



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

M. MORELLINI

L'INFLUENZA DELLE SAPONINE
SUI BACILLI ACIDO-RESISTENTI

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno IV N. 11-12 Pag. 826-832



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 27

1940-XIX

L'INFLUENZA DELLE SAPONINE SUI BACILLI ACIDO-RESISTENTI

MOROELLO MORELLINI

Sull'influenza delle saponine sui caratteri morfologici e biologici del bacillo di Koch sono state compiute da alcuni AA. ricerche che hanno portato alla preparazione di vaccini antitubercolari. I risultati ottenuti hanno avuto come conseguenza un intensificarsi degli studi in questo campo allo scopo di indagare il meccanismo di azione delle saponine sulla crescita e sul metabolismo dei b. K.

I vari ricercatori però sono giunti il più delle volte a conclusioni discordanti e non esenti da critiche, per cui ho creduto interessante riprendere in considerazione questo problema.

Le prime esperienze sull'azione delle saponine sui bacilli tubercolari sono quelle di DOSTAL, che con l'aggiunta di quantità variabili di saponina (dall'1 al 10 %) ai comuni terreni per i bacilli tubercolari riuscì ad ottenere colture di bacilli che avevano perduto la loro acido-resistenza. Un risultato analogo l'A. aveva ottenuto precedentemente servendosi di terreni poveri di sostanze nutritive. Le esperienze con i terreni saponinati furono ripetute da SCHNURER, il quale però poté osservare solo in una piccola percentuale dei risultati analoghi a quelli ottenuti da DOSTAL, e, considerando la rarità con cui si osservava il fenomeno e l'impossibilità delle colture di riprendere i primitivi caratteri, concluse che i suoi risultati erano dipendenti da un inquinamento occasionale. Secondo GILDEMEISTER i bacilli cresciuti in presenza di saponina perdono l'acido-resistenza, mentre, secondo SIMONOVIC, essi la conservano integra. KIRCHNER, coltivando bacilli tubercolari su brodo glicerinato contenente saponina nella proporzione del 0,1 % trovò nel velo superficiale forme bacillari acido-resistenti e nel sedimento al fondo del recipiente forme non acido-resistenti, che però seminate su terreni solidi davano origine a colonie tipiche di bacilli acido-resistenti. Il materiale non acido-resistente, seccato e polverizzato, si è comportato come ottimo antigene nella deviazione del complemento. Una cavia infettata sotto-cute con materiale sottoposto a ripetuti passaggi (tre) su terreni saponinati, presentava dopo 2 mesi una tubercolosi cronica prevalente delle ghiandole.

ARIMA, AOYAMA, OHNAWA, studiando l'azione delle saponine su 50 ceppi di bacilli tubercolari, hanno visto scomparire completamente l'acido-resistenza in 7 casi, mentre negli altri tale perdita è stata soltanto parziale.

Dalle loro osservazioni risulta che su terreni liquidi contenenti saponina i bacilli tubercolari crescono in superficie con un velo più delicato e più grigio, formando col tempo al fondo del recipiente un sedimento filamentoso, che si apprende in una massa gelatinosa semi-trasparente.

Sui terreni solidi saponinati le colonie hanno un aspetto umido, delicato, lucente, grigio chiaro, semi-trasparente, mentre su agar normale sono asciutte, ruvide, opache, grigie, non trasparenti. Col liquido di ZIEHL i bacilli cresciuti in presenza di saponina si tingono in bleu, ma trapiantati su terreni normali riprendono le caratteristiche dei comuni bacilli tubercolari.

