



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

Dott. GIUSEPPE ZORZOLI

INFLUENZA DEI FILTRATI DI ALCUNI MICETI SUL BACILLO TUBERCOLARE UMANO E BOVINO

NOTA SECONDA

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno IV, N. 3-4, Pag. 221-237



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 29
—
1940-XVII





INFLUENZA DEI FILTRATI DI ALCUNI MICETI
SUL BACILLO TUBERCOLARE UMANO E BOVINO.

NOTA SECONDA.

Dott. GIUSEPPE ZORZOLI

In una nota precedente ho comunicato i risultati di un primo gruppo di ricerche riguardanti l'influenza dei filtrati di vari miceti sulla crescita dei bacilli tubercolari. Ho allora preso in esame i filtrati di un gruppo numeroso di miceti appartenenti alle famiglie delle micotorule e degli aspergilli e ho studiato la loro rispettiva azione su due ceppi di BK umano e bovino.

Richiamo in breve in risultati di questo primo gruppo di ricerche che possono essere così riassunti.

Di fronte a filtrati di funghi che non manifestano nessuna evidente azione sulla biologia del BK o solo una lieve influenza sia in senso favorevole che in senso dannoso, esiste un gruppo di miceti i cui filtrati esercitano un'azione di netto ostacolo sullo sviluppo del BK tanto umano che bovino.

Questa azione di ostacolo può arrivare fino alla abolizione totale di ogni facoltà di crescita del BK.

Seguendo due modalità di tecnica diverse, cioè semina di BK in terreno liquido costituito da filtrato più terreno di SAUTON in proporzione varia, e semina in terreno solido di PETRAGNANI di BK trattati con filtrati a varie diluizioni e per tempi vari, l'intensità dell'azione inibente dei filtrati è pressochè parallela per gli stessi funghi nelle diverse prove, pur essendo sempre più intensa e regolare nelle prove su terreni solidi.

Questi risultati qui brevemente accennati ci portavano ad ammettere l'esistenza di un principio ostacolante la crescita del BK proprio ad alcuni ceppi di funghi, pressochè costante nella sua azione, diverso di intensità da fungo a fungo.

In questo secondo gruppo di ricerche mi sono proposto appunto di controllare ulteriormente e di meglio individualizzare questo principio antibatterico nonchè di studiarlo, nei limiti del possibile, in alcune sue caratteristiche biologiche e fisiche.

Le ricerche sono state così inquadrate:

Sono stati presi in esame solo i filtrati di quei funghi che nelle prove preliminari avevano dimostrato una ben netta azione di ostacolo sulla crescita della BK.

Sono state tralasciate le prove di crescita del BK in terreni liquidi costituiti da filtrati aggiunti in proporzioni varie e liquido di SAUTON perchè poco proprie e precise nella loro impostazione tecnica e perchè di difficile interpretazione.

È stato invece dato maggiore sviluppo al metodo già prima adottato e dimostratosi più rispondente, di studiare la crescita del BK in terreni di cultura normali dopo varia permanenza degli stessi in sospensioni nei filtrati in esame a varie diluizioni.

Per istituire un controllo diretto alle precedenti esperienze le sospensioni bacillari in filtrati, oltre che sui terreni solidi di PETRAGNANI, come era stato allora fatto, sono state seminate anche in terreni liquidi e più precisamente in terreni di SYSER, particolarmente adatti per la crescita del BK in profondità, e quindi per la semina di sospensioni bacillari, e in terreni al siero di coniglio inattivato, secondo la tecnica recentemente proposta da SARNOWEC per il riconoscimento del potere batteriolitico degli estratti di organi.

Parallelamente sono state eseguite le prove di inoculazione in cavia con le stesse sospensioni di BK in filtrati.

In ultimo sono state prese in esame le caratteristiche di termo-resistenza di questo eventuale principio antibatterico esistente nei filtrati.

Passerò ad elencare i vari gruppi di ricerche descrivendone di volta in volta i metodi usati e discutendone i risultati ottenuti.

I. — *Crescita del BK umano e bovino su terreni di cultura solidi di Petraghani dopo varia permanenza in sospensione di filtrati.*

Sono stati presi in esame i filtrati dei miceti R 1, P 229, P 237 (1). Sono questi i ceppi di funghi che nelle prime prove avevano dimostrato una più evidente attività inibente lo sviluppo del BK tanto umano che bovino. I ceppi tubercolari su cui è stata controllata l'attività dei miceti sono gli stessi già usati nelle precedenti esperienze: L'H 522 ceppo umano e il B 12 ceppo bovino, entrambi della collezione del nostro laboratorio.

I filtrati sono stati preparati secondo la tecnica già esposta nel precedente lavoro e che qui accennerò brevemente.

Preparazione dei filtrati e tecnica delle ricerche. — Da una cultura dell'età di 24 giorni cresciuta in Agar, vengono seminate due ansate in terreno liquido di HANSEN e mantenute ad una temperatura di 37°. Dopo 72 ore il terreno liquido viene filtrato attraverso candele CHAMBERLAN L 3. Un campione del filtrato viene seminato su Agar carote e SABOURAUT per controllarne la sterilità.

I singoli filtrati sono diluiti al 25 %, al 15 %, al 10 % e al 5 % con soluzione fisiologica, tralasciando le miscele a più elevato tasso di filtrato già sufficientemente sperimentate nel precedente lavoro.

Con ogni filtrato vengono allestite due serie di provette contenenti ciascuna cc. 48 delle singole diluizioni scalari. A parte vengono preparati due emulsioni di H 522 e B 12 in soluzione fisiologica al tasso di un mgr. per cc.

