



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

C. CATTANEO, B. MARIANI e M. C. GABBRIELLI

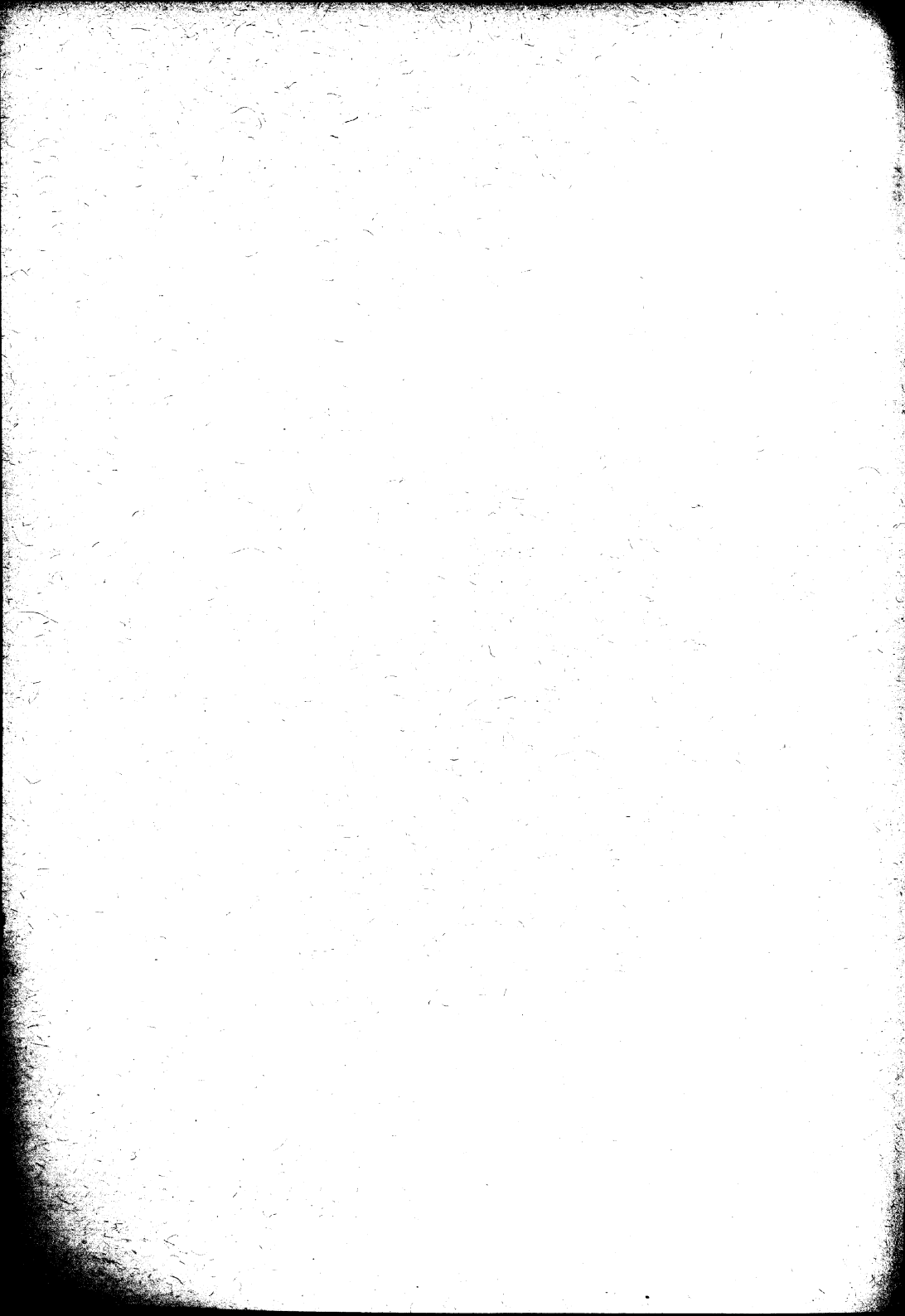
**SULLA PRESENZA IN CIRCOLO
DI MATERIALE PROTEICO TUBERCOLARE
ESO- ED ENDO-BACILLARE NELLE VARIE FORME
ANATOMO-CLINICHE DI TUBERCOLOSI**

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno V N. 1-2 Pag. 19-26



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 17

1941-XIX



SULLA PRESENZA IN CIRCOLO DI MATERIALE PROTEICO TUBERCOLARE ESO- ED ENDO-BACILLARE NELLE VARIE FORME ANATOMO-CLINICHE DI TUBERCOLOSI.

