



ISTITUTO DI SANITÀ PUBBLICA

Prof. ROMANO MAGGIORA-VERGANO

*Capo del Laboratorio di Micrografia e Batteriologia*

# ULTERIORI TENTATIVI DI RICUPERO DI VIRULENZA DEI B. DI K. ATTENUATI

Estratto dalla Rivista Lotta contro la Tubercolosi - Anno VII, n. 8 - Agosto. 1936-XIV



STABILIMENTO TIPOGRAFICO "EUROPA",  
ROMA - VIA DELL'ANIMA, 46

Miss  
B  
54  
12



Prof. ROMANO MAGGIORA-VERGANO

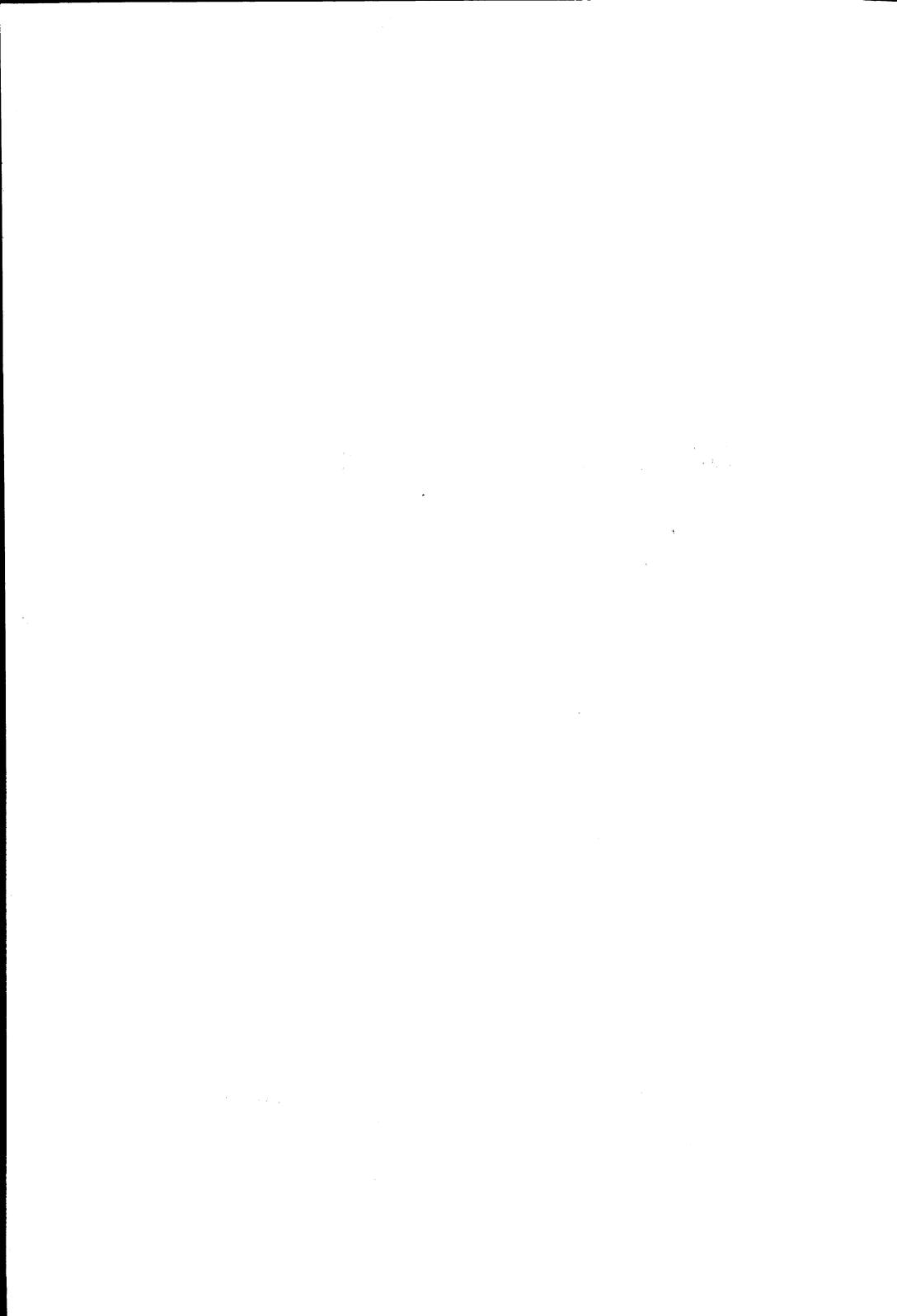
*Capo del Laboratorio di Micrografia e Batteriologia*

# ULTERIORI TENTATIVI DI RICUPERO DI VIRULENZA DEI B. DI K. ATTENUATI

Estratto dalla Rivista **Lotta contro la Tuberculosis** - Anno VII, n. 8 - Agosto 1936-XIV



STABILIMENTO TIPOGRAFICO "EUROPA",  
ROMA - VIA DELL'ANIMA, 46



In una precedente nota sul ricupero di virulenza da parte del bacillo tubercolare attenuato, fatto in collaborazione col prof. A. ILVENTO (1) riferivamo sulla possibilità che stipiti attenuati di bacilli tubercolari di origine umana e bovina, potessero riacquisire la loro virulenza in seguito a passaggi ripetuti su terreni nutritivi speciali.

