

1917: Un metodo “micologico” per la ricerca degli zuccheri nelle urine

G. Dall'Olio

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale “S. Bortolo”, Vicenza

Riassunto

In una pubblicazione del 1917 viene proposto dal medico italiano Aldo Castellani, notissimo per la sua attività e le sue scoperte nel campo della Batteriologia e della Medicina Tropicale, un metodo per rilevare il glucosio ed altri zuccheri in campioni di urina basato sulle proprietà di certi funghi di fermentare gli idrati di carbonio. La procedura di analisi non è usuale per un chimico clinico: non è rapida come i molti metodi chimici per la misura della glicosuria in uso fin dalla seconda metà dell'Ottocento e non altrettanto semplice nell'esecuzione. Castellani e i suoi collaboratori, avvezzi ai lunghi tempi delle metodiche microbiologiche, indicano come punto di forza del metodo la sua capacità di individuare e differenziare il tipo di zucchero presente nel campione in esame (glucosio, levulosio, galattosio, maltosio, saccarosio, lattosio), utilizzando la specificità di azione di diversi funghi del genere *monilia* sui diversi carboidrati.

Summary

1917: A mycological method for detection of different sugars in urine.

In 1917 Aldo Castellani, an Italian physician well known for his work and his discoveries in bacteriology and tropical diseases, reported a method for the detection of glucose and other sugars in urine based on the power of certain species of hypomycetes to ferment carbohydrates. The analytical process is quite uncommon for a clinical chemist: many chemical methods for urine glucose analysis used in second half of 19th century required less time and work. Castellani and co-workers, accustomed to the tedious microbiological methods, point out the major strength of the mycological test: the capability to detect and separate different sugars (glucose, levulose, galactose, maltose, lactose or pentoses) in urine analysis employing the specific actions of the different *monilia* mushroom on different carbohydrates.

“Vari carboidrati e altri composti del carbonio sono correntemente utilizzati nell'identificazione di certi batteri e funghi superiori. Anche il processo inverso può essere messo in atto, cioè, certi ifomiceti e batteri che mostrano reazioni biochimiche stabili possono essere usati in patologia nella determinazione di vari carboidrati e altri composti del carbonio”¹. A proporre questo ingegnoso metodo per la ricerca qualitativa degli zuccheri nei liquidi biologici sono Aldo Castellani e Frank E. Taylor in un articolo originale sul *British Medical Journal* del dicembre 1917 (Figura 1). Taylor è batteriologo all'Università di Londra e patologo all'ospedale oftalmologico di Westminster, mentre Castellani, all'epoca della pubblicazione del lavoro, è ufficiale medico della Marina Militare Italiana e membro della commissione sanitaria permanente interalleata.

Aldo Castellani

Aldo Castellani (Firenze 1874 – Lisbona 1971) è già molto noto a livello mondiale negli ambienti della Batteriologia e della Medicina Tropicale soprattutto per alcuni suoi studi e scoperte che risalgono agli anni immediatamente successivi alla laurea in Medicina (Firenze, 1899): il test dell'assorbimento delle agglutinine (test di Castellani) usato nella dia-

gnostica di laboratorio per la differenziazione di batteri affini, messo a punto durante un periodo di studio all'Istituto di Igiene di Bonn, e ancor più per aver individuato nel 1902, quale batteriologo di una spedizione in Uganda della Scuola di Medicina Tropicale di Londra, la presenza di un *Tripanosoma* nel liquor di un ragazzo affetto dalla “malattia del sonno” (*Tripanosoma ugandense* poi detto *gambiense*). Nel 1903 dimostra sperimentalmente che il tripanosoma è l'agente della malattia (Tripanosomiasi africana o Castellanososi). Nello stesso anno, non ancora trentenne, viene nominato dal Colonial Office del Governo Britannico professore di Medicina Tropicale e direttore dell'Istituto di Batteriologia di Colombo (Ceylon), cariche che ricopre fino al 1915 quando ritorna in Italia chiamato dal Servizio Sanitario della Marina Militare Italiana. Gli viene affidata la cattedra di Medicina Tropicale a Napoli (dove peraltro non esisteva la struttura). Interessante e scientificamente fecondo il periodo di Ceylon dove scopre l'agente eziologico di alcune malattie, impegnativo ma denso di riconoscimenti anche il periodo bellico dove dimostra le sue notevoli doti di organizzatore e la sua profonda preparazione di clinico e batteriologo (opera in Ita-

