo clinico comune di laboratorio valutò un positivo i cui numeri non erano sufficientemente elevati da essere considerato un positivo da standard o norme quantitativi/e. Si è notato in particolare che in 7 pazienti venne trovato l'*Haemophilus influenzae* con il metodo quantitativo su piastre a cioccolato superiore a 10^7 per millilitro e non era stato riscontrato dal metodo clinico comune di laboratorio a causa della sovracrescita. Questo particolare orga-

nismo ha una grande importanza clinica nella polmonite. Inoltre, in quattro occasioni, presentavano sovracrescita o crescita sovrapposta altri organismi che costituivano doppie infezioni e non erano stati rilevati con l'analisi clinica normale di laboratorio. La maggior parte delle differenze nei risultati esposti nella tabella si trovavano nei lieviti, indicati come positivi dal procedimento quantitativo e non rilevati o considerati di scarsa crescita col metodo clinico comune di laboratorio.

La maggior parte delle differenze dei risultati esposti nella tabella si ebbe per i lieviti, indicati come positivi, dal procedimento quantitativo e non rilevati o considerati di scarsa crescita dal metodo clinico comune di laboratorio.

Qui di seguito, per mettere in relazione i ritrovati di

laboratorio con la storia del paziente, la tabella 3 mostra alcune correlazioni da autopsie della gola e dei polmoni. I risultati di queste correlazioni sono esposti nella tabella 3 che segue:

TABELLA 3

Paziente n.	Cultura	Risultati
I	Gola	Scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>
	Espettorato ⁺	1×10^5 <i>Candida albicans</i> , 1×10^5 <i>Proteus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
II	Gola	Flora normale
	Espettorato	10^8 <i>Haemophilus</i> , 10^6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 10^6 <i>Pasturella</i>
III	Espettorato	1×10^9 <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Gola	Moderata presenza di <i>Candida albicans</i>
IV	Gola	Scarsa presenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Espettorato	1×10^5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
V	Gola	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> Beta, scarsa presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Espettorato	10^5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Autopsia dei polmoni	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i>
VI	Gola	Scarsa presenza di <i>Candida albicans</i>
	Espettorato	$> 10^6$ <i>Candida albicans</i> , 10^5 <i>Serratia liquefaciens</i> , 10^5 <i>Pseudomonas</i>
VII	Gola	<i>Enterococcus</i> , <i>Escherichia coli</i>
	Espettorato	Fora normale
VIII	Espettorato	Fora normale
	Autopsia dei polmoni	<i>Enterobacter aerogenes</i>
IX	Bocca	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida tropicalis</i>
	Gola	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida tropicalis</i>
	Lingua	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida tropicalis</i>
	Espettorato	10^8 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 10^7 <i>Enterococcus</i>
X	Gola	<i>Lactobacillus</i> e <i>Candida albicans</i>
	Espettorato	10^8 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 10^8 <i>Enterobacter cloacae</i> , 15^5 <i>Candida krusei</i> , 10^4 <i>Candida tropicalis</i> , 10^5 <i>Torulopsis glabrata</i>
XI	Gola	Moderata presenza di <i>Staphylococcus aureus</i>
	Espettorato	1×10^7 <i>Staphylococcus aureus</i>

TABELLA 3 (Continuazione)

Paziente n.	Cultura	Risultati
5 XII	Gola	Notevole presenza di <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Candida albicans</i>
10	Espettorato	10^8 <i>Enterobacter aerogenes</i> e 10^5 <i>Candida albicans</i>
	Autopsia del sangue	<i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Pseudomonas</i>
15 XIII	Gola	Flora normale
	Espettorato	10^4 <i>Candida tropicalis</i> , 10^4 <i>Torulopsis glabrata</i>

⁺ Analisi quantitativa dell'espettorato.

20 Come appare dalla tabella 3, in alcuni casi la gola ha gli stessi organismi dell'espettorato, ciò che significa che il paziente era colonizzato o eventualmente c'era una contaminazione orale nel campione di espettorato. Culture ripetute e osservazioni su conteggi varianti eventualmente metterebbero in grado il medico di differenziare fra queste due possibilità. Se si è osservata colonizzazione si dovrebbero prendere allora precauzioni per impedire l'instaurazione di un'infezione dei polmoni. Inoltre, in molti casi, l'analisi quantitativa dell'espettorato rivela una forte infezione mentre l'analisi del campione prelevato dalla gola non lo fa, in quest'ultimo caso i dati dovrebbero supportare la conclusione che c'è una minima contaminazione nasofaringea e che è molto probabile in questo caso un'infezione dei polmoni.

Esempio III

Questo esempio viene presentato per illustrare l'azione mucolitica (capacità di degradare la viscosità) della saponina su un campione di espettorato clinico. Il campione di espettorato era di 2 millilitri di un espettorato di grado 2 come definito nel precedente esempio II. Per misurare la viscosità del campione si costruì un piccolo viscosimetro come descritto in «Un semplice procedimento per misurare la viscosità dell'espettorato», A.O. Jenssen, *Scand. J. Resp. Dis.*; 54, 290-296 (1973). Questo viscosimetro comprendeva un unico blocco di materiale plastico, la cui faccia inferiore faceva da base. In questa faccia inferiore si praticò un canale, di sezione semicircolare, terminante in un foro verticale tale da inserirsi in un raccordo ad Y, un ramo del quale era collegato tramite una manichetta di plastica ad un regolatore del flusso d'aria mentre l'altro ramo del raccordo ad Y era collegato con manometro ad acqua tramite un tubo di plastica. Un'apertura per lo scarico dell'aria venne praticata nel foro verticale poco al di sopra del canale. Si misurarono variazioni della pressione, come abbassamento di altezza della colonna d'acqua nel manometro. Il tempo richiesto per vuotare il viscosimetro venne registrato in secondi. Per misurare la viscosità di un dato campione, si collocò l'espettorato su di una piastra di vetro. Il viscosimetro, a flusso d'aria costante, venne collocato sull'espettorato che riempiva il canale del viscosimetro. Si chiuse una apertura di sfogo dell'aria sul lato del viscosimetro. Si registrò il tempo necessario per vuotare il viscosimetro e la massima deflessione di altezza della colonna d'acqua. La variazione nell'altezza in millilitri della colonna d'acqua venne convertita in millilitri di mercurio (pressione) moltiplicando per 0,00881. Allora, secondo l'articolo di Jenssen,

la pressione $\times$ secondi $\times K$ = viscosità, in cui K è una costante di calibrazione per il viscosimetro.

Il viscosimetro venne calibrato rispetto ad un viscosimetro di Oswald usando glicerina come standard primario. Per questo viscosimetro $K = 13,5 \times 10^3$. Le viscosità ottenute con espettorato di grado 2, con e senza aggiunta della saponina purificata, descritta negli esempi I e II, sono riportate nella seguente tabella 4:

TABELLA 4

Azione mucolitica della Saponina su un campione dell'espettorato clinico

5	Natura dell'espettorato: 2 ml di un espettorato di grado 2,0	Centipoise
	A. Viscosità di 5 differenti porzioni prima	881
10	dell'aggiunta di saponina:	1.332
		14.295
		19.929
		6.962

15		$\bar{X} = 8678$
		s.d. = 8306
	B. Viscosità di 4 differenti porzioni dopo	166
	l'aggiunta di 0,1 ml di saponina 13%:	177
20		161
		172

		$\bar{X} = 169$
		s.d. = 7
25	Come si può osservare, l'azione della saponina digeriva efficacemente l'espettorato e dava luogo ad una viscosità praticamente uniforme di tutte le porzioni.	