



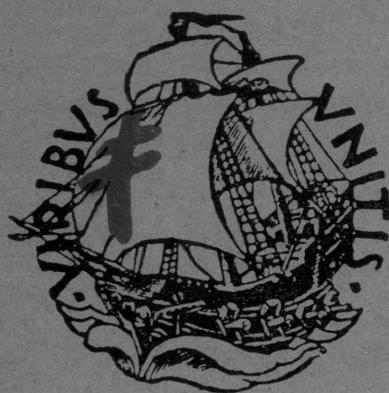
ISTITUTO D'IGIENE E BATTERIOLOGIA DELLA R. UNIVERSITA' DI SIENA
Direttore: prof. G. PETRAGNANI

Dott. MARIO CITERNI
Assistente

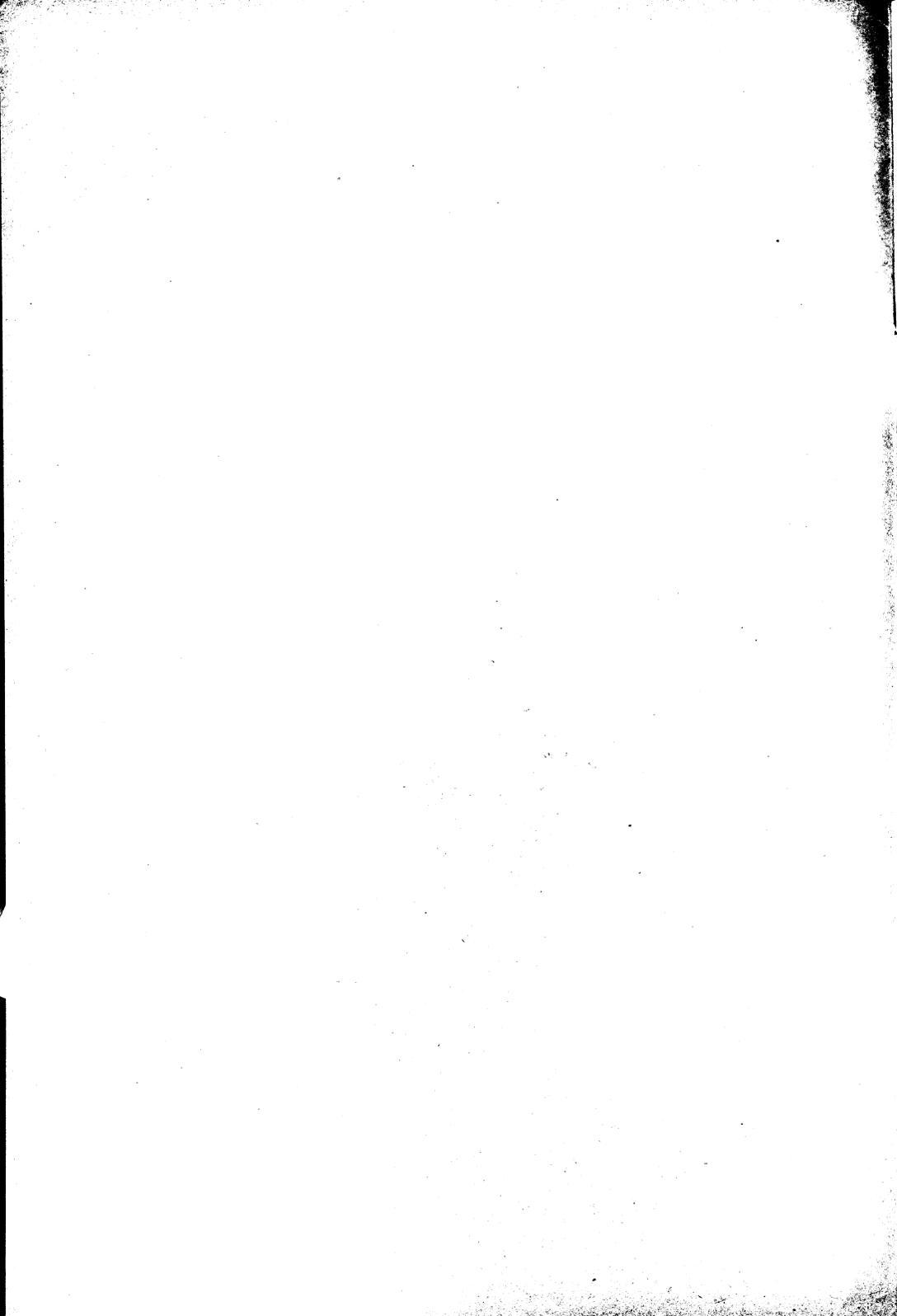
SUL POTERE BATTERICIDA "IN VITRO," DI ALCUNI ORGANI DI CAVIE TUBERCOLOSE VERSO IL BACILLO DI KOCH