In ogni provetta contenente cc. 1,8 delle rispettive diluizioni dei filtrati viene seminato cc. 0,20 dell'emulsione di BK, il ceppo H 522 in una serie di provette, il B 12 nell'altra. Si formano così nei vari filtrati sospensioni di BK al tasso di 1/10 di mgr. per cc.

(1) R 1 = *Monilia Albica* 2112: Nat. Coll. Type Cultures, Lister Institute; Isolato da CRAIK da un caso di mugghetto. — P 229 = *Aspergillus Albus*: PUNTONI, Lab. Batt. della R. Università di Pavia. — P 237 = *Aspergillus Niger*: PUNTONI, Lab. Batt. della R. Università di Pavia.

Come controllo servono miscele in concentrazione analoga di terreno di HANSEN e soluzione fisiologica, e soluzione fisiologica pura in cui vengono fatte sospensioni dei BK in esame allo stesso tasso di 1/10 di mgr. per ogni cc.

I BK vengono lasciati in questa sospensione rispettivamente per 4, 24, 72, 96 ore a 37° in termostato. Allo scadere dei termini fissati da ogni sospensione viene prelevata un'ansata e passata in terreno PETRAGNANI, con ogni sospensione si seminano tre terreni.

Come si vede dalle tabelle e come già è stato detto in queste ricerche sono stati presi in esame solo soluzioni alquanto diluite dei singoli filtrati, tralasciando le miscele a più elevato tasso di filtrati. Mi parve infatti dalle ricerche del precedente lavoro già sufficientemente documentata l'azione batteriostatica dei filtrati in esame quando questi siano usati puri o in concentrazione superiore al 25 %. D'altronde interessava soprattutto graduare l'intensità del fenomeno in esame, per cui mi parve più utile limitare lo studio a quelle diluizioni minime in cui il fenomeno comincia a manifestarsi. Di ogni filtrato ho così preparato una serie di diluizione al 25 %, 15 %, 10 %, 5 %.

Dal confronto di questi risultati con quelli corrispondenti del precedente lavoro si ha una conferma dei dati allora enunciati; qui l'azione batteriostatica appare anzi con maggiore evidenza in tutti i filtrati.

Paragonando i risultati ottenuti sul ceppo umano H 522 e sul bovino B 12, per i filtrati dei P 229 e P 237 si nota un certo parallelismo di azione. Per i filtrati di RI come già nelle ricerche precedenti l'attività inibente si esercita molto più intensamente sul ceppo umano che sul bovino.

Esaminando dettagliatamente i singoli risultati possiamo osservare in genere una certa corrispondenza fra intensità dell'azione batteriostatica e diluizione dei filtrati, cioè una certa regolarità nei risultati. Qualche dato discorde si rileva nella tabella relativa al filtrato di RI; infatti l'azione ostacolante appare più manifesta nelle diluizioni al 10 e al 5 % che in quelle superiori del 15 e del 25 %, tanto sul BK umano che sul bovino.

Il fatto non è facilmente spiegabile, e d'altronde non ha avuto riscontro in altre ricerche. Certo le lievi differenze di concentrazione tra una soluzione e la susseguente possono in parte giustificare i risultati non perfettamente regolari.

Il più attivo dei filtrati in esame appare il P 237 e questo in pieno accordo con i dati delle precedenti ricerche; sul BK umano il filtrato del P. 237 inibisce qualunque crescita dopo 24 ore di contatto a tutte le diluizioni, meno attivo appare sul BK bovino, dove alle diluizioni massime del 5 % v'è ancora crescita dopo 24 ore.

Nei controlli la crescita è sempre abbondante e regolare; fa eccezione il controllo del B. 12 in soluzione fisiologica pura, ove si verifica una graduale diminuzione della crescita in rapporto al tempo di contatto, con mancanza assoluta di sviluppo dopo 96 ore.

Evidentemente però i soli controlli che hanno valore di confronto diretto, sono quelli delle sospensioni HANSEN e soluzione fisiologica nelle stesse diluizioni dei filtrati, poichè, solo queste ci portano nelle medesime condizioni sperimentali.

D'altronde è nota l'azione battericida della soluzione fisiologica su certi ceppi di BK che in realtà nei casi nostri, come abbiamo già osservato nel precedente lavoro, non è mai stata così grande come altri affermano, pure essendo talora manifesta.

TAVOLA 2^a

CRESITA DI BK BOVINO B 12 SU TERRENO DI CULTURA PETRAGNANI DOPO VARIA PERMANENZA IN SOSPENSIONE DI FILTRATI.

FILTRATI	Prima lettura (dopo 28 giorni dalla semina)					Seconda lettura (dopo 50 giorni dalla semina)				
	Dopo 4 h	Dopo 24 h	Dopo 72 h	Dopo 96 h	Dopo 4 h	Dopo 24 h	Dopo 72 h	Dopo 96 h		
	R I 25 %	++++	++++	⊖	⊖	++++	++++	++++	++	
R I 15 %	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
R I 10 %	++++	++++	+(10 c)	⊖	++++	++++	++++	+(3 c)		
R I 5 %	++++	+(2 c)	⊖	⊖	++++	+(5 c)	+	⊖		
P 229 25 %	++++	++++	⊖	⊖	++++	++	⊖	⊖		
P 229 15 %	++++	⊖	⊖	⊖	++++	⊖	⊖	⊖		
P 229 10 %	++++	⊖	⊖	⊖	++++	⊖	⊖	⊖		
P 229 5 %	++++	⊖	⊖	⊖	++++	+(1 c)	⊖	⊖		
P 237 25 %	++++	⊖	⊖	⊖	++++	⊖	+(1 c)	⊖		
P 237 15 %	++++	++++	⊖	⊖	++++	++++	⊖	⊖		
P 237 10 %	++++	⊖	⊖	⊖	++++	+(2 c)	⊖	⊖		
P 237 5 %	++++	++++	++	+(7 c)	++++	++++	++++	++++		
Controlli :										
Hansen + Sol. fis. 25 %	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
" " 15 %	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
Sol. fis.	++++	++++	inq.	inq.	++++	++++	inq.	inq.		