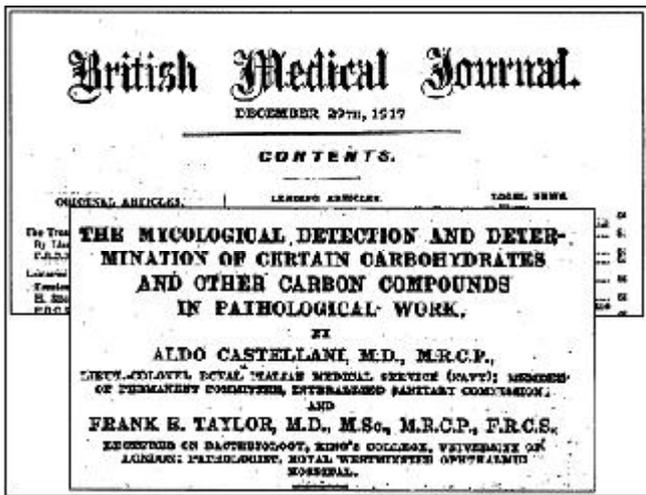


Figura 1. "British Medical Journal", 29 dicembre 1917.

lia, Macedonia, Francia, Inghilterra).

Alla fine della guerra accetta l'incarico di docente di Medicina Tropicale e Dermatologia al Ross Institute di Londra, nel 1919 ottiene la Cattedra di Medicina Tropicale alla Tulane University di New Orleans (poi alla Louisiana State University), nel 1926 è direttore del reparto di Medicina Tropicale e Dermatologia al Ross Institute di Londra e nel 1930 gli viene affidata la cattedra di Medicina Tropicale a Roma. Per poter seguire tutti gli incarichi accademici, Castellani deve fare la spola fra Inghilterra, Stati Uniti, Italia: sei mesi a Londra, tre mesi a New Orleans e tre a Roma. Numerose le pubblicazioni (fra cui spiccano le due edizioni -1910, 1918 - del "Manual of Tropical Medicine") e le onorificenze: cavaliere di S. Michele e S. Giorgio in Inghilterra (H.K.C.M.G.) nel 1926; senatore del Regno d'Italia (1929) e accademico dei Lincei (Figura 2).

Quale profondo conoscitore di malattie tropicali, nel 1935 deve rivestire la divisa per assumere la direzione della Sanità Militare nella spedizione militare italiana in Etiopia. Nel breve periodo di pace che ne segue continua l'attività accademica e scientifica fra Europa e Stati Uniti. E' proprio in Inghilterra quando l'Italia entra nella seconda guerra mondiale ("il giorno più tragico della mia vita" scrisse nella interessante autobiografia²). Tramite l'ambasciata italiana rientra in patria, diviene direttore dei Servizi Sanitari delle truppe italiane in Africa (in Tripolitania e Cirenaica continua le sue ricerche) e quindi capo della Sanità di tutti i fronti al comando Supremo di Roma (1942). Dopo l'armistizio torna alla direzione della Clinica delle Malattie Tropicale



Figura 2. Aldo Castellani (1874-1971)

li di Roma e alla fine del conflitto, scagionato dall'accusa di collaborazione con i nazi-fascisti, è definitivamente reintegrato nei ruoli accademici. Due giorni dopo il plebiscito Repubblica-Monarchia (5 giugno 1946) lascia ancora l'Italia per seguire la famiglia reale in Portogallo su espressa richiesta di Umberto di Savoia. Qui continua la sua attività accademica e scientifica: nel 1947 il governo portoghese lo nomina professore di malattie tropicali all'Università di Lisbona, città che lo ospiterà fino alla morte. Anni fecondi che lo vedranno ancora attivo nel campo della microbiologia, della clinica, della terapeutica.

Medico di fiducia di Marconi, Pio XII, Mussolini, di Casa Savoia, ebbe numerosissime onorificenze. Lascia al mondo scientifico oltre 500 pubblicazioni e 6 opere monografiche tanto da essere annoverato tra i grandi medici italiani^{3,4}.