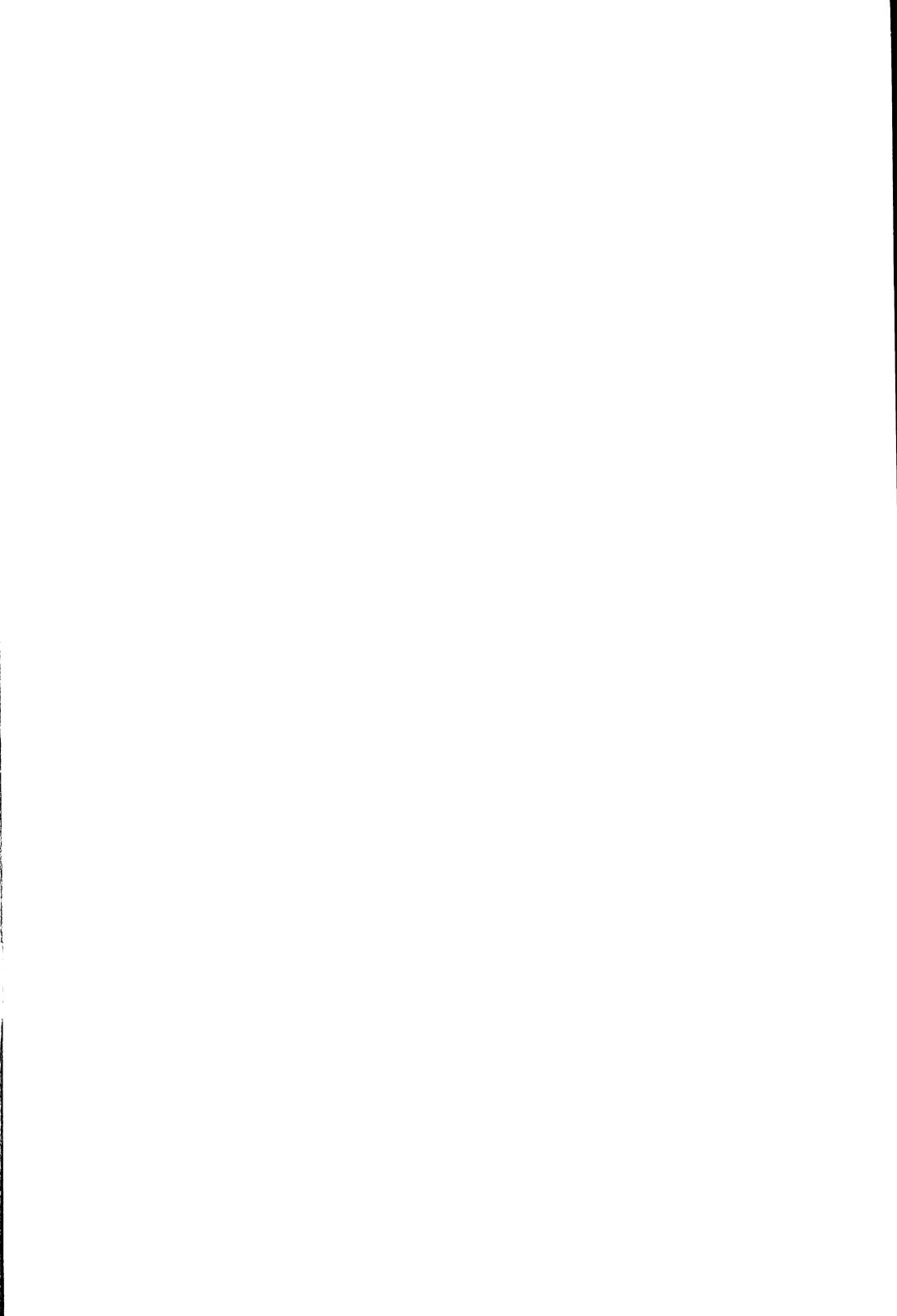
Estratto dalla Rivista "La lotta contro la tubercolosi", - Anno VIII, n. 7 - Luglio 1937-XV

