



ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
CLINICA FISIOLGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

G. SPINA

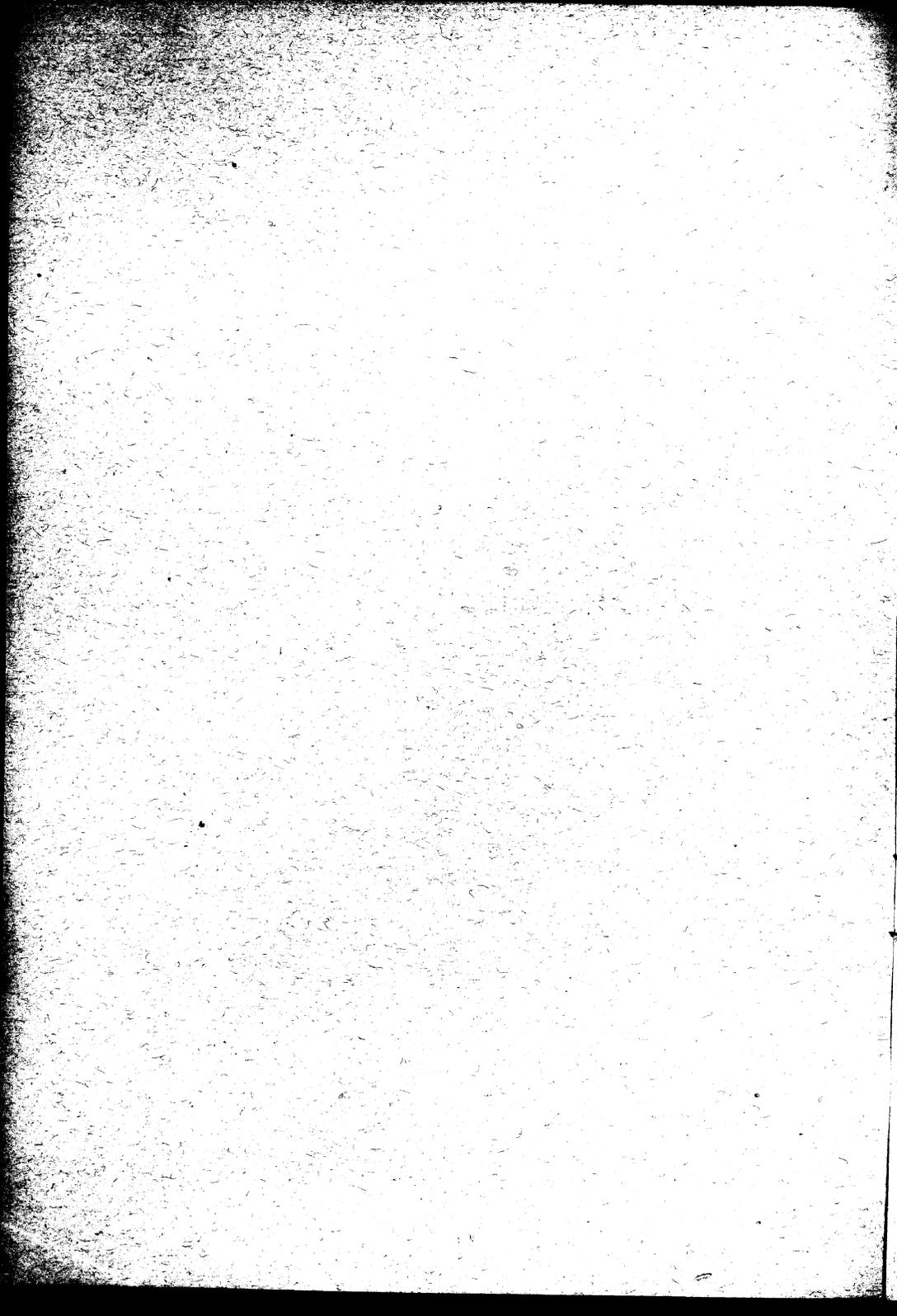
L'AZIONE DELLO ZOLFO IN VITRO ED IN VIVO NEI CONFRONTI DEL BACILLO DI KOCH

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno V, N. 3-4, Pag. 227-232



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 17

1941-XIX



L'AZIONE DELLO ZOLFO IN VITRO ED IN VIVO
NEI CONFRONTI DEL BACILLO DI KOCH

Dott. GIUSEPPE SPINA

L'influenza dello zolfo o dei suoi composti, sullo sviluppo di vari germi e particolarmente su quello del b. di Koch e sull'infezione da esso prodotta, è stata ripetutamente studiata.