C. CATTANEO, B. MARIANI e M. C. GABBRIELLI

In una nota precedente (1), mediante la ricerca delle proteasi specifiche di difesa nelle urine di individui sani sottoposti ad intradermoreazione con proteine delle cellule del bacillo di Koch e con proteine del terreno di coltura (terreno sintetico di Sauton), ove i germi stessi si erano sviluppati, noi abbiamo potuto stabilire che le due sostanze proteiche metabolizzate dal bacillo di Koch si differenziano chimicamente l'una dall'altra. L'interesse di questi risultati ci sembra evidente se si considera che essi possono servire come punto di partenza per lo studio di numerosi problemi riguardanti il bacillo di Koch, quali quello del suo metabolismo, la conoscenza del principio tubercolinico, l'eventuale influenza della diversa costituzione chimica sulla attività cutireattiva e sulle proprietà desensibilizzanti durante la terapia tubercolinica.

Riprendendo queste ricerche, abbiamo creduto opportuno iniziare le nostre esperienze ricercando nelle urine di ammalati di tubercolosi delle varie forme anatomiche-cliniche le proteasi di difesa, usando come substrato per la reazione di ABDERHALDEN le proteine eso- ed endo-bacillari (*).

Infatti, poichè le due proteine sono in grado di stimolare nell'organismo due differenti reattività, come dimostra il fatto che ad ognuna di esse corrisponde un enzima idrolizzante specifico, noi abbiamo trovato in questa ricerca un mezzo analitico che ci permette di stabilire se il materiale proteico di natura tubercolare, che si trova in circolo durante la malattia, sia costituito dalla frazione eso- ed endo-bacillare o se prevalga l'una piuttosto che l'altra.

L'impostazione di queste ricerche trova la sua giustificazione anche nel fatto che è sempre al materiale proteico tubercolare che si riferiscono in massima parte le reazioni sia allergiche che immunologiche e le manifestazioni tossemiche, pur non potendosi escludere a priori l'influenza delle frazioni lipidica e polisaccaridica nel determinare tali fenomeni.

In queste esperienze abbiamo eseguito le ricerche delle proteasi di difesa usando nella R.A. contemporaneamente le sostanze proteiche eso- ed endo-bacillari: come prodotto eso-bacillare è stata adoperata la tubercolina MDC e come prodotto endo-bacillare abbiamo adoperato le proteine ottenute per disgregazione meccanica delle cellule del bacillo di Koch. Descriviamo brevemente il metodo adoperato per la preparazione delle endoproteine, prepa-

(*) Sotto la denominazione di «proteine endobacillari» intendiamo le proteine del corpo del bacillo di Koch, e sotto quella di «proteine esobacillari» quelle che si trovano nel terreno di coltura, su cui il germe si è sviluppato.

razione che ci è stata resa facilmente realizzabile mediante l'uso dell'agitatore ideato e realizzato per questo scopo dal prof. E. MORELLI (2).

Bacilli di Koch, cresciuti su terreno Sauton per 4 settimane, vengono filtrati e lavati abbondantemente con acqua. Indi si mescolano con circa 3 volte il loro peso di quarzo granulare, si raccolgono in appositi tubi di vetro e si sottopongono ad agitazione per 16-18 ore nell'apparecchio MORELLI. La massa amorfa così ottenuta viene centrifugata per 1 ora a 3000 giri ed il liquido soprastante si porta a pH 5 con acido acetico diluito; si ottiene un precipitato fioccoso, costituito dal materiale proteico cellulare, che si raccoglie per filtrazione e si essicca con acetone. Questo è il prodotto che noi abbiamo adoperato nelle nostre esperienze.