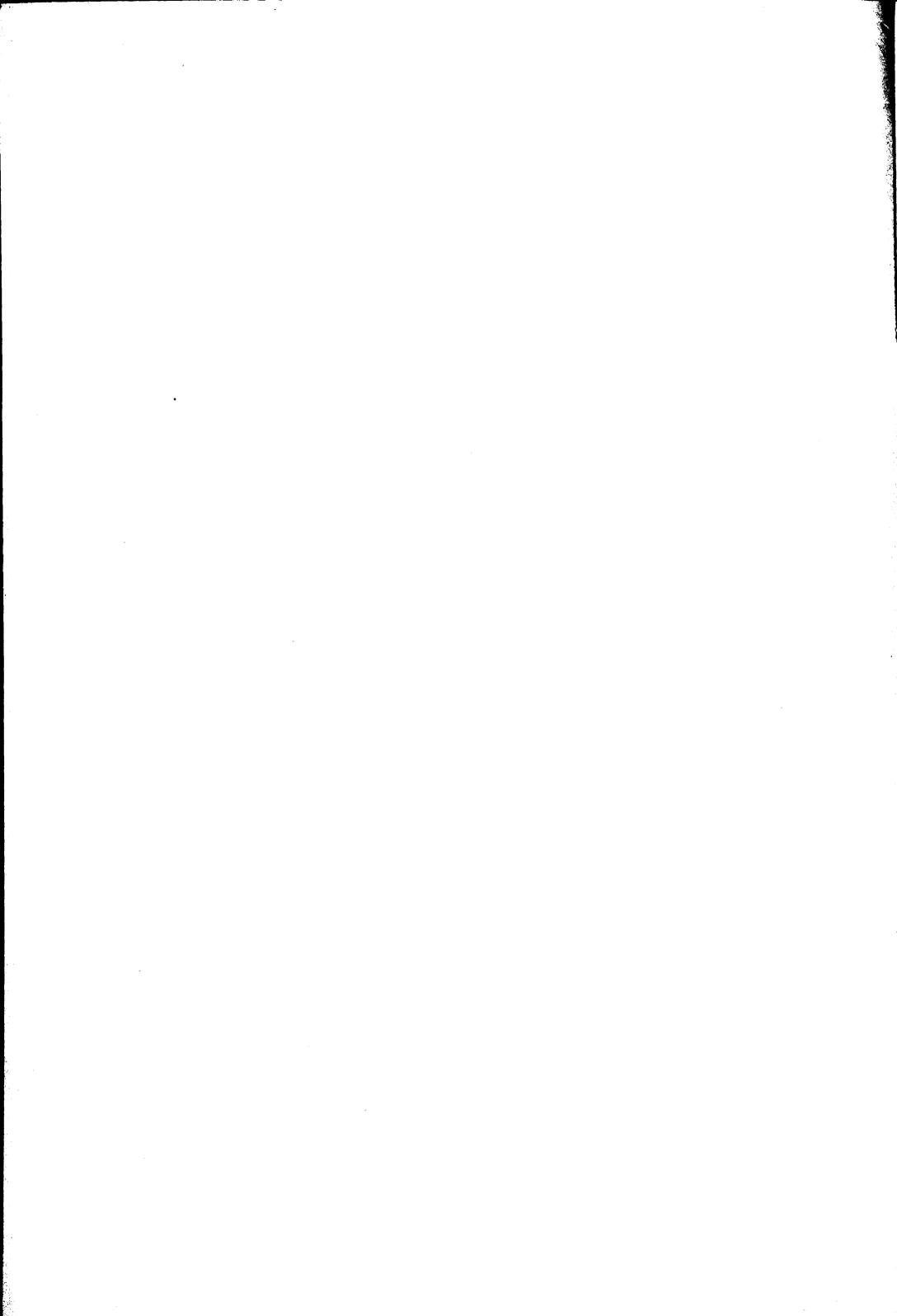
Mark
B
54
55



STABILIMENTO TIPOGRAFICO «EUROPA» - ROMA







ISTITUTO D'IGIENE E BATTERIOLOGIA DELLA R. UNIVERSITA' DI SIENA
Direttore: prof. G. PETRAGNANI

Dott. MARIO CITERNI
Assistente

SUL POTERE BATTERICIDA "IN VITRO,"
DI ALCUNI ORGANI DI CAVIE TUBERCOLOSE
VERSO IL BACILLO DI KOCH

Estratto dalla Rivista "La lotta contro la tubercolosi", - Anno VIII, n. 7 - Luglio 1937-XV



STABILIMENTO TIPOGRAFICO "EUROPA" - ROMA



A complemento di ricerche condotte in precedenza (11) mi fu affidato dal mio Maestro l'incarico di studiare l'azione che i tessuti degli animali tubercolosi esplicano verso i B. K. che ne sostengono l'infezione.