Questi AA. hanno saggiato il loro materiale sugli animali e i risultati ottenuti avrebbero dimostrato che le colture cresciute su terreni saponinati sono 1000 volte meno virulente di quelle dello stesso ceppo coltivato su terreni normali. Infatti 100 mg. della nuova coltura avrebbero provocato nella cavia soltanto una tubercolosi localizzata al punto di inoculazione o al massimo una leggerissima tubercolosi generalizzata. In seguito a queste esperienze, partendo da colture di bacilli tubercolari su terreni saponinati, fu preparato un vaccino antitubercolare denominato «AO», che usato sperimentalmente a scopo preventivo e curativo avrebbe dato risultati confortanti. Del resto in Giappone è stato usato a scopo profilattico su migliaia di bambini senza inconvenienti. Ma SCHMELZER, sperimentando con questo stesso vaccino, trovò che esso non ha azione nè curativa sulle cavie infettate, nè preventiva sugli animali sani, stabilendo soltanto una difesa molto relativa contro l'infezione tubercolare. Le stesse osservazioni furono fatte da VASARHELYI.

BELFANTI e DESSY hanno pubblicato che l'iniezione nelle cavie di mg. 0,1 di coltura di bacilli tubercolari virulenti, cresciuti per 3 settimane su patata, emulsionati in 1 cc. di soluzione sterile di saponina al 2,5% e tenuti in stufa per 72 h., non solo non infetta, ma stabilisce in quasi tutti gli animali una resistenza di fronte ad una successiva infezione. Così essi prepararono un vaccino (ATMIS) con bacilli tubercolari bovini e *saponinum album purissimum*, da usarsi per via sottocutanea, la cui durata sarebbe pressochè indefinita. Le numerose esperienze, che sono in corso da diversi anni, avrebbero dato secondo DESSY risultati favorevoli su cavie, capre e bovini.

Ma DE SANTIS MONALDI, ripetendo le esperienze di BELFANTI e DESSY con la loro medesima tecnica, conclude che nessuna delle cavie trattate ha resistito all'infezione; solo un certo numero di esse ha sopravvissuto ai controlli per un periodo di tempo 3-4 volte superiore. Inoltre DE SANTIS MONALDI ha osservato che la permanenza in stufa a 38° per 72 h. in presenza di saponina uccide gran parte dei bacilli, e il fatto che le cavie possono sopravvivere più o meno lungamente ai controlli dipende dalla dose diversa di bacilli virulenti che esse hanno ricevuto. In alcuni casi poi il vaccino è ancora così virulento da provocare di per sé la morte dell'animale.

ANANIADES e MATTHAIKI, che hanno ripreso recentemente queste ricerche, hanno osservato che la semina di bacilli, emulsionati in saponina al 2,5%, anche dopo la permanenza in stufa a 38° per 10 gg., dà luogo a sviluppo di numerose colonie; solo dopo 20 gg. di stufa, tanto le emulsioni con saponina, come quelle di controllo, rimangono sterili e le cavie trattate con bacilli tubercolari, cresciuti su saponina o emulsionati in questa sono tutte morte più rapidamente e con forme tubercolari più gravi che non le cavie di controllo.

MAXIM, coltivando bacilli tubercolari umani su terreno LOCKEMANN addizionato con saponina, trovò che le piccole concentrazioni di questa sostanza permettono un rapido e rigoglioso sviluppo, mentre le forti concentrazioni (1-3%) inibiscono la crescita. Secondo questo A. le colture su terreni saponinati si differenzierebbero dalle colture di controllo per la mancanza di acidoresistenza, mancanza dovuta alle profonde alterazioni, indotte dalla saponina nella frazione lipidica del bacillo di Koch, alla quale sarebbe legata l'acidoresistenza dei bacilli tubercolari.

Questa alterazione prodotta dalla saponina è però di natura non definita e di difficile interpretazione, tanto più che la presenza di colesterina (di cui

sono noti i composti con le saponine) nel bacillo di Koch, ammessa da HECHT, è stata decisamente negata da ANDERSON, SCHOENHEIMER, CROWDER e STODOLA. Anche CATTANEO nel nostro Istituto non ha mai potuto constatare presenza di colesterina nei lipidi del b. K.