Per le modalità di dettaglio nell'esecuzione dell'R. A. rimandiamo ai nostri lavori precedenti (3).

Riportiamo nelle tabelle seguenti i risultati ottenuti.

TABELLA N. 1.

Fermenti protettivi dimostrabili negli ammalati di tbc. micronodulare dell'apice, e in forme di tbc. fibrosa dell'apice.

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati	
			Prot. H. c.	Prot. H. t.
1. M. Augusto .	Tbc. micronodulare apice D.	+	tr.	—
2. P. Alfonso .	Tbc. fibrosa apice D. Bronchiectasie.	+	—	—
3. C. Marcello .	Tbc. micronodulare apice D.	+	—	—
4. L. Attilio .	Tbc. microcavernulare cirrotica S. .	+	tr. evid.	—
5. M. Fernanda	Tbc. micronodulare apice S.	+	[(+)]	—
6. Di M. Ada .	Tbc. fibronodulare al ½ sup. S. . .	+	[(+)]	—
7. U. Carlo . .	Tbc. micronodulare biapicale	++	—	—
8. O. Alfredo .	Sclerosi apicale D.	+	[(+)]	—

TABELLA N. 2.

Fermenti protettivi dimostrabili negli ammalati di tbc. polmonare affetti da forme essudative recenti.

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati		Osservazioni
			Prot. H. c.	Prot. H. t.	
1. D. Olga . . .	Infiltrato parailare D.	+++	(+)	—	Dopo attivaz. con Iposolfito Na
2. C. Simplicio.	Lobite ulcerata	+++	—	—	
3. V. Ottorino .	Infiltr. tisiog. Bronchiectasie	++	(+)	—	
4. F. Modesta .	Caverna precoce	++	+	tr.	
5. B. Mario . .	Infiltrato tisiogeno	++	[(+)]	tr.	Id. id.
6. A. Carlo . .	Lobite sup. D.	++	[(+)]	—	Id. id.
7. B. Pietro .	Tbc. nodulare confluita	++	+	—	Id. id.

Prot. H. t. = Proteine del terreno = tubercolina MDC (esoprot.).

Prot. H. c. = Proteine del corpo bacillare (endoprot. - b. tipo H).

TABELLA N. 3.

Fermenti protettivi dimostrabili negli ammalati di tbc. miliare del polmone.

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati		Osservazioni
			Prot. H. c.	Prot. H. t.	
1. M. Luigi . .	Tbc. miliare ulcerata a S.	+++	(+)	tr.	
2. C. Augusto .	Tbc. miliare ulcerata bilat.	++	—	—	
3. G. Gianna .	Tbc. miliare discreta . . .	++	—	—	
4. C. Palma . .	Tbc. miliare ulcerata D. .	+++	tr.	—	
5. N. Pietro . .	Tbc. miliare ulcerata D. .	++	—	—	
6. C. Marianna.	Tbc. miliare biapicale . .	++	(+)	[(+)]	Dopo attivaz. con Iposolfito Na
7. M. Elisabetta	Tbc. miliare biapicale . .	++	[(+)]	tr.	Id. id.
8. P. Domenico	Nodulare diffusa ulcerata bilat.	++++	[(+)]	—	Id. id.

TABELLA N. 4.

Fermenti protettivi dimostrabili negli ammalati di tbc. fibroulcerosa bilaterale.

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati	
			Prot. H. c.	Prot. H. t.
1. S. Alfonso .	Tbc. fibroulcerativa bilaterale . . .	++++	tr.	[(+)]
2. P. Augusto .	Tbc. fibroulcerativa S. Empiema . .	+++	+	tr.
3. S. Luigi . .	Tbc. fibroulcerativa S. totale . . .	+++	+	+
4. P. Gina . .	Tbc. fibroulc. S. diff. control. nodulare	++++	[(+)]	(+)
5. C. Dario . .	Tbc. fibroulcerativa bilaterale . . .	+++	tr.	[(+)]
6. M. Luisa . .	Tbc. fibroulcerativa D.	++	tr.	—
7. D. Assunta .	Tbc. fibroulcerativa S.	++	(+)	—
8. O. Rodolfo .	Tbc. fibroulcerativa bilaterale . . .	++++	[(+)]	[(+)]

TABELLA N. 5.