La maggior parte degli AA. che si sono interessati della questione, sono d'accordo nel riconoscere a questi tessuti una più o meno marcata attività antibacillare tanto *in vitro* che *in vivo*.

Già dal 1901 il MANFREDI (1) sostiene che i gangli linfatici, come sede abituale di microbismo latente, sono capaci di esercitare sul bacillo di Koch un'azione attenuatrice delle sue proprietà vitali che non sa se riferire ad attivi processi ossidativi o a prodotti di secrezione interna, o invece ad una azione anti-tossica specifica.

Nel *lupus*, MUCH (2) (1909) ha descritto forme bacillari, parzialmente distrutte e non più acido-resistenti, note come *forme di Much*.

In successive ricerche FONTÈS (1909) ha ritrovato le forme di Much nel pus tubercolare ed ha notato una progressiva riduzione *in vitro* del numero dei B. K. nelle ghiandole linfatiche caseificate, rilevando che le sostanze batteriolitiche, in esse contenute, rimanevano attive per 120 giorni.

WOLFF (3) (1909) afferma che, fra tutti i tessuti umani, la pelle sembra esercitare l'influenza battericida più cospicua sul bacillo di Koch.

GRIFFITHS (4), ha messo in evidenza che nel materiale lupo, il B. K. oltre a subire alterazioni morfologiche, va incontro ad una notevole diminuzione della sua virulenza.

WEBB, RYDER e GILBERT (5) (1925) hanno osservato, nei noduli tubercolari di cavia, tenuti a 37° in soluzione fisiologica, la lisi completa dei B. K. in meno di due settimane.

Diligenti ricerche sull'argomento sono state condotte da BUC (6) (1932) il quale, dopo aver prelevato asepticamente gli organi di cavie tubercolose, sacrificate mediante il salasso in un diverso stadio della malattia, ha conservato dei frammenti alla temperatura del termostato: *in tubi secchi*; *in tubi*

con soluzione fisiologica acidificata con HCl; in tubi con acqua distillata ed infine in tubi contenenti soluzione fisiologica alcalinizzata con Na_2CO_3 . Dopo vari periodi di permanenza a 37° prende delle piccole quantità dei vari organi per inocularle alle cavie allo scopo di saggiare l'attività patogena dei B. K. in essi contenuti. L'A. ha potuto rilevare che i frammenti di fegato, di milza e i gangli linfatici, mantenuti in ambiente secco non erano più capaci di infettare la cavia rispettivamente dopo 5-6 giorni, 10-14 giorni, 8-11 giorni. Nei frammenti di fegato, conservati in soluzione fisiologica, la virulenza del B. K. per la cavia è durata fino al 4-7° giorno; in acqua distillata fino al 3-5° giorno; in soluz. fis. acidificata con HCl fino al 9° giorno; in sol. fis. alcalinizzata con carbonato di sodio fino al 35° giorno. E' altresì risultato all'A. che la lisi dei B. K. avveniva in un tempo maggiore in confronto alla perdita del potere patogeno. Infatti in quegli stessi frammenti nei quali il b. di Koch aveva perduto la virulenza in 4 o 5 giorni, gli era possibile ritrovare, anche due settimane più tardi, dei bacilli acido-resistenti ben colorabili. Il fegato dimostrò un'azione antibiotica più notevole che non la milza ed i gangli. Secondo Buc sembra avere una certa importanza la reazione del mezzo nel senso che l'acidità accelererebbe la distruzione mentre l'alcalinità la ritarderebbe.