II. — Crescita del BK umano H 522 su terreno al siero di coniglio inattivato, aggiunto in parti uguali a filtrato di miceti.

È questo il metodo adottato da SARNOWIEC per la identificazione del potere battericida presente negli estratti alcoolici degli organi. Il metodo oltre che per la spiccata sensibilità viene consigliato per la caratteristica di permettere la crescita del BK anche in profondità ed è perciò particolarmente adatto alla semina di sospensioni bacillari in mezzo liquido.

Da noi è stato scelto soprattutto per istituire un controllo alle ricerche del precedente lavoro, consistenti nella semina di BK in terreno liquido costituito da filtrato e terreno di SAUTON.

Il metodo precedente richiedendo la semina in superficie non permetteva un dosaggio dei BK seminati, e per di più era soggetto alle incertezze ed irregolarità di crescita sempre esistenti nelle semine in superficie. Con la tecnica proposta da SARNOWIEC, essendo possibile un migliore dosaggio dei BK seminati, si possono creare sospensioni a tasso noto a scalare di BK nel terreno di cultura stesso, così che il metodo acquista in sensibilità e permette di graduare l'intensità dell'azione antibatterica dei filtrati in esame.

Trascrivo qui in breve la tecnica del metodo di SARNOWIEC da me adottato per lo studio dell'azione dei filtrati sul BK.

Tecnica. — I filtrati vengono preparati col solito procedimento già descritto. Tutti i filtrati vengono portati a PH 7,1-7,3 secondo il metodo di SARNOWIEC. Di ogni filtrato si fanno 3 emulsioni di BK ceppo umano H 522 contenenti in un cc. rispettivamente 1/500, 1/50.000, 1/500.000 di mmgr. di patina bacillare A parte si allestisce una serie di provettine contenenti ciascuna cc. 0,5 di siero di coniglio inattivato per mezz'ora a 50°, che costituisce il terreno di coltura. Con ognuna delle 3 sospensioni si seminano 5 provettine contenenti il siero di coniglio, mettendo in ciascuna di essa cc. 0,5 della sospensione batterica. Si eseguono controlli con sospensioni di BK in soluzione fisiologica riportandoci nelle stesse condizioni sperimentali. Naturalmente le sospensioni iniziali di BK a 1/500, 1/50.000, 1/500.000 vengono ad essere, dopo il passaggio nel siero di coniglio, diluite ad 1/1000, 1/100.000, 1/1.000.000.

La lettura delle culture viene fatta in base all'intorbidamento del terreno liquido e al deposito flocculare dei germi che si raccolgono in fondo alle provettine. L'interpretazione e la valutazione del grado di crescita dei germi in ogni provetta non è quindi rigorosamente precisabile ma sempre alquanto soggettiva. Hanno valore assoluto solo i risultati negativi.

Nella presente ricerca sono stati presi in esame oltre ai filtrati di miceti (P 229, P 230, P 237) anche il filtrato di Piociano in considerazione della particolare attività batteriolitica che da alcuni vi si attribuisce.

Per ciò che riguarda i funghi le ricerche presenti confermano in pieno i risultati dei precedenti esami su terreni solidi. Il filtrato più attivo appare ancora il P 237 che aggiunto al 50 % nel terreno al siero di coniglio inibisce quasi completamente lo sviluppo del BK umano anche seminato al tasso di 1 a 1.000; segue poi il P 229 la cui attività batteriostatica è di pochissimo inferiore alla precedente. Il P 230 manifesta un'azione di ostacolo meno costante e netta. Per il filtrato del piociano si rileva una scarsa attività batteriostatica. Le crescite nelle singole provette sono talora un po' meno rigogliose che nei rispettivi controlli, ma non si raggiunge mai un arresto completo di sviluppo.

A maggior valorizzazione di questi risultati torna utile richiamare alcune osservazioni comunicate nel precedente lavoro sull'argomento, riguardanti la semina dei BK in terreno liquido.

Seminando allora un'ansata di BK sulla superficie di un terreno liquido costituito da filtrato aggiunto in parti uguali a terreno di SAUTON avevo notato una notevole inibizione nella crescita del BK per certi filtrati di miceti e precisamente per quelli stessi ora ripresi in esame. Questa inibizione però non era costante e regolare nè così intensa come nelle ricerche presenti: la diversità di comportamento va forse ricercata oltrechè nella differente modalità di semina, quantitativamente non controllata nel primo caso, anche nella differente modalità di crescita dei BK nei due terreni; infatti col primo metodo i BK seminati in superficie ad ansate su terreno liquido non vengono a così intimo contatto col filtrato come nelle semine in sospensioni del secondo metodo, e quindi non sono così soggetti all'attività dei filtrati stessi.