Fin dal 1867 ROBERT PAIMAN, citato da ROSEMBERG, richiamò l'attenzione sulle proprietà curative dello zolfo in alcune infezioni del bestiame e nell'uomo nella polmonite, nel colera, nella difterite e ne raccomandò l'uso come vero specifico nella tubercolosi iniziale.

Riprendendo l'argomento, l'AGNOLI (1) ha notato che lo zolfo ha una azione antitossica verso la tossina del bacillo di LÖFFLER e quella botulinica.

AMELIA (2) ha notato che i tessuti tubercolosi contengono meno zolfo dei tessuti sani.

LAWSON (3) usando zolfo organico incorporato a terreni nutritizi diversi in concentrazioni percentuali varianti da mgr. 3 a mgr. 400 ha osservato, con tutte le concentrazioni, un'azione nettamente inibitrice sullo sviluppo del b. di Koch, ma non su quello di altri germi patogeni.

LAWSON, REDFIELD e BOYCE (4) in una serie di esperienze sulla tossicità dello zolfo colloidale iniettato in animali, hanno confermato che lo zolfo ostacola la moltiplicazione del bacillo di Koch.

MASSEY e SNIDER (5), che hanno studiato l'azione dello zolfo colloidale, a concentrazioni variabili da mgr. 1,5 a mgr. 200 % di terreno di coltura, su quattro diversi ceppi di bacilli tubercolari umani, hanno osservato che l'azione inibente dello zolfo si esplica diversamente a seconda del ceppo. Non viene però dagli AA. citati fatta menzione del ceppo usato e nè del tempo di osservazione delle colture di bacilli; elemento, questo, assai importante in studi del genere, perchè è noto che alcuni ceppi possono avere uno sviluppo più lento di altri.

GORDON e PROSKOURIAKOFF (6), hanno richiamato l'attenzione sopra un composto di zolfo, il tiosolfato di calcio, capace di influenzare benevolmente il decorso della tubercolosi polmonare nell'uomo.

CESTARI (7) partendo dalla constatazione che fra i lavoratori delle zolfatare la tubercolosi è rara, ha ricercato:

a) l'azione dello zolfo sullo sviluppo del b. Koch, usando il terreno di PETRAGNANI, quello di LÖWESTEIN e l'agar glicerinato con concentrazioni di zolfo di ctgr. 1 per gr. 150 di terreno;

b) l'influenza dello zolfo sia dal lato profilattico che da quello curativo, iniettato per via tracheale, nella tubercolosi sperimentale del coniglio e della cavia;

c) la virulenza dei *b. Koch* isolati dai polmoni di animali tubercolosi che avevano subito il trattamento endotracheale con zolfo. Egli nota che lo zolfo, sia introdotto nei terreni che negli animali, dà sviluppo di H_2S . In tutte le varie esperienze l'A. non ha riscontrato alcuna azione dello zolfo sullo sviluppo del *b. Koch* o sull'infezione da esso prodotta; inoltre la virulenza del bacillo Koch isolato come è detto sopra non è stata modificata.

MOREL (8) che ha studiato l'azione dello zolfo e di molti suoi composti sullo sviluppo di diversi germi (tifo, coli, proteus X 19, ecc.), conclude che tali sostanze non influenzano la crescita dei germi suddetti e solo in qualche caso nota un'azione lievemente inibitrice.