A tale scopo fu preso in considerazione il terreno proposto da SAUTON e modificato da K. T. SASANO ed E. M. MEDLAR (2) che, come è noto ha la seguente composizione:

Fosfato potassico .....	gr.	0,5
Solfato di magnesio .....	»	0,5
Acido citrico .....	»	2,0
Asparagina .....	»	4,0
Citrato di ferro ammoniacale .....	»	0,05
Glicerina .....	cmc.	35
Acqua distillata .....	cc.	10000

Il pH va riportato a 6,8 mediante soluzione di carbonato di sodio. Dopo sterilizzazione aggiungere il 10% di siero normale di coniglio riportando prima dell'innesto il pH. a 7,2-7,4 perchè il terreno culturale risulta instabile e d'altra parte tale reazione è necessaria per lo sviluppo rigoglioso delle culture. Si badi che gli stessi AA. consigliano di non adoperare siero tindalizzato a 56°, ma siero fresco senza sottoporlo ad alcun trattamento.

Con questo terreno i citati AA. hanno potuto ottenere un ritorno di virulenza considerevole, tanto che con un'iniezione endovenosa di 1 mmgr. di cultura del terzo o quarto passaggio, SASANO e MEDLAR sono riusciti a produrre la morte del coniglio al 30°-50° giorno con tubercolosi generalizzata. Inoltre con 1 mmgr. di cultura del 5° e 7° passaggio, la morte avveniva in 11-12 giorni e con mmgr. 0,1 di cultura all'8° passaggio si aveva la morte al 30° giorno pure con tubercolosi generalizzata. Con culture dell'8° passaggio furono inoculate per via sottocutanea con mmgr. 0,02 alcune cavie che morirono dopo 60 giorni.

(1) A. ILVENTO ed R. MAGGIORA-VERGANO: *Ricupero di virulenza da parte di bacilli tubercolari attenuati*. « Lotta contro le tubercolosi », anno III, n. 12, 1932-XI.

(2) K. T. SASANO and E. M. MEDLAR: *Studies of the Bacillus Calmette-Guérin strain of the tubercle bacillus*. « Tubercle », 1931.

Contemporaneamente furono trattati due vitelli per via endovenosa con mmgr. 3 ed un vitello con mmgr. 0,8; i primi morirono con tbc. generalizzata dopo 24 giorni ed il secondo dopo 34 giorni. Lo stesso stipite passato su terreno Petroff e così virulentato, ha conservato in seguito la sua virulenza in modo tale da produrre la morte della cavia in un tempo relativamente breve.

Come conclusione gli AA. ritengono che è possibile ottenere la rivirulentazione di uno stipite attenuato di b. tubercolare bovino mediante l'aggiunta di siero di coniglio fresco al terreno di Sauton.

Nel già citato lavoro di A. ILVENTO e di R. MAGGIORA-VERGANO fu ripreso lo studio del ricupero di virulenza da parte di culture attenuate di bacillo tubercolare, non dello stipite bovino come avevano fatto SASANO e MEDLAR, ma di uno stipite umano attenuatosi spontaneamente in laboratorio con ripetuti passaggi su terreno Lubenau. I risultati furono comunicati al III Congresso Nazionale della tubercolosi, e riassunti in una nota pubblicata su questa stessa rivista (1).

Senonchè le culture di rivirulentazione in quella serie di prove furono fatte adoperando il terreno Sauton con aggiunta di siero fresco di coniglio per seguire esattamente il metodo di SASANO e MEDLAR.

Il risultato come si è detto è stato negativo, nel senso che su quindici cavie inoculate con culture ripetutamente passate su questo terreno, comparativamente ad altre dieci inoculate con culture di bacillo tubercolare M. passato sul comune terreno Lubenau, nessuna ha presentato lesioni specifiche.

Concludevamo pertanto che contrariamente a quanto era stato affermato da SASANO e MEDLAR, a parte la differente origine del ceppo, a noi non era riuscito di ottenere la rivirulentazione dello stipite M. anche dopo l'8° passaggio sul terreno proposto da questi AA.