FILTRATI	TASSO DEI BK SEMINATI	SVILUPPO DEL BK NELLE SINGOLE PROVETTINE				
Filtrato P 230	1/1.000	+	⊖	+	+	++
	1/100.000	+	+	⊖	⊖	⊖
	1/1.000.000	+	⊖	⊖	⊖	⊖
Filtrato P 229	1/1.000	+	+	+	⊖	⊖
	1/100.000	+	⊖	⊖	⊖	⊖
	1/1.000.000	⊖	⊖	⊖	—	—
Filtrato P 237	1/1.000	+	⊖	⊖	—	—
	1/100.000	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
	1/1.000.000	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
Piocianina	1/1.000	++	+	+++	+	++
	1/100.000	++	⊖	+	++	+
	1/1.000.000	⊖	+	⊖	+	+
Controllo	1/1.000	++	+++	+++	++	⊖
	1/100.000	+	+	++	++	⊖
	1/1.000.000	++	++	+	⊖	—

III. — Crescita del BK umano H 522 su terreno di cultura liquido alla Syser dopo varia permanenza in sospensione di filtrati.

Sono presi in esame i filtrati dei ceppi R I, P 229, P 237.

I filtrati vengono usati puri e alle diluizioni del 50 %, o del 5 % in soluzione fisiologica.

Con ogni filtrato e con le rispettive diluizioni viene fatta una sospensione di BK H 522 al tasso di 1/10 di mmgr. per cc.

Le sospensioni vengono poste in termostato a 37.

Dopo 4, 24, 72, 96 h. di permanenza in termostato, con le rispettive sospensioni bacillari vengono seminati tre provettoni contenenti 10 cc. ciascuno di terreno di SYSER, alla dose di 1/2 cc. per provettone.

Come controllo servono analoghe concentrazioni di liquido di HANSEN con soluzione fisiologica, in cui vengono fatte le stesse sospensioni di BK.

È stato scelto il terreno di SYSER che, come è noto, ha la proprietà di permettere la crescita dei BK immersi nel mezzo liquido, ed è perciò particolarmente atto allo scopo.

La crescita su terreno di SYSER si manifesta con una patina opaca sottile sulla superficie liquida, e con numerose flocculazioni che si raccolgono in fondo

alla provetta. La valutazione della intensità di crescita è fatta sulla estensione della patina superficiale e sulla quantità del deposito in fondo alla provetta.

Queste ricerche sono una ripetizione delle precedenti riguardanti la crescita su terreno solido di BK trattati coi filtrati, ove al terreno solido viene sostituito il terreno liquido secondo SYSER.

Uno sguardo alle tavole riportate ci permette di fare alcune osservazioni.

Nella lettura dopo 2 mesi per nessuno dei filtrati presi in esame è evidente una azione netta di inibizione sulla crescita del BK, come si era manifestata nelle precedenti ricerche; solo il filtrato del P 229 non diluito riesce dopo 96 ore a sopprimere completamente la crescita del ceppo tubercolare in esame.

Per gli altri funghi e per le altre diluizioni dei filtrati si verifica solo una attenuazione irregolare della crescita dopo tempi superiori alle 72 ore.

E invece ben manifesto per tutti tre i ceppi un ritardo nell'epoca di comparsa dei primi segni di crescita dei BK, che pare in netta relazione con la durata di azione dei filtrati sui BK e con le concentrazioni dei filtrati stessi. Nella prima lettura, effettuata 15 giorni dopo l'insementamento dei terreni di cultura, non è ancora visibile alcuna crescita di quei BK trattati per 76 ore coi filtrati del P 229 e P 230 fino quasi alla diluizione del 5 %. Dai confronti con i controlli si vede una notevole differenza di crescita anche per i BK tenuti solo 24 ore a contatto coi filtrati.

Nella seconda lettura, fatta dopo 30 giorni dalla semina, la differenza di crescita fra BK dei controlli e BK dei filtrati è meno manifesta, a tale epoca, anche nei trapianti fatti da sospensioni tenute a contatto un maggior numero di ore, comincia a manifestarsi una discreta crescita dei BK, che si fa ancora più rigogliosa alla terza lettura eseguita dopo 2 mesi come già detto.

Riassumendo possiamo dire che è mancata in questa esperienza quella netta azione antibatterica da parte dei filtrati che si era resa bene evidente nelle precedenti ricerche. Un'azione si manifesta invece come ritardo nell'epoca di comparsa dei primi segni di sviluppo dei BK trattati.

Questi dati contrastano quindi, in parte almeno, con tutti quelli finora concordati delle precedenti ricerche. Non è semplice una spiegazione dei fatti. Certo deve avere importanza la maggior carica di bacilli nei singoli terreni di cultura e forse anche la diversa sensibilità dei terreni usati in queste ultime esperienze.

Ma non va dimenticato il fatto che in tutte queste ricerche, condotte a distanza di tempo, non sono stati usati evidentemente gli stessi filtrati, ma filtrati diversi, preparati di volta in volta; non è fuori luogo ammettere una diversità di azione anti-BK in relazione al diverso grado di sviluppo dei miceti stessi al momento dell'utilizzazione dei terreni per l'allestimento dei filtrati: diversità di sviluppo possibili anche con procedimenti di tecnica identici nei diversi casi, per ragioni non valutabili ma facilmente ammissibili.

A questo proposito vanno ricordate le ricerche di WELSCH, il quale, studiando la proprietà batteriolitica delle streptotrix, afferma che questa si manifesta nella sua massima intensità al momento della sporulazione del fungo, quasi che il potere litico fosse legato alla sporulazione stessa. Il WELSCH spiega così la diversità dei risultati ottenuti dai vari ricercatori.

Noi da parte nostra abbiamo in programma ricerche per individuare il grado di attività batteriostatica di questi funghi in relazione all'età degli stessi alla loro sporulazione e al pH del terreno di cultura.

Comunque in base a questi dati viene infirmata la certezza di un'azione battericida globale di certi filtrati di funghi come le precedenti ricerche potevano lasciar supporre, restando invece confermata una notevole azione di ostacolo dei filtrati verso i BK.