ROSEMBERG e MERVES (9) partendo dal presupposto dell'influenza benefica del tiosolfato di calcio sul decorso della tubercolosi polmonare (asserita da GORDON e PROSKOURIAKOFF), hanno sperimentato l'azione dei fiori di zolfo, del tiosolfato di calcio, del tiosolfato di sodio e dell'idrogeno solforato sullo sviluppo del bacillo Koch e di altri germi patogeni e di acido resistenti saprofiti, prolungando per due mesi l'osservazione dei provettoni. I fiori di zolfo nella percentuale di mgr. 5 % di terreno hanno mostrato una influenza inibitoria sullo sviluppo del *b. Koch*: questa inibizione non si è verificata nei confronti di altri germi patogeni quali il *b. tifo* e lo stafilococco aureo. Il tiosolfato di sodio e l'idrogeno solforato in concentrazioni tali da contenere zolfo nella percentuale di mgr. 5 % di terreno non hanno mostrato alcuna influenza sulla crescita del *b. Koch*. Al contrario il tiosolfato di calcio, già in concentrazioni equivalenti di zolfo inferiore a 5 mgr. % di terreno, ha mostrato azione inibente lo sviluppo del *b. Koch*, arrestandolo completamente a concentrazioni maggiori.

Nell'intento di portare un contributo a queste ricerche, ho istituito una serie di esperienze sull'azione dello zolfo in vitro ed in vivo nei confronti del *b. Koch*.

1) *Influenza dello zolfo sullo sviluppo del b. Koch.*

Ho eseguito queste esperienze usando il terreno di PETRAGNANI normale glicerinato al 3% al quale ho aggiunto, per ogni 100 gr., fiori di zolfo alla dose, rispettivamente, di 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 400 mgr. L'aggiunta dello zolfo al mezzo colturale è stata eseguita prima della coagulazione, che si è fatta avvenire, successivamente, secondo il solito. Per ogni concentrazione di zolfo ho adoperato dieci provettoni e così anche dieci tubi controllo di terreno PETRAGNANI normale senza zolfo. Ogni provettone è stato seminato con cc. 0,20 di sospensione di bacilli tubercolari bovini Vallée contenente, nella detta dose, 1/20.000 mgr. di coltura su SAUTON giovane di un mese. I provettoni dopo la semina sono stati posti in termostato a 37° C. per 45 giorni, previo imparaffinamento del tappo. Sono state eseguite tre letture rispettivamente dopo 15, 30, 45 giorni. Dopo 15 giorni si è notato un iniziale sviluppo nei provettoni controllo ed in quelli contenenti zolfo nella percentuale di 5 e 10, 25, 50, e rarissime colonie in alcuni tubi con 100 mgr. di zolfo per cento. Mentre in quei provettoni contenenti 5 e 10 mgr. di zolfo lo sviluppo è stato uguale ai controlli, negli altri lo sviluppo è stato notevolmente inferiore e tanto meno quanto più alta era la concentrazione di zolfo. Dopo 30 giorni di termostato i risultati sono stati gli stessi essendosi verificato soltanto un ingrandimento delle colonie iniziali. Alla fine dei 45 giorni di termostato ho notato in definitiva quanto segue: i provettoni contenenti 5 e 10 mgr. % di zolfo hanno dato sviluppo eguale ai controlli (cioè numerosissime colonie in tutti i provettoni), nei provettoni contenenti 25 mgr. % di zolfo lo sviluppo è stato lievemente inferiore ai controlli; nei

provettoni con 50 mgr. % di zolfo sono nate pochissime colonie in tutti i provettoni; infine ove lo zolfo era in mgr. 100 % lo sviluppo è stato in 6 provettoni assente ed in quattro sono cresciute da due a quattro colonie per tubo. Nessuno sviluppo ho osservato ove le concentrazioni dello zolfo erano di 150, 200 e 400 mgr. %.

2) Influenza dello zolfo sulla infezione sperimentale da *b. Koch*.

Per queste esperienze che sono state condotte in due turni con modalità diverse ho usato un preparato di zolfo colloidale del commercio contenente in 2 cc. gr. 0,0005 di zolfo colloidale; come animale da esperimento ho adoperato la cavia dal peso medio di gr. 300.