Fermenti protettivi dimostrabili negli ammalati di tbc. osteo-articolare.

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati	
			Prot. H. c.	Prot. H. t.
1. P. Pietro . .	m. Pott lombare, ascessi fistolizzati, amiloidosi.	+++	+	(+)
2. R. Giuseppe.	m. Pott dorso-lombare, ascessi fistolizzati.	+++	tr.	(+)
3. C. Leonardo.	m. Pott lombare, ascessi fistolizzati.	+++	(+)	[(+)]
4. T. Giorgio .	m. Pott lombare	+	[(+)]	—
5. G. Clara . .	m. Pott lombare	+	(+)	(+)
6. B. Maria . .	Gonilite D. (secca)	+	+	+
7. P. Anna . .	m. Pott V lombare	+	—	(+)
8. D. A. . . .	m. Pott dorsale basso, ascesso lombare in riassorbimento.	+	—	—

TABELLA N. 6.

Fermenti proteolitici dimostrabili negli ammalati di tbc. linfoghiandolare.

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati	
			Prot. H. c.	Prot. H. t.
I. A. Casilde .	Tbc. primaria con notevole reazione ghiandolare ilare D.	+	+	[(+)]
2. De C. Con-cetta	Tbc. fibroulcerativa D. - Tbc. linfoghiandolare cervicale D.	++	—	(+)
3. A. Pierina .	Lieve adenopatia latero-cervicale D.	+	[(+)]	—
4. P. Clara . .	Pnt. S. per infiltrato tbc. Linfomi multipli cervicali.	+++	(+)	+
5. B. Rosa . .	Pnt. D. Adenopatia tracheo-bronchiale preval. a D. con reazione perificale.	++	+	(+)
6. G. Arnaldo .	Adenopatia tracheo-bronchiale prev. a D. Pleurite a D.	++	(+)	+
7. F. Augusto .	Tbc. ematogena bilat. Linfomi colliquati laterocervicali D.	++++	—	tr.

*Fermenti proteolitici**dimostrabili in soggetti con altre localizzazioni tbc. extra polmonari.*

1. M. Saverio .	Tbc. miliare. Meningite tbc.	++++	[(+)]	++
2. M. B. . . .	Tubercolo anatomico mano destra .		+	—

Come dimostra l'esame delle tabelle, la ricerca delle proteasi di difesa, eseguita contemporaneamente contro le esc- e le endo-proteine, non ha dato in tutti i casi esaminati gli stessi risultati. Infatti nelle tbc. micronodulare e fibrosa dell'apice, nelle forme essudative recenti e nelle forme miliari (vedi tabelle N. 1, 2, 3) abbiamo ottenuto reazioni evidenti per le proteine della cellula batterica e reazioni quasi sempre negative per le proteine esocellulari. Nelle forme invece di tbc. polmonare fibroulcerativa, nella tbc. osteo-articolare e linfoglandolare (vedi tabelle N. 4, 5, 6) abbiamo potuto osservare che si ritrovano contemporaneamente nelle urine di quasi tutti i soggetti esaminati tanto la proteasi specifica per le endoproteine come quella per le esoproteine.

Per renderci ragione di questa diversità di risultati abbiamo condotto due serie distinte di esperienze.

Nella prima, i cui risultati sono riportati nella tabella N. 7, abbiamo sottoposto ad intradermoreazione con tubercolina MDC (proteine del terreno) alcuni ammalati di tbc. micronodulare, fibrosa apicale, essudativa e miliare, nei quali in esperienze preliminari, non avevamo ritrovato le proteasi attive contro le esoproteine. Dopo la somministrazione della tubercolina è stato possibile mettere in evidenza nelle urine di questi soggetti non solo le proteasi di difesa contro le proteine del corpo bacillare, già prima rivelabili, ma anche quelle contro le proteine esocellulari.