CRESITA DEL BK UMANO H 522
SU TERRENO DI CULTURA LIQUIDO ALLA SYSER DOPO PERMANENZA PER TEMPI VARI IN SOSPENSIONE DI FILTRATI.

I) LETTURA DOPO 15 GIORNI DALLA SEMINA

FILTRATI	Dopo 1 h di contatto	Dopo 24 h di contatto	Dopo 72 h di contatto	Dopo 96 h di contatto
R I 100 %	+++	++	+	⊖
R I 50 %	+++	+	⊖	⊖
R I 5 %	+++	++	+	+
P 229 100 %	+++	+	⊖	⊖
P 229 50 %	+++	++	⊖	⊖
P 229 5 %	+++	+++	+	⊖
P 237 100 %	+++	++	⊖	⊖
P 237 50 %	+++	+	⊖	⊖
P 237 5 %	+++	+++	+	⊖
Controlli:				
Hausen 100 %	+++	+++	+++	+++
Hausen + Sol. fis. 50 %	+++	+++	+++	+++
" " 5 %	+++	+++	+++	+++

2) LETTURA DOPO 30 GIORNI DALLA SEMINA

FILTRATI	Dopo 4 h di contatto	Dopo 24 h di contatto	Dopo 72 h di contatto	Dopo 96 h di contatto
R 1 100 %	+++++	+++	+++	+
R 1 50 %	+++++	+++	+++	+++
R 1 5 %	+++++	+++	+++	+++
P 229 100 %	⊖	+++	⊖	⊖
P 229 50 %	+++	+++	+++	+++
P 229 5 %	+++	+++	+++	+++
P 237 100 %	+++	+++	+++	+++
P 237 50 %	+++	+++	⊖	+++
P 237 5 %	+++	+++	+++	+++
Controlli :				
Hausen 100 %	+++++	+++	+++	+++
Hausen + Sol. fis. 50 %	+++++	+++	+++	+++
» 5 %	+++++	+++	+++	+++

3) LETTURA DOPO 60 GIORNI DALLA SEMINA

FILTRATI	Dopo 4 h di contatto	Dopo 24 h di contatto	Dopo 72 h di contatto	Dopo 96 h di contatto
R I 100 %	++++	++++	++	++++
R I 50 %	++++	++++	++	++++
R I 5 %	++++	++++	++++	++++
P 229 100 %	++++	++++	+	⊖ ⊖ ⊖
P 229 50 %	++++	++++	++	++++
P 229 5 %	++	++++	++++	++++
P 237 100 %	++++	++++	++	++
P 237 50 %	++++	++++	⊖	++++
P 237 5 %	++++	++++	++	++++
Controlli :				
Hausen 100 %	++++	prevette inquinate	++++	++++
Hausen + Sol. fis. 50 %	++++	++++	++++	++++
" " 5 %	++++	++++	++++	++++

IV. — *Inoculazione in cavie con bacilli di Koch trattati coi filtrati.*

Per le inoculazioni in cavie mi sono servito degli stessi filtrati già preparati per le esperienze prima e seconda dai ceppi di R 1, P 229, P 237.

Ho seguito il concetto, analogamente adottato per alcune prove culturali, di inoculare in cavie bacilli trattati coi filtrati per tempi determinati. Trascrivo brevemente la tecnica.

I filtrati sono stati usati puri e alla diluizione del 5 % in soluzione fisiologica. Ho trascurato le diluizioni medie per l'eccessivo materiale occorrente

INOCULAZIONI IN CAVIE.

FILTRATI	Cavie infettate con BK, trattate con filtrati							
	per 4 h		per 24 h		per 72 h		per 96 h	
CEPPO UMANO H 522								
P 237 100 % .	++	+	⊖	+	⊖	⊖	⊖	=
P 237 5 % .	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
R 1 100 % .	++	+	⊖	⊖	⊖	=	⊖	⊖
R 1 55 % .	+++	=	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖
P 229 100 % .	++++	=	⊖	⊖	⊖	=	⊖	⊖
P 229 5 % .	++++	+++	+++	+++	++++	+++	++++	++++
CEPPO BOVINO B 12								
P 237 100 % .	=	+++	⊖	=	⊖	⊖	⊖	⊖
P 237 5 % .	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	= +++
R 1 100 % .	++	=	+++	+++	+++	+++	⊖	⊖
R 1 5 % .	+++	++++	++++	++++	+++	=	⊖	+++
P 229 100 % .	++	++	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
P 229 5 % .	++	++	⊖	⊖	⊖	=	⊖	⊖
CONTROLLI								
H 522 + Sol. fis.	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	++++
H 522 »	+++	++++	+++	++	=	=	++++	++++
B 12 + Sol. fis.	+++	=	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B 12 »	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

+ — = Fibrosi ghiandole locali.

+ = Tubercolosi a tipo fibroso delle ghiandole linfatiche ileo-lombari e successive.

++ = Caseosi progrediente linfoglandole.

+++ = » linfoglandole e noduli alla milza.

++++ = » » con tbc generalizzata.

= = Cavie morte per malattie intercorrenti.

e perchè ritenute superflue allo scopo delle ricerche. Sono stati presi in esame il ceppo umano H 522 e il ceppo bovino B 12.

In ogni filtrato e rispettiva diluizione viene fatta una sospensione dei germi in esame al tasso di un decimo di mmgr. per cc. Il materiale così preparato viene messo in termostato. Al momento delle iniezioni in cavia le emulsioni vengono diluite ad 1/1000 mmgr. per cc. Le inoculazioni in cavia vengono fatte per ogni ceppo e dopo 4, 24, 72, 96 ore alla dose di 1 cc. della diluizione di 1/1000 per ogni cavia, iniettando due cavie sottocute all'inguine per ogni filtrato. Vengono eseguiti controlli con eguali emulsioni bacillari in HANSEN puro e HANSEN al 5 % con soluzione fisiologica trattate con le stesse modalità. Le cavie vengono sacrificate ed esaminate due mesi dopo l'inoculazione.