L'ammissione poi che l'acido-resistenza sia legata solamente alla presenza dei grassi (e fra questi specialmente alle cere) non è strettamente rigorosa. Infatti nel nostro Istituto con l'uso del vibro-agitatore del Prof. MORELLI è stato da tempo osservato che il materiale amorfo ottenuto mediante sbattimento di bacilli di Koch con quarzo granulare, non presenta più acido-resistenza, pur contenendo tutte le frazioni bacillari nelle proporzioni corrispondenti a quelle presenti nelle cellule, di per sé acido-resistenti. L'acido-resistenza è perciò da considerarsi piuttosto come una proprietà dovuta alla particolare struttura del mosaico di frazioni chimiche, che costituiscono la cellula del bacillo e che ne determina, mediante l'intervento di forze colloidali, il caratteristico comportamento di fronte alla fucsina.

Riassunte così brevemente le cognizioni su questo argomento, passo ad esporre le mie ricerche.

PARTE SPERIMENTALE.

Sono state eseguite diverse serie di esperienze, che, per maggior chiarezza, riporto separatamente. La saponina usata è stata quella fornita dalla ditta Erba e dalla ditta Kahlbaum.

Esperienza n. 1.

È stata seminata su terreno Lockemann normale e su terreno Lockemann addizionato con saponina commerciale al 2 % un'ansata di velo culturale di 16 gg. da Sauton, dei ceppi seguenti:

Umano H 522, Umano Trompeter, Bovino Vallée, Timothée.

Dopo 30 gg. il Timothée ed il Trompeter erano abbondantemente sviluppati, mentre la crescita era piuttosto modesta per il Vallée ed assolutamente scarsa per l'H 522. Tuttavia non esistevano differenze tra colture saponinate e colture di controllo, né se ne poterono rilevare dopo 50 gg.; solo nei paloni seminati con Timothée e Trompeter si poteva osservare un'abbondante caduta al fondo delle colture. I preparati microscopici, allestiti con questo materiale, colorati col metodo di Ziehl, hanno dimostrato la presenza nel Timothée di scarsi elementi bacillari e granulari acido-resistenti tanto nelle colture con saponina come in quelle di controllo sia per il velo superficiale sia per il materiale depositatosi al fondo del matraccio e negli altri ceppi forme bacillari, con acido-resistenza inalterata così in superficie come al fondo.

Esperienza n. 2.

Su terreno Sauton e Lockemann normale e saponinato al 0,5, 2, 3, 5, 10, 30 % sono stati seminati un ceppo di bacilli tubercolari umano ed uno bovino.

Dopo 40 gg. i risultati erano i seguenti:

In terreno Lockemann controllo il ceppo umano era cresciuto per una superficie del diametro medio di 4-5 cm.; in terreno Lockemann contenente saponina nella concentrazione del 0,5-2-3 % la crescita era scarsissima e con saponina in concentrazione maggiore si osservava assenza completa di sviluppo. Lo stesso comportamento è stato osservato per il ceppo bovino, solo che lo sviluppo è inibito completamente anche alla concentrazione del 3 %.

In terreno Sauton contenente saponina nelle concentrazioni sopra indicate il ceppo umano ha presentato uno sviluppo modestissimo, mentre il ceppo bovino è cresciuto abbondantemente come sul terreno di controllo fino alla concentrazione del 5 %. E da far osservare che tutte le colture su terreno saponinato presentavano un precipitato al fondo del matraccio.

Con il velo colturale di Vallée, cresciuto 24 gg. su Sauton saponinato al 2 % sono state eseguite le prove di virulenza sugli animali. In 3 conigli si inietta endovena 1 cc. di una emulsione in soluzione fisiologica di bacilli cresciuti su saponina, contenente 1/5 di mg. di coltura per cc. Per controllo si iniettano altri 3 conigli con 1/5 di mg. di coltura dello stesso ceppo, cresciuto su Sauton normale. Gli animali sono stati sacrificati dopo 70 gg. e all'autopsia tanto quelli dell'esperienza come i controlli presentavano lesioni tubercolari ai polmoni ed ai reni presso che nelle stesse proporzioni. Anche gli esami istologici degli organi non hanno messo in evidenza differenze apprezzabili tra le lesioni dei conigli sottoposti ai due trattamenti.

Esperienza n. 3.