I risultati di queste esperienze dimostrano quindi che bastano quantità minime di materiale proteico esobacillare (dosi cutireattive) per stimolare la comparsa in circolo dell'enzima omologo.

TABELLA N. 7.

Fermenti protettivi dimostrabili in ammalati di tbc. dopo somministrazione di proteine del terreno di coltura (soggetti precedentemente negativi per la proteina H. t.; sostanza somministrata nelle dosi comunemente usate a scopo diagnostico e curativo).

CASO	DIAGNOSI	Condizioni di gravità	Substrati usati	
			Prot. H. c.	Prot. H. t.
1. R. Domen.	Tbc. micronodulare apicale D. . .	++	—	(+)
2. C. Francesc.	Pnt. D. eff. per infiltrato precoce . .	++	—	(+)
3. C. Aristide.	Tbc. fibrosa apicale S.	++	(+)	(+)
4. M. Augusto	Tbc. microcavernulare apice D. . .	+	[(+)]	tr.
5. P. Alfonso.	Tbc. fibrosa apice D.	+	—	+
6. C. Palma .	Tbc. miliare ulcerata a D.	+++	[(+)]	[(+)]
7. C. Luigi .	Infiltrato tisiogeno	++	—	[(+)]
8. C. Carlo .	Tbc. fibrosa biapicale	+	(+)	[(+)]
9. M. Luigi .	Tbc. miliare cronica. Pachi pleurite S.	++	—	[(+)]
10. P. Paolo .	Tbc. miliare discreta	++	(+)	+

Dall'altra parte abbiamo sottoposto ad un trattamento attivante secondo CATTANEO e MARIANI (4) un altro gruppo di ammalati delle forme di tubercolosi, caratterizzate dalla mancanza di positività nella R. A. per le eso-proteine.

Poichè l'intensità della reazione dipende dalla quantità di materiale proteico eterogeneo presente in circolo ed è perciò diversa da caso a caso, abbiamo scelto come soggetti per questa ricerca alcuni ammalati, che in condizioni normali davano negativa o solo debolmente positiva la reazione delle proteasi di difesa anche contro le proteine del corpo bacillare, in modo che si rivelasse evidente la proprietà attivante della sostanza riducente somministrata (iposolfito di sodio).

Nella tabella N. 8 sono riportati i risultati ottenuti, che dimostrano come, dopo questo trattamento, la R. A. per le endoproteine sia diventata nettamente positiva in tutti i casi, mentre per le esoproteine o si è mantenuta inalterata la negatività o si sono avute delle reazioni appena percettibili. Ciò dimostra che nella tbc. micronodulare dell'apice e in quella miliaria, come nelle forme fibrose dell'apice e nelle forme essudative recenti (lobiti, infiltrati tisiogeni) predomina in circolo il materiale proteico endocellulare, essendo il prodotto esocellulare o assente o presentesoltanto in quantità estremamente limitata.

Per il significato fisiologico delle proteasi di difesa, dal confronto dell'insieme dei nostri risultati, ci pare di poter concludere che a seconda della forma anatomo-clinica della malattia si ritrova in circolo o soltanto materiale proteico tubercolare endocellulare o materiale proteico di origine sia endo- che eso-bacillare.

Tuttavia nel polmone umano tubercoloso sono contenuti entrambi i materiali proteici, elaborati dal bacillo di Koch. Noi abbiamo potuto accertare sperimentalmente la presenza nell'organo delle due proteine attraverso l'analisi delle reazioni enzimatiche di difesa determinate in un organismo sano, mediante la somministrazione di materiale proteico proveniente dal polmone tu-

TABELLA N. 8.

Fermenti protettivi dimostrabili dopo attivazione in ammalati di tbc. polmonare a reazione precedentemente negativa verso le proteine H. t.