Da uno sguardo d'assieme alle tavole riportate si rileva come le prove su cavia in linea generale confermano i risultati delle prove colturali. La differenza di positività tra controlli ed esperienze è ben palese e documentativa: *ad una positività globale dei controlli fa contrasto un'alta percentuale di reperti negativi nelle cavie inoculate con bacilli trattati coi filtrati.*

A convalida di questa affermazione giova subito ricordare come per ogni inoculazione su cavia riconosciuta negativa in base al comune reperto autoptico, venne sistematicamente praticata prova culturale ed esame istologico della milza dell'animale sospetto. Solo in base alla negatività di questi due elementi venne confermata la diagnosi autoptica.

Prendiamo ora in esame i singoli risultati comparandoli ai rispettivi delle prove colturali su terreno PETRAGNANI di questo e del precedente lavoro.

Il filtrato del ceppo R 1 anche con le prove su cavia dimostra un'azione antibatterica notevolmente più intensa sul ceppo umano che sul bovino. E questo uno dei dati più costanti e caratteristici in tutta la serie delle esperienze finora eseguite.

Le cavie infettate con 1/1000 di mmgr. del ceppo H 522 trattato per 24 ore col filtrato di R 1 non presentano dopo tre mesi nessuna lesione di tipo specifico, il ceppo B 12 al contrario ancora dopo 76 ore di contatto col filtrato dà nelle cavie tipiche lesioni specifiche. Tra le prove biologiche e le prove colturali relative al filtrato R 1 esiste un parallelismo quasi perfetto con una leggera prevalenza di sensibilità per le prove in cavia.

Il filtrato del P 237, che nelle prove colturali si era rilevato il più attivo dei funghi in esame come potere battericida, mantiene questa sua caratteristica anche nelle prove su cavia. Dopo 4 ore di contatto col filtrato del P 237 non diluito, il BK umano H 522 alla dose di 1/1000 di mmgr. non produce nessuna lesione specifica nella cavia. Questo dato non concorda con le prove colturali dove dopo eguale trattamento il BK umano conserva ancora facoltà di crescita. Trattato col filtrato diluito al 5 % il bacillo umano dopo 24 ore ha ancora scarsa proprietà patogena per la cavia, ma è completamente inattivo dopo 72 ore di contatto. Qui i dati concordano pienamente con le prove colturali. Il ceppo-bovino B 12 è più resistente all'azione del filtrato P 237, dopo 4 ore di contatto col filtrato non diluito la sua patogenicità per la cavia appare inalterata. Trattato col filtrato diluito al 5 % il ceppo bovino conserva inalterato il suo potere patogeno anche dopo 96 ore di contatto. Questi risultati concordano, come i precedenti, con le prove colturali su terreno solido.

Sul ceppo umano il P 229 manifesta la stessa azione tanto nelle prove colturali che nelle prove su cavia. Il ceppo bovino invece ha un comportamento un po' irregolare; mentre trattato col filtrato puro il B 12 perde la facoltà di crescita e di patogenicità dopo 24 ore di contatto, col filtrato diluito al 5 % il B 12 cresce ancora benchè irregolarmente sul terreno di PETRAGNANI fino a 96 ore di contatto, ma perde il potere patogeno nella cavia già dopo 24 ore di contatto col filtrato.



Nei controlli si ha sempre infezione della cavia con quadro di tubercolosi generalizzata sperimentale. Al contrario il quadro anatomo-patologico delle cavie risultate positive con l'inoculazione di BK trattati coi filtrati, presenta una graduazione di intensità e di forme molto vasta; di fronte a quadri di tubercolosi caseosa progrediente delle stazioni linfatiche o generalizzata a tutti gli organi, più spesso si riscontrano casi di infezione attenuata con manifestazioni limitate alle prime stazioni linfatiche a tipo fibroso o fibrocaseoso, con stato generale non compromesso. Questa scarsità nell'entità e nella estensione delle lesioni sperimentali è particolarmente evidente per il ceppo umano nelle prove su cavia relative al filtrato P 237 ed R 1, per il ceppo bovino in quelle relative al filtrato P 229.

In quelle cavie ritenute negative in base all'esame autoptico comune e all'esame culturale ed istologico della milza, l'esame macroscopico dei vari organi non denuncia alterazioni evidenti. La milza talora di volume normale più spesso leggermente ingrossata si presenta con superficie finemente granulosa, al taglio ha lo stesso aspetto di lievi granulosità biancastre. L'esame istologico non dimostra lesioni tubercolari. L'organo presenta una notevole reazione dei follicoli che appaiono ingranditi in chiaro stato di iperplasia. A carico della trama connettivale si nota risentimento a tipo proliferativo iperplastico, con leggeri fatti produttivi delle guaine perivascolari. È visibile un modico grado di congestione del viscere.

Questo reperto costante per tutti gli esami praticati pur escludendo localizzazioni tubercolari nella milza depone per la presenza in essa di lesioni a tipo tossico irritativo. Non è forse da escludere che questo stato di lieve risentimento splenico sia da ricondurre all'azione di tossine tubercoliniche dei germi iniettati, o uccisi dall'azione del filtrato o attenuati nella loro virulenza così da non essere più in grado da riprodurre il quadro caratteristico sperimentale della malattia. Di fronte a questa asserzione non va però dimenticata la possibilità che le suddette alterazioni spleniche siano anche attribuibili all'azione dei filtrati stessi iniettati in cavie insieme all'emulsione bacillare. Comunque l'ipotesi di una attenuazione di virulenza può forse trovare conferma in quei casi con persistenza di una prova negativa su cavia, di fronte a corrispondente prova culturale positiva.