Il "metodo micologico coniugato o parallelo"

Agli inizi del Novecento parecchi sono i metodi in uso nei laboratori di chimica clinica per la determinazione della glicosuria: fisici, biologici, chimici. Di questi ultimi ne esiste una grande varietà: sono basati sull'azione riducente degli zuccheri sui sali di rame o di bismuto, o sulla reazione con fenilidrazina. Castellani fa notare come tutti questi metodi possano dare reazione positiva non solo in presenza di glucosio ma anche di levulosio, galattosio, maltosio, saccarosio e talvolta lattosio, cosicché un campione di urina positivo potrebbe contenere, insieme o separatamente, ognuno dei sei sopraccitati zuccheri (sostanze che egli indica come capaci di "ridurre il liquido di Fehling").

I metodi biologici, curiosi per un laboratorista di chimica clinica e sicuramente a prima vista poco pratici, sfruttano la proprietà di certi funghi di fermentare gli idrati di carbonio con sviluppo di gas.

Nel suo lavoro Castellani suggerisce un metodo (che egli denomina "micologico coniugato o parallelo") per identificare con sicurezza il tipo di zucchero presente nelle urine o altri liquidi utilizzando la specificità di azione di un certo fermento su un determinato zucchero. Usa allo scopo funghi del genere *monilia*, dei quali può disporre essendo stati oggetto di suoi precedenti studi.

Così, volendo disquisire circa la presenza in un liquido del glucosio piuttosto che del lattosio o del maltosio, la metodica consigliata dagli autori prevede: distribuzione del liquido in esame in due tubi da saggio (tubi 1 e tubo 2), aggiunta ad ognuno di una determinata quantità di acqua peptonizzata all'1%, introduzione in ciascun tubo di un tubicino di Durham per la raccolta e messa in evidenza dei gas che si svolgono, inoculazione del tubo 1 con *Monilia balcanica* Castellani e del tubo 2 con *Monilia pinoyi* Cast., incubazione a 37°C per 48 ore e quindi osservazione dei risultati. Per la loro interpretazione si deve ricordare che: *M. balcanica* Cast. produce gas in presenza di glucosio ma non ha azione alcuna sul maltosio o lattosio, *M. pinoyi* Cast. fermenta glucosio e maltosio ma non il lattosio. Quindi se ambedue i tubi mostrano sviluppo di gas lo zucchero nel campione deve essere glucosio; se nel tubo 1 non si nota gas mentre lo si ritrova nel tubo 2 lo zucchero deve essere maltosio; se in nessuno dei due tubi si riscontra presenza di gas lo zucchero è lattosio.

Volendo poi indagare circa la presenza in un campione di

Table showing Identification of Certain Ferthing-reducing Substances.

<i>M. balcanica</i> Cast.	<i>M. krusei</i> Cast.	<i>M. pinoyi</i> Cast.	<i>M. metalondinensis</i> Cast.	<i>B. para-typus</i> B. Schott.	<i>B. coli</i> Eschl.	Reducing Substances
+	+	+	+	+	+	Glucose.
0	+	+	+	+	+	Levulose.
0	0	+	+	+	+	Maltose.
0	0	0	+	+	+	Galactose.
0	0	0	0	+	+	Pentose.
0	0	0	0	0	+	Lactose.
0	0	0	0	0	0	Non-fermentable reducing substances of the groups creatin, hippuric acid, uric acid, etc.

+ = Production of gas; simple acid fermentation is not taken into account.
0 = No gas.
The reducing substance is made into a 1 per cent. peptone water solution. Selected strains of the various organisms with permanent biochemical reactions and producing a large amount of gas should be used.