PROVE DI RIVIRULENTAZIONE DELLO STIPITE TBC. M. CON PASSAGGI SU TERRENO DI SAUTON  
MODIFICATO DA SASANO E MEDLAR; CON AGGIUNTA DI SIERO UMANO

1° passaggio: 23 aprile	1933-XI	sviluppo scarso
2° » 23 giugno	1933-XI	» »
3° » 10 luglio	1933-XI	» »
4° » 9 settembre	1933-XI	» buono
5° » 28 dicembre	1933-XII	» abbondante
6° » 7 febbraio	1934-XII	» »

Facevamo peraltro una riserva e cioè, che rimaneva ad accertare se si potesse ottenere il ripristino della virulenza aggiungendo al terreno di cultura siero di sangue umano normale fresco; perchè nel nostro caso (stipite tbc. M.) si trattava di bacillo umano, invece lo stipite usato da SASANO e MEDLAR era di origine bovina, ed il siero di coniglio poteva essere un ottimo terreno di sviluppo, mentre si ritiene che non lo sia per lo stipite umano.

(1) R. MAGGIORA-VERGANO ed A. ILVENTO: *L'infezione tubercolare latente negli animali da esperimento*. « Rivista di Patologia e Clinica della tubercolosi », anno IV, fasc. 11, pag. 81.

A complemento di quanto sopra esposto, ho completato la serie delle prove e con la presente nota riferisco su di esse, riunendo nelle due tabelle allegate i risultati delle esperienze.

Nella prima ho riunito i dati riguardanti i singoli passaggi dello stipite M. sul terreno Sasano-Medlar con aggiunta di siero di sangue umano fresco per 6 passaggi consecutivi. Tali passaggi hanno richiesto un considerevole spazio di tempo e cioè dal 23 aprile 1933 al 7 febbraio 1934, circa 10 mesi, perchè i primi trapianti sono stati particolarmente tardivi e scarsi di sviluppo, mentre i successivi divennero sempre più rigogliosi, tanto che al 5° e 6° passaggio lo sviluppo è stato senz'altro abbondante.

L'azione del sangue umano, sullo sviluppo del b. tubercolare, sia integro sia parziale come siero, è stata studiata da diversi AA.; la proprietà agevolante del sangue aggiunto ai terreni di cultura sullo sviluppo del b. di K. era già stata studiata da RONDONI (1) sin dal 1924 e recentemente confermata dal PETRAGNANI (2), dalla DE SANTIS (3) e da altri.

I sunnominati AA. hanno potuto constatare che specialmente nei terreni sintetici, quale appunto è il terreno di Sauton, modificato da SASANO e MEDLAR, l'aggiunta di sangue *in toto* o di siero, ha un'azione favorevole ed acceleratrice sullo sviluppo del bacillo di K. e ciò contrariamente a quanto afferma LOEWENSTEIN, il quale ritiene che l'ematina ed altri costituenti del sangue possano avere un'azione inibente, donde la necessità, secondo LOEWENSTEIN di eliminare l'emoglobina dai terreni di cultura del bacillo di Koch.

Rimane tuttavia accertato che il siero ed il sangue normale, fatte le dovute riserve per le eventuali influenze che può avere la specie animale cui essi appartengono, hanno un'azione sicuramente accelerante sulla crescita del germe; era quindi non privo di interesse vedere se ad uno sviluppo precoce e rigoglioso, corrispondesse anche un eventuale ricupero di virulenza da parte di stipiti attenuati di b. di tipo umano.

Nei primi passaggi si è incontrata qualche difficoltà dovuta al fatto che lo stipite M. era ormai abituato da anni a svilupparsi sui terreni all'uovo (LUBENAU e PETRAGNANI) e quindi il passaggio da un terreno di composizione così diversa, come quella del terreno di Sauton modificato da S. e M., ha in un primo tempo ostacolato lo sviluppo non ostante la presenza del siero fresco di sangue umano. In seguito però è stato possibile ottenere una rigogliosa cultura su questo terreno e procedere alle prove sugli animali per stabilire se eventualmente lo stipite attenuato M. avesse riacquisita la sua virulenza rispetto ai comuni animali da esperimento e nel nostro caso per la cavia trattandosi di ceppo umano. A tale scopo sono state inoculate sottocute 10 cavie, 5 con gr. 0,01 e 5 con gr. 0,001 di patina di cultura di stipite M. del 6° passaggio su terreno con aggiunta di siero fresco umano.

(1) P. RONDONI: *Influenza di organi e di sostanze bacillari sullo sviluppo culturale del bacillo tubercolare*. «Lo Sperimentale», 1935, pag. 509; Id.: *A proposito dell'influenza del siero di sangue sullo sviluppo culturale del b. di Koch*. «Boll. dell'Istituto Sieroterapico Milanese», 1935-XIII, vol. XIV, pag. 386.