Queste esperienze sono state fatte principalmente con lo scopo di osservare le variazioni morfologiche dei germi cresciuti su terreni contenenti saponina e per controllare il tempo di sopravvivenza dei bacilli a contatto con la saponina.

Per studiare l'azione della saponina sulla vitalità dei germi sono state preparate le seguenti emulsioni:

1) cc. 1,80 di sol. sterile di saponina 2 % + cc. 0,20 di una sospensione di bacilli Vallée cresciuti per 24 gg. su Sauton addizionato con saponina 2 %, contenente mg. 1 di coltura per cc.

2) cc. 1,80 di sol. fisiol. sterile + cc. 0,20 di una sospensione di bacilli Vallée cresciuti per 24 gg. su Sauton addizionato con saponina 2 %, contenente mg. 1 di coltura per cc.

3) cc. 1,80 di sol. sterile di saponina 2 % + cc. 0,20 di emulsione di bacilli Vallée cresciuti per 24 gg. su Sauton normale, contenente mg. 1 di coltura per cc.

4) cc. 1,80 di sol. fisiol. sterile + cc. 0,20 di emulsione di bacilli Vallée cresciuti per 24 gg. su Sauton normale, contenente mg. 1 di coltura per cc.

Queste emulsioni vengono tenute in stufa a 38° e a partire dalle prime 24 h. vengono seminate ogni giorno su terreno Petragiani fino al 5° giorno. Il risultato della lettura dopo 1 mese dalla semina viene riassunto nella tabella che segue, dove si indica il numero medio delle colonie cresciute nei provettoni.

EMULSIONE	1	2	3	4
I trapianto	45	150	100	200
II "	0	20	0	200
III "	0	10	0	30
IV "	0	0	0	1
V. "	0	1	0	1

Da questa tabella risulta come già dopo 48 h. di termostato a contatto con la saponina, tanto i bacilli cresciuti su terreno più saponina quanto quelli cresciuti su terreno normale non abbiano più dato luogo a sviluppo.

Per quanto riguarda l'azione sul comportamento morfologico dei bacilli si preparano terreni Sauton addizionati con saponina nelle proporzioni del 2-10-30 % e terreni di Sauton normale come controllo. Si semina in tutti un'ansata di velo colturale di bacilli tubercolari bovini (Vallée). Dopo 8 gg. l'aspetto delle colture è il seguente :

nei palloni di controllo il velo è piuttosto sottile e risale modicamente sulle pareti ;

nei palloni contenenti saponina al 2 % l'aspetto della coltura è sostanzialmente lo stesso ;

nei palloni contenenti saponina al 10 % il velo è più abbondante, pieghettato e risale sulle pareti molto più dei precedenti ;

lo stesso si può dire per la coltura cresciuta su terreno saponinato al 30 %.

Gli esami microscopici dei veli colturali dimostrano che le forme bacillari della coltura su saponina al 2 % sono uguali a quelle che si osservano per la coltura di controllo, mentre in presenza di saponina al 10-30 % si ha un aumento di forme granulari e la comparsa di forme allungate.

Trascurando la concentrazione massima, con le colture cresciute su terreni saponinati al 2-10 % e con quella di controllo si preparano 3 emulsioni contenenti ciascuna 1/5 di mg. di coltura per cc., per studiarne le proprietà patogene.

Ogni emulsione si inietta endovena in 3 conigli nella quantità di 1 cc. per ciascuno. I conigli, che sono tutti notevolmente diminuiti di peso, si sacrificano dopo 100 gg. All'esame autoptico presentano una grave disseminazione di noduli tubercolari ai polmoni e quasi sempre qualche nodulo ai reni, ma nè l'esame microscopico nè l'esame istologico degli organi mettono in evidenza differenze tra animali trattati con bacilli cresciuti su saponina e animali di controllo.

Esperienza n. 4.

Su terreno Sauton e Lockemann contenenti il 2-5-10 % di saponina e sugli stessi terreni normali viene fatto un altro gruppo di semine con bacilli tubercolari Vallée. Dopo 1 mese la crescita sui terreni Sauton saponinati è abbondante come nei controlli.