Non è da escludersi che in questi casi l'azione dei filtrati, pur senza arrivare ad una totale uccisione dei BK trattati, determini in essi alterazioni tali per cui i bacilli pur conservando facoltà riproduttiva, non siano più in grado di produrre, iniettati nella cavia il quadro di una tubercolosi sperimentale. Questa constatazione è in contrasto con le affermazioni di VAUDREMER per il quale l'azione dei filtrati di aspergillus sul BK si esplicherebbe in modo da agevolare la produzione della fase filtrante del virus tubercolare non coltivabile ma capace di produrre nelle cavie le note alterazioni tipo YERSIN. Qui si osserva il fenomeno opposto della crescita del BK coi caratteri culturali normali ma con diminuita azione patogena.

V. — Azione del calore sul principio batteriostatico dei filtrati.

Ammesso in certi filtrati di funghi la presenza di un principio antibatterico sul BK, ho creduto opportuno studiare il comportamento di questa proprietà di fronte all'azione del calore.

A tal uopo ho messo ad inattivare in provettoni sterili, campioni dei filtrati puri di R 1, P 229, P 237 a temperatura di 56°, 70°, 90°, 100° lasciandoli alle suddette temperature rispettivamente per 10', 20', 30', 40', 50', 60'. In ogni campione di filtrato così trattato venne fatta una sospensione di BK ceppo

H 522 al tasso di un decimo di milligrammo per ogni cc. di filtrato. Le varie emulsioni vennero lasciate 76 ore in termostato, dopo di che vennero con la solita tecnica insemenate su terreno di PETRAGNANI.

Si sono eseguiti controlli facendo analoghe emulsioni in soluzione fisiologica ed in anse e insemnando come sopra terreni di PETRAGNANI dopo 72 ore.

È stato adottato l'accorgimento di fare emulsioni di BK in filtrati puri e di prolungare l'azione del filtrato su BK per 72 ore per metterci in quelle stesse condizioni sperimentali dimostratesi già nettamente sufficienti alla uccisione del BK.

La lettura di provettoni fatta ogni 15 giorni per 3 mesi ci ha rilevato la completa assenza di crescita dei bacilli tubercolari in tutti i provettoni che erano stati insemnati coi BK trattati con i filtrati inattivati al calore. Le prove di controllo sono invece state tutte positive.

Da questi dati è quindi evidente che il principio antibatterico dei filtrati in esame sul BK non risente l'azione del calore conservando intatta la sua attività anche sottoposto ad una temperatura di 100° per un'ora.

CONCLUSIONI.

In una nota precedente, studiando l'influenza di un gruppo numeroso di filtrati di funghi appartenenti alle famiglie delle Micorotule e degli Aspergilli sul bacillo tubercolare, avevo notato come di fronte a miceti che non esercitano nessuna ben manifesta azione sulla biologia del BK, tanto umano che bovino, ve ne sono altri i cui filtrati agiscono sul bacillo della tubercolosi producendo una attenuazione o una abolizione della sua proprietà di crescita.

Questo principio antibatterico era particolarmente manifesto nei filtrati di tre miceti della famiglia degli aspergilli il P 229, P 230 e P 237 e in uno della famiglia delle monilie, l'R 1.

In questo lavoro ho ripreso in esame appunto questi filtrati che nelle prove precedenti si erano dimostrati più attivi sul bacillo della tubercolosi, sia ripetendo in parte le esperienze precedenti, sia controllandone i risultati ottenuti con nuove ricerche condotte con tecniche diverse e su terreni vari. Ho inoltre eseguito inoculazioni su cavia con bacilli trattati con filtrati a varie diluizioni per tempi determinati. Mi sono pure preoccupato di studiare la termoresistenza del principio antibatterico presente nei filtrati in esame.

Dal complesso dei dati ricavati da questo gruppo di ricerche posso dedurre in breve queste conclusioni:

1° A convalida di risultati di precedenti ricerche pare confermata la esistenza nel filtrato di alcuni miceti e precisamente nel R 1, P 229, P 230, P 237 di un principio dannoso alla vita del bacillo tubercolare umano (ceppo H 522) e bovino (B 12).

2° Questo principio ostacolante lo sviluppo del BK non è uguale per i filtrati di tutti i miceti in esame ma varia di intensità da filtrato a filtrato, cosicché nelle diverse prove l'intensità dell'azione batteriostatica è pressoché costante per i diversi funghi e mantiene le sue caratteristiche differenziali tanto sul bacillo umano che nel bovino.

3° L'intensità dell'azione anti-BK appare proporzionale al tempo di contatto dei BK con filtrati e alla concentrazione dei filtrati stessi. Per alcuni filtrati e in alcune prove l'azione ostacolante può arrivare sino ad una completa abolizione di ogni facoltà di crescita dei BK.

4° In una prova (esp. 3^a) questa azione si manifesta solo come fenomeno di lieve ostacolo che provoca un ritardo nell'epoca di comparsa dello sviluppo dei BK.

5° Le prove su cavia eseguite con BK trattati per tempi vari con filtrati a varie diluizioni confermano le prove colturali e i diversi risultati sono quasi sempre concordanti con i corrispondenti delle prove colturali stesse, così da essere evidente un parallelismo fra risultati delle inoculazioni in cavia e risultati delle prove colturali. Talora sembra però che l'azione antibatterica dei filtrati in esame si manifesti con maggior evidenza al vaglio delle prove su cavia.