CASO	DIAGNOSI	Prima dell'attivazione		Dopo l'attivazione		Sostanze somministrate
		Prot. H.c.	Prot. H.t.	Prot. H.c.	Prot. H.t.	
1. B. Pietro....	Tbc. ess. recente.....	—	—	+	—	Iposolfito Na.
2. G. Marcello..	Polisierosite	tr.	—	(+)	tr.	Id.
3. F. Modesta..	Caverna precbe	—	—	+	tr.	Id.
4. F. Domenico.	Nodulare diff. con caver.	—	—	[(+)]	—	Id.
5. A. Carlo	Lobite superiore D....	—	—	[(+)]	—	Acido ascorbico
6. B. Mario	Infiltrato tisiogeno	(+)	—	(+)	tr.	Iposolfito Na
7. C. Marianna .	Tbc. miliare biapicale..	—	—	(+)	[(+)]	Id.
8. M. Elisabetta	Id. id. id.	[(+)]	—	[(+)]	—	Id.

bercoloso. Per questa ricerca abbiamo trattato con alcool, etere e cloroformio della sostanza caseosa prelevata dal polmone tbc., l'abbiamo sospesa in acqua alla concentrazione voluta ed autoclavata. Indi introdotta per via parenterale in individui sani una quantità di sospensione corrispondente ad 1/5 di mg. di prodotto, abbiamo ricercato nelle urine di questi, dopo 24 ore, le proteasi di difesa, contro le eso- e le endo-proteine bacillari. La tabella N. 8, dove sono riportati i risultati di queste esperienze, dimostra come sia stata ottenuta reazione positiva per tutti e due i substrati.

TABELLA N. 9.

Fermenti protettivi dimostrabili in soggetti sani iniettati con sostanza caseosa (sostanza caseosa trattata con alcool, etere, cloroformio).

Caso	Quantità somministrata	Prot. H. c.	Prot. H. t.
1°	1/50 mg.	[(+)]	tr.
2°	1/5 mg.	+	(+)
3°	1/5 mg.	(+)	+

Questi risultati portano a concludere che la sostanza caseosa del polmone tubercoloso contiene, insieme con le proteine del tessuto polmonare in disfacimento, anche proteine tubercolari di natura endo- ed eso-bacillare. Quindi nei focolai morbosi si ritrovano sempre entrambe i prodotti proteici bacillari, i quali però possono passare in circolo integralmente o parzialmente a seconda della localizzazione e del quadro anatomo-clinico della malattia.

Qual'è la ragione di questo differente comportamento? Noi non abbiamo ancora elementi sufficienti per stabilire quale sia la causa per cui le proteine endocellulari vengono sempre assorbite in circolo, mentre le esobacillari lo

sono soltanto nella tubercolosi ossea, linfoglandolare e fibroulcerativa del polmone, restando invece in altre forme di tbc. polmonare localizzate nei focolai morbosi, dai quali possono limitatamente passare in circolo in caso di lesioni diffuse e gravi. Infatti quei casi di tbc. polmonare per cui abbiamo potuto rilevare la presenza di enzima attivo sulle esoproteine erano, come risulta dalle tabelle, individui in condizioni di particolare gravità (una positività particolarmente intensa per le esoproteine ha presentato un soggetto con meningite tbc. in condizioni preagoniche. V. tabella N. 6).

Comunque ci limitiamo in questa nota all'esposizione dei fatti osservati il cui interesse è evidente se teniamo presente l'influenza che hanno sulla specificità delle reazioni biologiche le differenze chimiche nella molecola degli antigeni. Infatti DADDI e Coll. (5) hanno dimostrato che le due frazioni proteiche del bacillo di Koch, quella del corpo bacillare e quella del terreno di coltura, differiscono l'una dall'altra sia nelle proprietà antigeniche e cutireattive che nel potere tossico. Perciò queste nostre ricerche ci sembrano di particolare importanza per gli studiosi di problemi di tubercolosi, inquantoché esse indicano una nuova ed utile via da seguire per accertare la natura del materiale proteico in circolo, in rapporto con le varie forme anatomo-cliniche della malattia.