(2) G. PETRAGNANI: *Il sangue defibrinato come terreno di arricchimento dei B. K.* «Atti R. Accademia dei fisiocritici in Siena», 18, VII, 1934-XII.

(3) M. DE SANTIS: *Se il siero di sangue dei tubercolosi abbia potere battericida o inibitore rispetto al b. tubercolare*. «Boll. dell'Istituto Sieroterapico Milanese», vol. XIV, 1935, fasc. 1°, pag. 60.

PROVE DI RIVIRULENTAZIONE DELLO STIPITE TBC. M. SU SAUTON ED INIEZIONE NEI CONIGLI  
E NELLE CAVIE. — VI PASSAGGIO - 7 FEBBRAIO 1934-XII.

		peso gr.	22-2-1934-XII		peso gr.
<i>Gabbia N. 3</i> Coniglio	Bianco naso e orecchie nere zampe anteriori scure.	1800	Iniezione sottocute gr. 0,01	muore 10- 1-35	1900
<i>Gabbia N. 22</i> Coniglio	Grigio-ferro.	1730	»	» 17- 7-34	1900
<i>Gabbia N. 49</i> Coniglio	Bianco naso e orecchie brune zampe anteriori nocciola.	1550	»	» 26- 8-34	1060
<i>Gabbia N. 0119</i> Coniglio	Grigio-ferro zampe anteriori chiare.	1600	»	» 13- 9-34	1650
<i>Gabbia N. 62</i> Coniglio	Bianco pezzato grigio.	1850	»	» 30-12-34	1570
<i>Gabbia N. 211</i> Cavia	Bianca emcintura d. nera oc. d. nero.	320	»	» 29- 9-34	375
»	Bianca oc. s. nera coc- cige giallo.	360	»	» 13- 7-34	375
»	Bianca posteriore gial- lo oc. neri.	320	»	» 18- 7-34	420
»	Bianca guancia sin. screz. cocolla gialla.	370	»	» 12- 3-34	350
»	Bianco muso d. gialle sin. nero coscia d. gialla.	405	»	» 17- 4-35	600
<i>Gabbia N. 0214</i> Cavia	Bianca guancia e post. sin. gialli.	370	Iniezione sottocute gr. 0,001	uccisa 17- 4-35	550
»	Guancie e coccige gial- li bianca.	390	»	muore 12-12-34	520
»	Bianca oc. d. marrone.	390	»	» 18- 9-34	490
»	Bianca oc. s. nero or. giallo.	450	»	» 24- 9-34	620
»	Bianca post. giallo or. d. nero.	380	»	» 16- 3-34	370

N E S S U N A L E S I O N E T U B E R C O L A R E

Ho ritenuto opportuno inoculare anche 5 conigli con gr. 0,01 per avere ancora una volta la conferma sulla natura dello stipite ed ho potuto constatare che soltanto in due animali morti dopo qualche mese vi era traccia al punto d'innesto dell'avvenuta inoculazione e che nei rimanenti tre conigli deceduti dopo parecchio tempo, da 7 ad 11 mesi, non è stato possibile rilevare alcuna lesione di origine tubercolare.

Anche nelle cavie trattate con differenti dosi di cultura non si sono riscontrate lesioni specifiche. Tutti gli animali inoculati il 7 febbraio 1934, in un primo tempo sono aumentati di peso ed in seguito nello spazio di 14 mesi sono venuti eliminandosi, per cause diverse: l'ultima cavia fu sacrificata il 17 aprile 1935, ed anche questa fu trovata indenne da qualsiasi lesione tubercolare in atto o pregressa.

Lasciando a parte le prove fatte sui singoli conigli, che del resto sono state negative come era da attendersi, e limitandoci a considerare i risultati ottenuti sulle cavie, possiamo dire che le 10 cavie, tanto quelle inoculate con gr. 0,001, quanto quelle inoculate con forti quantità (gr. 0,01), non presentano alcuna lesione tubercolare.

Si può quindi concludere che lo stipite attenuato M. che già ci aveva dato risultati negativi nei riguardi della rivirulentazione, se coltivato su terreni con aggiunta di siero di sangue di coniglio, non modifica il grado di attenuazione neppure con l'aggiunta di siero umano fresco; che se l'aggiunta di sangue o di siero di sangue ai terreni culturali può influire sulla rapidità e sull'abbondanza dello sviluppo della patina culturale, non ha invece alcuna influenza sul ricupero di virulenza da parte di stipiti attenuati e nel caso nostro sullo stipite tbc. M.

55588



~~31/2~~