Figura 3. Tavola per la interpretazione dei risultati del test "micologico"

glucosio, levulosio, maltosio, galattosio, saccarosio, lattosio basterà inoculare 5 tubi diversi, contenenti il campione in esame, rispettivamente con *M. balcanica* Cast., *M. krusei* Cast., *M. pinoyi* Cast., *M. metalondinensis* Cast., *M. tropicalis*. Si osserva lo sviluppo di gas (dopo 48 ore di incubazione) nei vari tubi da saggio ricordando le reazioni biochimiche delle cinque monilie. *M. balcanica* Cast. produce gas esclusivamente con glucosio; *M. krusei* Cast. con glucosio e levulosio; *M. pinoyi* Cast. con glucosio, levulosio e maltosio; *M. metalondinensis* Cast. con glucosio, levulosio, maltosio e galattosio; *M. tropicalis* con glucosio, levulosio, maltosio, galattosio e saccarosio. Per la interpretazione dei risultati, Castellani e Taylor presentano una tavola ed una chiave di lettura (Figura 3). Così, se i tubi 1,2,3 non mostrano sviluppo di gas mentre questo è messo in evidenza dal tubicino di Durham nel tubo 4 la sostanza riducente presente nel campione è galattosio.

Gli autori concludono ricordando che i loro esperimenti sono stati condotti su campioni di urina normali ai quali avevano aggiunto vari zuccheri ("provided that the amount of such substances present is not too minute, not less than 0.1 per cent.") e su urine patologiche. Le urine devono essere distribuite in tubi sterili ed inoltre è importante che esse stesse lo siano. Se non è possibile raccoglierle in maniera asettica dovranno essere sterilizzate, dopo distribuzione nei tubi, per 30 minuti in due giorni consecutivi in una stufa di Koch (vapore a 100°C a pressione ordinaria) e non in autoclave dove potrebbero essere alterate le caratteristiche degli zuccheri presenti. Inoltre ribadiscono l'importanza dell'aggiunta dell'acqua peptonizzata per favorire la crescita dei funghi che nella sola urina si svilupperebbero lentamente e potrebbero non dare luogo a formazione di gas¹.

Conclusioni

Rispetto ai metodi chimici, il test *micologico* non si può certo dire rapido se si considerano i tempi per la sterilizzazione della vetreria, dei campioni di urina e l'incubazione (48 ore)!



Figura 4. "La Riforma Medica", 20 novembre 1920

Il punto di forza sta senz'altro nella possibilità che esso offre di poter distinguere i vari zuccheri. Il lavoro di Castellani viene ripreso da un suo allievo e collaboratore italiano, il dottor Igino Iacono (coautore con il maestro di un "Manuale di Clinica Tropicale" (1937)), in una breve nota nel 1920 dove si limita ad una descrizione del metodo⁵ (Figura 4) e in un lavoro originale del 1921: "avendo il Castellani offerto all'Istituto di Patologia medica della nostra università (Napoli) alcuni funghi della sua preziosa collezione, ho voluto sperimentare il valore di queste monilie nella ricerca degli zuccheri, non solo nelle urine ma anche in altri liquidi organici, come l'essudato pleurico e il liquido cefalo-rachidiano". Conclude: "al lato delle abituali prove di riconoscimento degli zuccheri nelle urine e in alcuni altri liquidi organici si può con vantaggio usare questo metodo microbiologico del Castellani, che è di rapida e semplice esecuzione, non è meno sensibile delle altre comuni prove, e certamente più preciso perché ci identifica con sicurezza anche la qualità dello zucchero in una urina od altro liquido contenuto. L'uso sistematico di questo metodo potrà realizzare grandi vantaggi in clinica per lo studio del ricambio de' vari idrati di carbonio ne' diabetici e negl'individui normali ed avere, anche, applicazioni nel campo industriale"⁶.

Bibliografia

1. Castellani A, Taylor FE. The mycological detection and determination of certain carbohydrates and other carbon compounds in pathological work. *BMJ* 1917; 29 dic.:855-7.
2. Castellani A. *Microbes, men and monarchs. A doctor's life in many lands.* Gollancz LTD:Londra; 1960.
3. Binazzi M. Aldo Castellani. Ricordo di un grande medico italiano. *Federazione Medica* 1990; 43:263-9.
4. Amalfitano G. Castellani, Aldo Luigi Mario. In *Dizionario Biografico degli Italiani*. Società grafica romana: Roma; 1978.
5. Iacono I. Le culture microbiologiche applicate alla ricerca degli zuccheri nelle urine. *La Riforma Medica* 1920; 36:1075.
6. Iacono I. Ricerca qualitativa degli zuccheri nelle urine ed in alcuni liquidi organici col metodo Castellani. *Studium. Rivista di Scienza Medica* 1921; 11:372-4.