6° Quando i BK trattati coi filtrati (contatto per tempi brevi, diluizioni forti dei filtrati) arrivano a produrre l'infezione sperimentale delle cavie il quadro anatomo-patologico di queste si presenta raramente con l'estensione e l'intensità di lesione dei corrispondenti controlli; spesso trattasi solo di manifestazioni ghiandolari a tipo fibroso o fibro-caseoso senza localizzazioni ad altri organi.

7° Nelle cavie risultate negative all'esame autoptico comune e alla prova colturale della milza, l'esame istologico della milza stessa mette in evidenza alterazioni dell'organo a tipo iperplastico forse da attribuire all'azione di tossine tubercolari dei germi iniettati.

8° La sostanza ad attività antibatterica presente nei filtrati dei funghi R 1, P 229, P 237 non viene distrutta nel suo potere batteriostatico per il bacillo di Koch con trattamento per un'ora a 100°.

9° Non pare che i BK trattati con vari filtrati anche per tempi massimi di 96 ore, presentino alterazioni evidenti della caratteristica di alcool-acido-resistenza.

RIASSUNTO

L'A. conferma con prove colturali varie e con inoculazioni su cavie l'esistenza nei filtrati di alcuni miceti appartenenti alla famiglia delle micorotule e degli aspergilli, di un principio antibatterico sul bacillo tubercolare umano e bovino, già osservata in precedente nota.

RÉSUMÉ

L'A. confirme avec des essais de culture varies et avec inoculation sur cobayes l'existence dans les filtrés de quelques mycets appartenant a la famille des micorotules et des aspergilles, d'un principe antibacterique sur le bacille tuberculeux humain et bovin, déjà observé dans une note précédente.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. bestätigt mittels Kulturproben und Iniektionen in Meerschweinchen das Vorhandensein einiger, der Familie der Mikrotorien und Aspergillen angehörigen, Myceten die einen, bereits in einer vorherigen Note beobachteten, antibakterischen Erreger auf den menschlichen und den bovinen Tuberkelbazillus enthalten.

SUMMARY

By means of various cultures and the inoculation of guinea-pigs, the author has confirmed the existence in the filtrates of several fungi of the mycotorula and aspergillus species with an antibacterial effect upon human and bovine tubercle bacilli, as already observed in a precedent note.

RESUMEN

El autor confirma, con procebas culturale varias y con inoculaciones sobre cavia, la existencia en los filtrados de alguno micetos perteneciente a la familia de las micorotulas y de los apergillus, de un principio antibacterico sobre el bacilo tuberculoso humano y bovino, como ya habia todo observado en una nota precedente.

BIBLIOGRAFIA

- BARGOLOWSKI. — « Helvet. Med. Acta », 4, 1937, p. 72.
 BESTA. — « Beitz. Klin. Tbk. », 841, 1933, p. 140.
 BESTA e KUHN. — « Hyc. », 116, 1934, p. 120.
 BORSOTTI. — « La med. contemporanea », 1936, II, 664.
 BUONOMINI G. — « Atti R. Acc. Fisioc. », Siena, 1933, XI, I, 4, 375.
 CANNETT. — « C.R. Soc. Biol. », Paris, 95, 1926, p. 878.
 KEDROUSKY. — « ZBL. Tbk. », 45, 453.
 LINTCHEVSKAIA. — « Probl. Tub. », 1938, 21, 7-8.
 MAHER. — « Amer. Rev. tbc. », 29, 1934.
 MANCA. — « Ref. Bdl. Tbk. Forsch. », 27, 1927, p. 509.
 MADEL, GYRJEWA e PIROGOWA. — « Beitr. Klin. Tbk. », 83, 1933, p. 29.
 MOHT. — « Archiv. Hys », III, 1934, p. 197.
 PETRAGNANI. — « Atti 4° Congresso Naz. Mircobiol. », Milano, 1932.
 PROCA. — « C. R. Soc. Biol. », Paris, 112, 1933, p. 79.
 PUNTONI e SABATUCCI. — « Annali d'Igiene », Fasc. 7, 1930.
 ID. — « Annali d'Igiene », Anno XLIII (1933).
 ID. — « C. R. Soc. Biol. », Paris, 1904, p. 165.
 PUNTONI e PAVIA. — « Annali d'Igiene », Anno XLIII, 1933.
 ID. — « Boll. Sez. It. Internaz. Microbiol. », Fasc. 3, 1933.
 ID. — « Boll. Sez. It. Internaz. Microbiol. », Fasc. 5, 1934.
 PETRAGNANI C. — « Boll. Sez. It. Microbiol. », 264, ottobre 1931.
 PETRAGNANI e MAZZETTI. — « Atti IV Congr. Naz. Micr. », Milano, 1932.
 REDAELLI P. — I miceti come associazione microbica sulla tbc. pulm. cavitaria. Ed. Pavia, 1925.
 ROSENFELD. — « Zbl. Tbk. », 50, 430, 1939.
 VANNI S. — « Boll. R. Acc. Fisioc. », Siena, 1933, Serie XI, Vol. I, n. 4, 1937.
 ID. — « Boll. Internaz. Microbiol. », Milano, novembre 1933.
 WANFREMER. — « La Presse Med. », 1938, n. 61, p. 177.
 WELSCH. — « C. R. Soc. Biol. », 1936, 123, 1013.
 WELSCH. — « C. R. Soc. Biol. », 1929, 130, 800.
 ID. — « C. R. Soc. Biol. », 1937, 124, 1240.
 ZORZOLI G. — « Ann. Ist. C. Forlanini », 1940, n. 2-3, p. 208.

58802