In un primo lotto di ventiquattro animali ho iniettato sottocute cc. 0,10 del preparato suddetto ogni quattro giorni e per la durata di tre mesi. Per quanto riguarda l'inizio del trattamento ho diviso gli animali in quattro gruppi di sei cavie ciascuno procedendo come segue: il primo gruppo ha ricevuto quattro iniezioni di zolfo prima dell'infezione; il secondo gruppo ha iniziato il trattamento con zolfo contemporaneamente all'infezione; un terzo ed un quarto gruppo hanno iniziato il trattamento con zolfo rispettivamente a 8 e 12 giorni dall'infezione. Quest'ultima è stata praticata, contemporaneamente per tutti i gruppi e per i controlli (8 cavie), sottocute nell'inguine destro, per via transmuscolare, con ceppo bovino Vallée di media virulenza alla dose di mgr. 1/1000 di coltura di un mese su SAUTON.

Gli animali hanno sopportato bene il trattamento con zolfo essendosi verificate soltanto, e non in tutti gli animali, delle modiche elevazioni termiche di circa mezzo grado con massimo due ore dopo eseguita l'iniezione. Gli animali sono stati tutti sacrificati dopo 90 giorni dall'avvenuta infezione: all'autopsia essi hanno presentato una infezione progressiva, estesa spesso anche ai polmoni. Di ogni animale sono stati pesati gli organi ed eseguiti i rapporti spleno-fegato-polmone-corporei secondo DADDI. Nello schema seguente sono riportati detti rapporti per gruppo di animali e quelle dei controlli. Da queste medie sono stati esclusi quegli animali che, per forme morbose intercorrenti, morirono prima dei tre mesi (in tutto tre cavie).

GRUPPI	Numero delle cavie	Inizio del trattamento con zolfo	Infezione	Uccisione	Numero delle cavie che hanno terminato l'esperm.	Pesi medi organo-corporei %		
						Milza gr.	Fegato gr.	Polmone gr.
I°	6	14/12/38	27/12/38	27/3/39	5	0,8	6,1	2,5
II°	6	27/12/38	»	»	6	1	6,3	2,9
III°	6	4/1/39	»	»	5	0,9	6,3	2,8
IV°	6	8/1/39	»	»	6	0,8	5,7	2,4
Controlli . .	8	...	»	»	7	0,7	5,8	2,3

Osservando le medie su riportate risalta subito che l'epoca di inizio del trattamento con zolfo, rispetto all'infezione, ha poco influito sul decorso e gravità di quest'ultima. Anzi i dati si presentano discordanti in quanto la infezione che è stata più lieve nel 4° gruppo, non è stata progressivamente più grave (o più lieve ancora) nel 3°, 2°, 1° gruppo: pertanto non crediamo poter dare alcun valore a queste piccole differenze osservate nei vari gruppi,

rientrando esse in quei piccoli scarti che sempre si verificano nel decorso della infezione sperimentale. I controlli invece hanno presentato un'infezione meno progredita rispetto agli animali dei singoli gruppi trattati: tale differenza è ancora più palese se si fa il confronto delle medie organo-corporee dei controlli (eseguite su 7 animali) e quella complessiva di tutti i gruppi. Queste osservazioni detratte dalle medie riportate nello specchio, trovano ampia conferma nella disamina dettagliata dei protocolli delle varie necroscopie che qui per brevità non riporto.

Visti questi primi risultati ho creduto opportuno ripetere le esperienze con qualche modificazione tecnica. Un secondo lotto di 24 animali del peso medio di 300 gr. è stato contemporaneamente infettato sotto cute per via transmuscolare nell'inguine sinistro con ceppo bovino VALLÉE (virulenza media, cresciuto per un mese in SAUTON) con dose di 1/5 di mmgr. Di questi animali, 12 sono stati lasciati come controllo: gli altri 12 sono stati trattati a giorni alterni con il medesimo preparato di zolfo usato nella prima esperienza, alla dose di cc. 0,10 sotto cute nell'inguine destro. Gli animali sono stati tenuti tutti ad una dieta eguale a base di farina di grano, farina di granturco, avena, crusca, olio e con l'aggiunta di quantità fisse di verdure fresche. Il trattamento è stato sopportato bene, gli animali sono cresciuti sempre in peso e l'elevazione termica, in rapporto all'iniezione di zolfo, è stata in media di mezzo grado. Abbiamo creduto opportuno mantenere la su accennata dieta per tenere gli animali ad un regime uniforme di vita: l'iniezione è stata eseguita con dosi forti per potere avere una infezione più rapida che ci permettesse di uccidere gli animali in 60 giorni trovando delle lesioni più estese a tutti gli organi. Abbiamo iniziato inoltre il trattamento con zolfo contemporaneamente per tutti gli animali, dato che la esperienza precedente ha rilevato che nessuna influenza ha l'inizio del trattamento con zolfo sullo svolgimento dell'infezione. Così pure le iniezioni di zolfo sono state ravvivate per tenere gli animali sotto continua azione della sostanza in studio.

Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti in questo secondo gruppo di esperienze con le medie organo-corporee secondo DADDI.

GRUPPI	Numero delle cavie	Infezione 25-5-1939	Trattamento	Numero delle cavie che hanno terminato l'esperimen.	Pesi medi organo-corporei %		
					Milza gr.	Fegato gr.	Polmone gr.
I°	12	1/5 mg. Vallée	con zolfo colloidale	10	0,3	5	1,7
II°	12	»	nessuno	9	0,2	4,6	1,7

I risultati di questa esperienza confermano ancora quelli della precedente e cioè che il trattamento con zolfo non influisce benevolmente il decorso della tubercolosi nell'infezione sperimentale della cavia anzi la rende, seppure di poco, più grave di quella dei controlli.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONI

In accordo a quanto la maggior parte degli AA. ha osservato, ho potuto confermare l'azione ostacolante dello zolfo sullo sviluppo del bacillo di Koch di tipo bovino, azione che è stata tanto più evidente quanto più alta era la concentrazione percentuale di zolfo nel terreno di coltura, fino a giungere alla

inibizione di qualsiasi sviluppo per concentrazioni di zolfo di mgr. 150, 200, 400 per 100 cc. di terreno. La spiegazione del fatto non è facile. Noi possiamo sottoscrivere fino a un certo punto le conclusioni di ROSEMBERGER e MERVES (loco citato). Infatti se è ammissibile che nei terreni incorporati con zolfo si abbia la liberazione di gruppi sulfidrilici, come precedentemente era stato osservato anche da CESTARI, non è semplice spiegarsi perchè gruppi, ad azione riducente, debbano inibire lo sviluppo del *b. Koch*, poichè essi hanno, in genere, un'azione attivante nei riguardi di numerose attività biologiche. Tuttavia è noto che le sostanze con gruppo *SH* hanno anche, di fronte a determinati enzimi, azione inibente (vedi fosfatasi 10).

Nei riguardi dell'infezione sperimentale tubercolare nella cavia trattata con zolfo colloidale abbiamo notato, nelle due differenti serie di esperienze, perfettamente concordanti nei loro risultati, che gli animali così trattati presentano lesioni più gravi dei controlli: le differenze, anche se piccole, sono state tuttavia nette e, quel che più conta, costanti e pertanto è da attribuire ad esse un sicuro valore. Non crediamo di dare una spiegazione di ciò. Anche se volessimo invocare il fatto già rilevato da CESTARI, che cioè negli animali trattati con zolfo si mettono in libertà dei gruppi sulfidrilici, non troveremmo egualmente spiegazione del dato sperimentale osservato. Infatti noi sappiamo, soprattutto per esperienze eseguite nella nostra Scuola da CATTANEO (11), anche in collaborazione con MORELLINI (12) e MARIANI (13), che queste sostanze a spiccata azione riducente sono di grande necessità all'organismo ogni qualvolta quest'ultimo ha bisogno di eccitare le sue funzioni di difesa. Nel caso nostro, quindi, la presenza in eccesso di gruppi sulfidrilici, derivati dalla somministrazione di zolfo agli animali, avrebbe dovute rendere questi, eccitando e favorendo i processi difensivi e di disintossicazione, più resistenti all'infezione tubercolare stessa.