ERBA (7) (1933) allo scopo di rendersi ragione se la battericidia esplicita *in vitro* dai tessuti tubercolosi verso il B. K. sia specifica o meno, introduce, nelle lesioni del fegato, della milza e dei gangli lombari di cavie, delle piccole quantità di bacillo ovoide della setticemia del maiale e di primo vaccino carbonchioso e conserva gli organi suddetti *in vitro* a 37° . Mediante prove biologiche e culturali, eseguite a vari periodi di tempo, studia la vitalità e la virulenza dei suddetti microrganismi. Dai risultati di tali ricerche l'A. desume che il tessuto in preda al processo tubercolare, dimostra una netta attività battericida tanto verso il bacillo di Koch quanto verso gli altri microrganismi da lui studiati.

VIDAL (8) (1934) ha potuto constatare che i B. K. umani, contenuti negli organi di coniglio, perdono la loro vitalità in 5 giorni se tenuti *in vitro* alla temperatura di 20° e rimangono invece viventi e coltivabili per 10-13 giorni quando nelle stesse condizioni vengono conservati nella temperatura di 2° . La distruzione si effettuerebbe, secondo l'A., più rapidamente nel fegato e nei polmoni che nella milza e nei reni; i B. K. tipo bovino si dimostrerebbero un po' più resistenti in confronto ai bacilli tipo umano.

RICERCHE PERSONALI

Cavie infettate con ceppi di B. K. umano di varia virulenza furono uccise, parte per annucamento e parte per salasso in bianco dalla carotide, in periodi diversi dall'infezione stessa.

I ceppi usati per infettare le cavie furono il ceppo Landis di scarsa viru-

lenza e che dava dei quadri di tubercolosi cronica, ed il ceppo omogeneo ottenuto e studiato dettagliatamente da PETRAGNANI (9).

Subito dopo la morte venne praticata l'autopsia e frammenti di organi prelevati asetticamente furono in parte seminati ed in parte posti in provettoni sterili, chiusi con tappo di cotone paraffinato e messi in termostato.

Nel fondo dei provettoni, prima della chiusura, si aggiunse cc. 0,1 di acqua distillata sterile, al fine di evitare l'eccessivo essiccamento dell'organo che avrebbe potuto verificarsi, malgrado la chiusura ermetica, per la notevole ampiezza del provettone, prendendo cura inoltre che esso non venisse a contatto con il liquido affinché non subisse delle modificazioni che avrebbero potuto agire, in modo imprecisabile, sui bacilli di Koch. Le semine degli organi, che furono ripetute dopo 11-30 giorni di termostato, vennero eseguite in terreno Petragnani dopo aver triturato in mortai sterili frammenti di volume pressappoco uguali per i vari organi, ed averli emulsionati in mezzo cc. di terreno di Sauton. Nello stesso tempo da ogni organo si allestirono preparati per schiacciamento, per poter controllare al microscopio le eventuali modificazioni strutturali degli elementi batterici.

Malgrado le precauzioni prese ed il rigore della tecnica usata si ebbe talvolta a lamentare qualche inquinamento degli organi che, come è noto a chiunque faccia queste ricerche, è difficile evitare e che, come dice lo stesso RONDONI, potrebbero in parte essere riferibili a fatti di microbismo latente.

Nei casi in cui l'organo apparve eccessivamente compromesso, la semina fu praticata previa omogeneizzazione all'acido-base secondo PETRAGNANI (10). La lettura delle semine veniva fatta regolarmente ad intervalli di 4-5 giorni, allo scopo di seguire l'epoca di comparsa, la rapidità di sviluppo e gli aspetti delle colonie. La lettura dei preparati microscopici veniva fatta nel modo più accurato.

I risultati ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle:

1. CAVIA 32-BIS - COSTANTI

ORGANO	1 ^a Semina: appena ucciso l'animale		2 ^a Semina: dopo 11 giorni a 37°		3 ^a Semina: dopo 30 giorni a 37°	
	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Esame microscopico
Cervello	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Fegato	Circa 40 colonie ben sviluppate, rugose.	Rarissime forme aar. Lunghette tozze, granulari.	N. N.	Alcuni bac. aar. corti e allungati a protopl. omogeneo ed in piccoli gruppi (un elemento ogni circa 20 campi).	N. N.	Negativo per le forme aar.