Le colture su terreno Lockemann saponinato differiscono invece dalle colture di controllo per la presenza di precipitato al fondo e perchè il velo superficiale è più lieve.

L'esame microscopico, eseguito sul velo superficiale, mostra nelle colture saponinate un maggior numero di forme allungate e granulari, ma in nessun caso si ha modificazione del carattere acido-resistente.

Si fanno quindi sistematici passaggi ogni 15-20 gg. da Sauton saponinato 2 % a Sauton saponinato 2 %, mentre la stessa tecnica si usa per le colture di controllo su Sauton normale. Ciò serve per lo studio particolareggiato dell'aspetto delle colonie cresciute su terreno saponinato in confronto con quelle cresciute su terreno normale.

Le colture, che si sviluppano in presenza di saponina, mostrano già dopo i primi passaggi un velo spesso, completo, rugoso, festonato, che risale abbondantemente sulle pareti e si osserva un leggero precipitato al fondo del matraccio.

Nelle colture di controllo invece il velo è sottile a isole a velo rugoso alternate con isole vuote e manca il precipitato.

Al 5° passaggio da terreno saponinato a terreno saponinato già dopo soli 8 gg. si osserva una crescita totale con i caratteri descritti, mentre nei

terreni di controllo la superficie è ricoperta solo per 4/5 da un velo leggero. Ma 12-15 gg. le due colture diventano uguali sia come quantità, che come qualità.

La saponina determina perciò una precocità di sviluppo, che nei successivi passaggi si fa ancora più manifesta. I germi sono ancora dotati tutti di acido-resistenza.

All'11° passaggio il materiale coltivato in presenza di saponina si trapianta in parte ancora su Sauton saponinato, in parte su Sauton normale. Entrambe le colture crescono coi caratteri di velo spesso, uniforme, che risale abbondantemente sui bordi, mentre il controllo si sviluppa in forma di velo sottile, ineguale e incompleto.

Al 20° passaggio i caratteri sono sempre gli stessi. Le osservazioni microscopiche danno i medesimi risultati per le colture saponinate e per quelle di controllo: tutte le forme bacillari presentano inalterata l'acido-resistenza.

Dopo il 20° passaggio si preparano 3 emulsioni in sol. fisiologica contenenti l'una la coltura passata 20 volte su terreno saponinato al 2%, l'altra la coltura passata 11 volte su terreno saponinato al 2% e 9 volte su Sauton normale e la terza la coltura passata 20 volte su Sauton normale.

Le 3 emulsioni servono per la semina su terreno Petragrani e per le prove di virulenza.

Per la semina su terreno Petragrani si usano emulsioni contenenti 1/10 di mg. di coltura per cc. e con ogni emulsione si seminano 6 provettoni (1 anisata per ogni provettone di un'anisa calibrata di 4 mm.). Il numero medio delle colonie che si sviluppano è di 13 per il controllo, 23 per la coltura passata ininterrottamente su terreno saponinato e 14 per la coltura passata prima su terreno saponinato e poi su terreno normale.

Per le prove di virulenza si adopera un'emulsione contenente per ciascuna delle 3 colture 1/100 mg. per cc., che si inietta endovena in 2 conigli nella quantità di 1 cc.

I conigli si sacrificano dopo 100 gg., ma anche in questa esperienza non è possibile osservare differenze apprezzabili nella gravità e nell'estensione delle lesioni presentate dagli animali niettati con bacilli cresciuti su saponina e dagli animali iniettati con bacilli cresciuti su terreni normali.