RIASSUNTO

L'A. ha studiato l'influenza dello zolfo incorporato in terreni di coltura di Petagnani in concentrazioni del 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 400 mgr. per 100 cc. di terreno, sullo sviluppo del bacillo di Koch: ha notato sviluppo inferiore ai controlli alle concentrazioni di mgr. 25, 50 e 100: assenza di sviluppo nelle concentrazioni più forti.

L'A. ha inoltre studiato, in due separate esperienze, il decorso dell'infezione tubercolare da bacillo bovino nella cavia trattata, durante l'infezione, con piccole dosi di zolfo colloidale ed ha notato, seppure in modo lieve, una maggiore gravità dell'infezione-rispetto ai controlli.

RÉSUMÉ

L'auteur a étudié l'influence du soufre, incorporé au terrain de culture de Petagnani dans une concentration de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 400 mmgr. par 100 cc. di terrain, sur le développement du bacille de Koch. Il a relevé un développement inférieur aux controls, aux concentrations de 25, 50, 100 mmgr. Aux concentrations plus fortes il n'a relevé aucun développement.

De plus l'auteur a étudié, dans deux expériences différentes, le développement de l'infection tuberculaire due au bacille bovin dans le cobaye traité, pendant l'infection, à petites doses de soufre colloïdal et il a remarqué, dans une forme assez atténuée, une gravité plus prononcée de l'infection par rapport aux controls.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. untersuchte den Einfluss des, in einer Konzentration von 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 400 mmgr. auf 100 ccm. Petraganis Nährboden einverleibten Schwefels auf die Entwicklung des Kochbazillus: er beobachtete eine geringere Entwicklung als bei den Kontrollen bei Konzentrationen von 25, 50, und 100 mmgr.: bei starken Konzentrationen völliges Ausbleiben der Entwicklung.

Verf. untersuchte ferner, in zwei getrennten Versuchen, den Verlauf der tuberkulösen Infektion durch den Bazillus bovinus Typus im Meerschweinchen behandelt während der Infektion mit kleinen kolloidalen Schwefeldosen und beobachtete, obwohl nur in geringem Masse, dass die Infektion im Vergleich zu den Kontrollen, schwerer sei.

SUMMARY

The author has studied the influence of the sulphur, incorporated in Petragani culture medium in concentrations of 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 and 400 mmgr. to 100 cc. of culture medium, on the development of the Koch bacillus; with the concentrations of 25, 50 and 100 mmgr. he noted a development inferior to that in the controls, and an absence of development in the stronger concentrations.

The author has also studied, in two separate tests, the course of the tubercular infection from bovine bacilli in guinea-pigs treated during the infection with small doses of colloidal sulphur, observing a major, even if slight, gravity in the infection compared with the controls.

BIBLIOGRAFIA

- (1) AGNOLI. — « Boll. Ital. di Biol. Sper. », **6**, 756, 1931.
- (2) AMELIA. — « Gazz. Inter. Med.-chir. », **41**, 517, 1933.
- (3) LAWSON. — « Amer. Rev. Tuberc. », **29**, 650, 1934.
- (4) LAWSON, REDFIELD e BOYCE. — « J. Lab. e Clin. Med. », **20**, 169, 1934.
- (5) MASSEY e SNIDER. — « Am. j. Pub. Healt », **26**, 811, 1936.
- (6) GORDON e PROSKOURIAKOFF. — « Tr. A. Am. Physicians », **51**, 447, 1936.
- (7) CESTARI. — « Arch. farm. sper. », **62**, 204, 1936.
- (8) MOREL A. — « Compt. Rend. Soc. Biol. », **124**, 183, 1937.
- (9) ROSEMBERGER e MERVES. — « J. Infect. Dis. », **61**, 69, 1937.
- (10) WALDSHIMIDT-LEITZ e COLL. — « Naturwiss », **20**, 122, 1932; « Physiol. Ch. », **214**, 75, 1933.
- (11) CATTANEO. — « Ann. Ist. C. Forlanini », **2**, 332, 1938.
- (12) CATTANEO e MORELINI. — « Ann. Ist. C. Forlanini », **5**, 1938.
- (13) CATTANEO e MARIANI. — « Arch. Scienze Biol. », **24**, 139, 1938.

~~34210~~

59653