1. CAVIA 32-BIS - COSTANTI

ORGANO	1ª Semina: appena ucciso l'animale		2ª Semina: dopo 11 giorni a 37°		3ª Semina: dopo 30 giorni a 37°	
	Lettura delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Lettura delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Lettura delle semine al 40° giorno	Esame microscopico
Milza	9 colonie grandi, rugose con alone periferico. Circa 40 colonie medie e piccole, ombelicate secche.	Forme aar. isolate ed in gruppi di 3-4 elementi in prevalenza corte a protopl. omogeneo (un elemento ogni 30 campi).	N. N.	Negativo per le forme aar.	Non viene eseguita la semina perchè il frammento presenta notevoli fatti di putrefazione.	Rare forme aar. lunghe a protoplasma nettamente granulata.

Note. - Vaccinata con 2 cc. di tubfencin. Il 11 agosto 1934 infettata con ctgr. 1 di Landis. Sacrificata il 27 novembre 1934 per annucamento.

2. CAVIA 36 - COSTANTI

ORGANO	1ª Semina: appena ucciso l'animale		2ª Semina: dopo 11 giorni a 37°		3ª Semina: dopo 30 giorni a 37°	
	Lettura delle semine al 40° giorno	Esame microscopico	Lettura delle semine al 40° giorno	Esame microscopico	Lettura delle semine al 40° giorno	Esame microscopico
Cervello	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Fegato	7 colonie di grandezza lentocolare rugose, 3 colonie piccole secche bombate.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Milza	Una colonia rugosa, 3 piccole secche.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Forme aar. in parte corte a protoplasma omogeneo, scarsamente colorate, in parte lunghe a struttura francamente granulata (un elemento circa ogni 10 campi)

Note. - Vaccinata con quattro iniezioni (due endoperitoneali, due sottocute, di fembattacin). Il 11 agosto 1934 infettata con cmc. 2 di emulsione Landis sottocute (1 ctgr. B. K.). Sacrificata il 27 novembre 1934 per annucamento.

3. CAVIA 50 - XII

ORGANO	1° Semina: appena ucciso l'animale		2° Semina: dopo 13 giorni a 37°		3° Semina: dopo 30 giorni a 37°	
	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico
Cervello	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Fegato	6 colonie grandi con alone, 13 colonie piccole.	Rarissime forme aar. omogeneamente ed intensamente colorate, isolate o in piccoli gruppi.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Milza	Una colonia.	Forme aar lunghe e corte a struttura granulata e omogenea (1 elemento ogni 15-20 campi).	N. N.	Forme aar. lunghe a protoplasma granuloso isolate o in gruppi di 2. Forme lunghe omogenee intensamente colorate (1 elemento ogni circa 20 campi).	N. N.	Forme aar lunghe a struttura granulata. Forme corte colorate intensamente (1 elemento ogni circa 15 campi).

Note. - Inoculata il 10 ottobre 1934 con coltura omogenea da fegato e ganglio della cavia 50-X. Il 5 dicembre 1934 viene uccisa per salasso in bianco dalla carotide.

4. CAVIA 50 - V

ORGANO	1° Semina: appena ucciso l'animale		2° Semina: dopo 13 giorni a 37°		3° Semina: dopo 30 giorni a 37°	
	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico
Cervello	N. N.	Rare forme aar alcune a struttura omogenea e bene colorate altre a protoplasma granuloso.	N. N.	Negativo alle forme aar.	N. N.	Negativo alle forme aar.
Fegato	Una colonia rilevata, piccola, secca.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Milza	15 colonie ombelicate, secche.	Forme aar, alcune molto lunghe, sottili, omogeneamente colorate, altre più corte aventi le stesse proprietà tintoriali (1 elemento ogni circa 20 campi).	N. N.	Negativo alle forme aar.	N. N.	Negativo alle forme aar.

Note. - Iniettata il 2 settembre 1934 con cc. 1 di coltura omogenea. Il 5 dicembre 1934 viene uccisa per annucamento.

5. CAVIA G. M. III COSTANTI

ORGANO	1° Semina: appena ucciso l'animale		2° Semina: dopo 11 giorni a 37°		3° Semina: dopo 30 giorni a 37°	
	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico
Cervello	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Fegato	Patina considerevolmente sviluppata.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Milza	Patina spessa giallastra.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Forme aar. in prevalenza a struttura granulosa (un elemento ogni circa 30 campi).	N. N.	Negativo per le forme aar.

Note. - Nel giugno 1934 viene infettata con ctr. 1 di Landis. Il 3 luglio 1934 viene inoculata con cc. 1 di fembattacin iodato. Il 6 dicembre 1934 viene uccisa per annucamento.