RIASSUNTO

Gli AA. hanno ricercato nelle urine di ammalati di tbc. le proteasi specifiche di difesa contro le eso- e le endo-proteine del b. K. Le loro esperienze hanno portato alla conclusione che nelle forme osteo-articolari, nelle linfoglandolari e nelle fibroulcerative del polmone sono sempre presenti in circolo sostanze proteiche eso- ed endo-bacillari, mentre nella tubercolosi micronodulare e fibrosa dell'apice, nelle forme essudative recenti e nelle miliari che predominano i prodotti endobacillari, potendosi mettere in evidenza soltanto tracce di esoproteine solamente in casi determinati. Con esperienze collaterali hanno poi dimostrato che nel polmone tubercolare, insieme con i prodotti endocellulari sono presenti, anche se per lo più non assorbite in circolo, le proteine esobacillari.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont recherché dans les urines de malades tuberculeux les protéases spécifiques de défense contre les éso- et les endo-proteines du bacille de Koch.

Ils ont conclu, à l'issue de leurs expériences, que dans les formes ostéo-articulaires, linpho-glandulaires et dans celles fibro-ulcéraives du poulmon on retrouve toujours des substances proteiques éso- et endo-bacillaires, tandis que dans la tuberculose des formes micronodulaires et fibreuses du sommet, dans les formes éxudatives récentes et dans les miliaries se retrouvent surtout les produits endo-bacillaires, alors que seulement dans certains cas déterminés on peut mettre en évidence des traces de éso-proteines.

Conduisant d'autres expériences collatérales ils ont ensuite démontré que dans le poulmon tuberculeux, outre les produits endo-cellulaire, on retrouve les protéines éso-bacillaires.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. untersuchten den Harn tuberkulöser Kranker nach spezifischen Schutzproteasen gegen die eso- und endo-Proteinen des Kochbazillus. Aus ihren Versuchen geht hervor, dass in den Knochen-Gelenksformen, in den Lymphdrüsenformen und in den fibro-ulzerativen Formen der Lunge immer eso- und endo-bazilläre proteische Substanzen

in Kreislauf anwesend seien, während in der micronodulären Tuberkulose in der Spitzenfibrosis und in den miliaren Formen, die endobazillären Produkte vorwiegen, da man bloss in gewissen Fällen Spuren von Endoproteinen nachweisen kann. Durch Nebenuntersuchungen haben sie ferner gezeigt, dass in der tuberkulösen Lunge, zusammen mit den endozellulären Produkten, auch esobazilläre Produkte anwesend seien, obwohl diese meistens nicht im Kreislauf absorbiert werden.

SUMMARY

The authors have sought in the urine of tuberculotics for the specific defence proteasis against the exo- and endo-proteins of the Koch bacillus. Their experiences led to the conclusion that in the osteoarticular, forms lymphoglandular and fibro-ulcerative forms in the lung there are always exo- and endo-bacillary proteic substances, whilst in the micronodular tuberculosis and fibrous tissues of the apex, in recent exudative and miliary forms the endobacillary forms products predominate, and traces of esoproteins are relievable only in determined cases. Lateral researches have demonstrated that in the tubercular lung there are exo- and endoproteins.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C. CATTANEO e B. MARIANI. — «Ann. Ist. C. Forlanini», 1940, **4**, 238.
- (2) E. MORELLI. — «Ann. Ist. C. Forlanini», 1937, **1**, 81.
- (3) C. CATTANEO e B. MARIANI. — «Arch. Sci. Biol.», 1938, **24**, 139.
- (4) C. CATTANEO e B. MARIANI. — *Loc. cit.* (3).
- (5) G. DADDI e C. PANÀ. — «Ann. Ist. C. Forlanini», 1940, **4**, 809 e 822.
- (6) G. DADDI. — «Ann. Ist. C. Forlanini», 1941 **5**, 27.

~~242494~~

59660