Riassumendo e concludendo, da tutte queste esperienze risulta:

1) che la presenza di saponina non ostacola la crescita dei b. tbc. sui terreni liquidi sintetici neppure alla concentrazione del 10 e del 30%, ma che anzi dopo i primi passaggi la coltura si sviluppa più rapidamente che non sul terreno di controllo e con caratteristiche particolari: mentre nei controlli il velo è ineguale, ad isole sottili alternate con zone vuote, nel terreno saponinato il velo è spesso, pieghettato, ricopre uniformemente tutta la superficie, risalendo abbondantemente sulle pareti, e presenta un sedimento al fondo del recipiente;

2) che né il velo superficiale, né il precipitato formatosi al fondo del recipiente hanno perduto l'acido-resistenza; la sola modificazione morfologica notevole è data da un numero di forme bacillari allungate e granulose maggiore nelle colture saponinate che nelle colture di controllo;

3) che i bacilli bovini Vallée, emulsionati in saponina al 2% e mantenuti in stufa a 38° perdono già dopo 48 h. la facoltà di svilupparsi su terreno Petragrani, mentre gli stessi bacilli in sol. fisiologica crescono ancora dopo 10 gg.;

4) che per quanto riguarda la virulenza, neppure dopo 20 passaggi su terreno saponinato al 2% è stato possibile osservare delle modificazioni nell'andamento dell'infezione tubercolare sperimentale nei conigli.

RIASSUNTO

La saponina, che addizionata ai terreni nutritivi non ostacola neppure alla concentrazione del 30 % la crescita dei bacilli di Koch, ne distrugge invece la vitalità già dopo 48 h., se addizionata ad un'emulsione di germi, lasciati a 38°. Secondo l'A. poi, lo sviluppo in presenza di saponina lascia inalterata l'acido-resistenza dei bacilli e non porta modificazioni nella loro virulenza.

RÉSUMÉ

La saponine, alors qu'ajoutée aux terrains nourritifs n'empêche pas la croissance des bacilles de Koch, même à une concentration de 30 % : en détruit, cas contraire, la vitalité au bout de 48 h. si elle est ajoutée à une émulsion de germes, laissés préalablement à 38°. De plus, selon l'A., le développement en présence de saponine laisse inaltérée l'acido-resistance des bacilles et n'atténue nullement leur virulence.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Lauge die, addioniert mit den Nährböden, nicht einmal in einer 30 % tigen Konzentration das Wachstum der K. B. behindert, zerstört hingegen die Vitalität derselben bereits nach 48 Stunden wenn man sie mit einer Emulsion von Keimen bei 38° addioniert. Nach Verf. verlieren die Bazillen bei der Entwicklung in Gegenwart der Lauge ihre Säurefestigkeit nicht und auch ihre Virulenz wird in keiner Weise verändert.

SUMMARY

Saponine, which when added to the culture media does not obstacle the increase of the Koch bacillus even when concentrated up to 30 %, does, however, destroy its vitality, already after 48 hours, if added to an emulsion of germs left at 38°. According to the writer, the development in the presence of saponine leaves the acid resistance of the bacilli unaltered and their virulence unmodified.

BIBLIOGRAFIA

- ANANIADES B. e E. MATTHAIKI. — « C. R. Soc. Biol. », **125**, 415, 1937.
ANDERSON R. J., R. SCHOENHEIMER, J. A. CROWDER u. F. H. STODOLA. — « Zeit. Physiol. Chem. », **237**, 40, 1935.
ARIMA R., K. AOYAMA u. J. OHNAWA. — « Deut. Med. Woch. », **50**, 666, 1924.
BELFANTI S. e G. DESSY. — « Boll. It. Soc. Internaz. Microbiol. », **3**, 325, 1931.
CATTANEO C. — Comunicazione personale.
DE SANCTIS MONALDI T. — « C. R. Soc. Biol. », **110**, 792, 1932; Id. — « C. R. Soc. Biol. », **110**, 874, 1932.
DESSY G. — « Atti VI Congr. Naz. Microbiol. », 1937, pag. 535-616.
HECHT E. — « Zeit. Physiol. Chem. », **231**, 279, 1935.
KIRCHNER O. — « Beitr. Klin. Tbk. », **70**, 389, 1928.
LEITNER J. — « Die Tub. », **16**, 212, 1936.
MAXIM M. — « Zeit. f. Tbc. », **72**, 27, 1935.
MORELLI E. — « Ann. Ist. C. Forlanini », **1**, 1, 1937.
VASARHELYI I. — « Zeit. f. Tbc. », **74**, 40, 1935.

59683

~~340097~~