6. CAVIA 50 - VII

ORGANO	1° Semina: appena ucciso l'animale		2° Semina: dopo 12 giorni a 37°		3° Semina: dopo 29 giorni a 37°	
	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico	Letture delle semine al 40° giorno	Reperto microscopico
Cervello	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Negativo per le forme aar.
Fegato	Innumeri colonie.	Rare forme aar. corte diritte omogeneamente colorate.	N. N.	Negativo per le forme aar.	N. N.	Rarissime forme aar. a struttura omogenea scarsamente colorate.
Milza	34 colonie ben sviluppate.	Forme aar. sia corte che lunghe tanto a protoplasma granuloso che omogeneo (un elemento ogni circa 15 campi).	N. N.	Forme aar. tozze o lunghe a struttura omogenea e a struttura granulosa. Si trovano elementi in gruppi di 2 (1 elemento ogni 20-30 campi).	Non viene fatta nè la semina nè il preparato microscopico poiché il frammento appare putrefatto.	

Note. - Fu inoculata il 1° giugno 1934 con mmgr. 0,3 di microcolonia omogenea nell'inguine destro. Il 5 dicembre 1934 viene salassata dal cuore e sgozzata.

I dati forniti dalle tabelle mi fanno concludere che negli organi di cavia tubercolosa mantenuti *in vitro* a 37° il B. K. perde assai presto la sua vitalità, poichè già le semine praticate all'11° giorno di permanenza in termostato danno risultati costantemente negativi.

La negatività costante, sia delle semine, che dei preparati microscopici, m'inducono a ritenere che il cervello di cavia sia dotato di uno scarso tropismo verso il B. K. giacchè quando i B. K. vi vengono immessi artificialmente, vi trovano la possibilità di sviluppo come in nessun altro tessuto (11).

Ho potuto anch'io constatare, d'accordo con Buc, come i fenomeni di battericidia non vadano di pari passo con i fatti di lisi che sono sempre più tardivi.

Abbastanza frequentemente, ho riscontrato nei preparati microscopici la presenza di forme bacillari a protoplasma francamente granulare.

Non ho notato differenze dipendenti dallo stato di allergia delle cavie o dallo stipide batterico infettante.

Nè d'altra parte, prescindendo da quanto ho detto per il cervello, ho potuto notare differenze nel comportamento fra gli altri organi studiati.

Se i dati ottenuti dalle mie ricerche parlano chiaro per una netta azione antibiotica posseduta *in vitro* dai tessuti tubercolari verso b. di Koch, non mi mettono però in grado di emettere delle ipotesi circa la natura delle sostanze ed il meccanismo di azione dei fattori che prendono parte nel determinismo del fenomeno.

Sento il dovere di esprimere la mia gratitudine più profonda al mio Maestro prof. G. PETRAGNANI che mi concesse di fare queste ricerche e che seguì con particolare interessamento.

BIBLIOGRAFIA

1. MANFREDI: «Est. degli Atti R. Accademia Scienze Mediche», 1901.
2. MUCH, citato da PORTER: «Journ. of Hyg.», vol. XVI, 1917.
3. WOLFF: «Munch. med. Wochschr.», 1909.
4. CRIFFITHS: «Journ. Pathol. and Bacteriol.», 1914.
5. WEBB, RYDER e GILBERT: «Americ. Journ. of Tuberc.», 1925.
6. BUC: «C. R. Soc. de Biologie», t. CIX, 1932.
7. ERBA: «Bioch. e Terap. Sperimentale», XX, n. 1, 1933.
8. VIDAL G. B.: «Americ. Rev. of Tubercol.», 1934.
9. PETRAGNANI: «Atti R. Acc. Fisiocritici di Siena», Serie XI, II, n. 4, 1934.
10. — «Atti del V Congresso Nazionale per la lotta contro la tubercolosi», 1935.
11. PETRAGNANI e CITERNI: «Lotta contro la tubercolosi», VIII, 1937.

RIASSUNTO

L'A., studia il potere battericida «in vitro» del fegato, della milza, e del cervello di cavie tubercolose verso il bacillo di Koch. Dai risultati ottenuti mentre è indotto ad ammettere una netta azione antibiotica da parte degli organi studiati, non può avanzare ipotesi sulla natura e sul meccanismo dei fattori che prendono parte nel determinismo dei fenomeni riscontrati.

55545



~~319582~~

