

Man B7h / 66.

CLINICA DELLE MALATTIE TROPICALI E SUBTROPICALI DELLA R. UNIVERSITÀ DI NAPOLI
Direttore: Prof. IGINO JACONO

LUIGI BIAVA

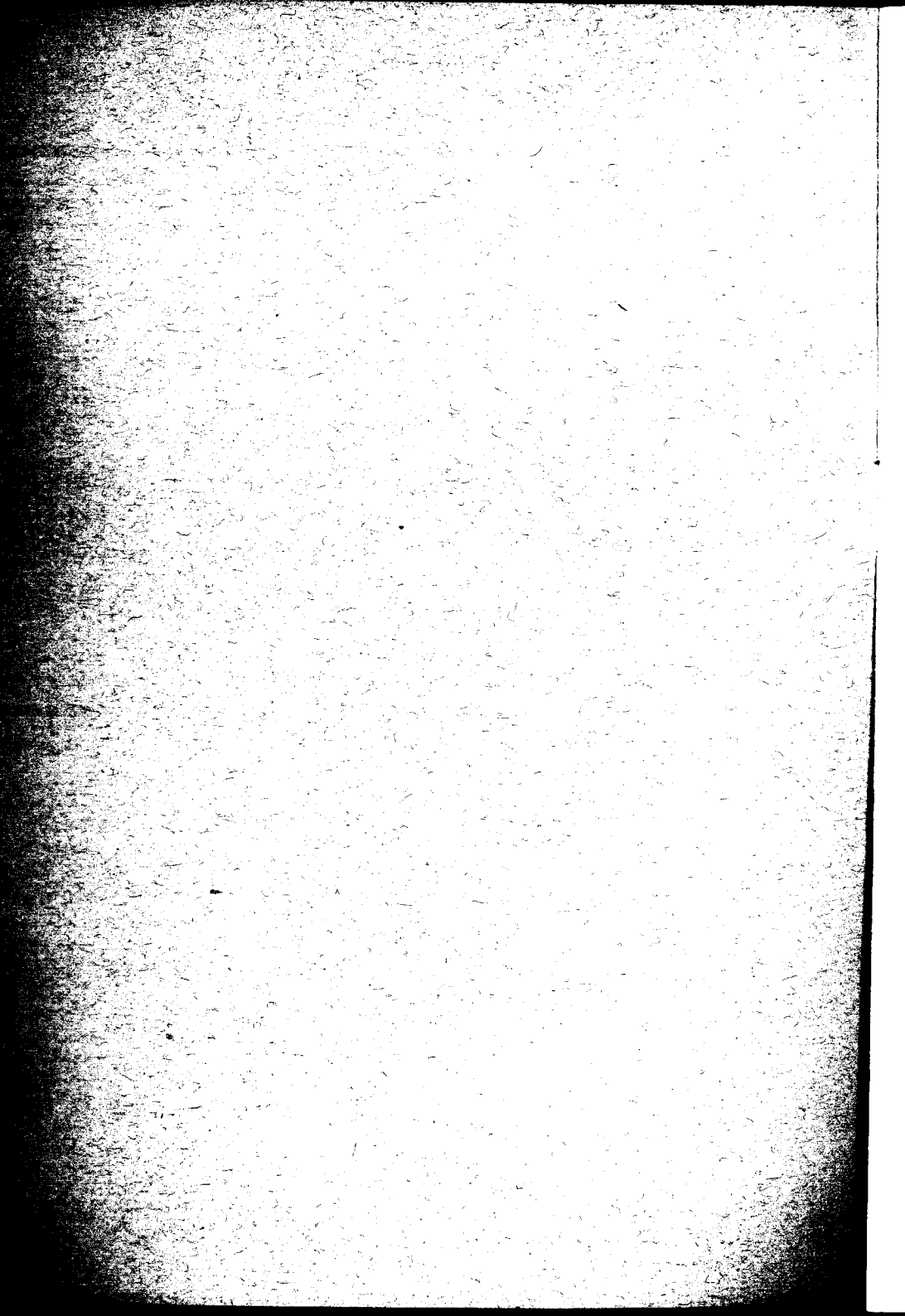
La coltivabilità della leishmania tropica
nel latte di capra

Estratto dall'« Archivio Italiano di Scienze Mediche Coloniali e di Parasitol. »
Vol. XXII (VII della Nuova Serie) - 1941-XIX



« EDIZIONI UNIVERSITARIE »

VIA V. VENETO N. 34-B - ROMA



La coltivabilità della leishmania tropica nel latte di capra

LUIGI BIAVA – Assistente ordinario

Il parassita di LEISHMAN è considerato tra gli emoparassiti quello più facilmente coltivabile in vitro. In realtà però non è sempre costante il suo attecchimento ed il suo sviluppo nei vari terreni, compresi il NOVY-MAC NEAL-NICOLLE, che è considerato il terreno d'elezione per le leishmanie. A questa conclusione giunge anche il BERREBI in un esauriente lavoro, dopo aver passato in rassegna numerosi terreni di coltura e le loro modifiche più o meno utili; nè in verità vi sono apprezzabili discordanze su tale argomento tra gli studiosi. D'altra parte ricerche piuttosto recenti hanno fatto riconoscere nel latte di capra un favorevole terreno per la coltura delle leishmanie. Per primo l'ANDERSON nel 1932 coltivava il parassita della leishmaniosi nel latte di capra con risultato lusinghiero: l'idea di tale terreno era sorta dal sospetto che esistessero dei rapporti tra la leishmaniosi viscerale e l'ingestione di latte di capra crudo. Successivamente da noi il BIANCHI ed il LAURINSICH coltivavano ceppi di leishmania viscerale e di leishmania canina in terreni al latte di capra, affermandone l'utile impiego non solo perchè ottenevano uno sviluppo rigoglioso del parassita ma anche perchè tali terreni presentavano una maggiore resistenza all'essiccamento.

Noi abbiamo voluto sperimentare tale mezzo di coltura nei riguardi della leishmania tropica. Avevamo infatti a nostra disposizione un ceppo isolato di recente da un tipico caso di bottone di Oriente, da cui era affetto un soldato reduce dell'A. O. I. ricoverato nella nostra Clinica. L'isolamento fu fatto su terreno N N N, facendoci ottenere il parassita in coltura pura.

La tecnica da noi eseguita per la preparazione dei terreni al latte non fu sostanzialmente diversa da quella di altri

autori. Il latte di capra del commercio veniva centrifugato a tremila giri al minuto per mezz'ora; quindi separato lo strato di grasso che si raccoglie alla superficie lo si distribuiva in quantità di circa 10 cc. per provetta. Tutte le provette contenenti il latte erano sottoposte ad una sterilizzazione di 70° per mezz'ora e per tre volte di seguito. Dopo tale operazione si preparavano i terreni veri e propri, che consistevano in:

1° Latte di capra lasciato al suo Ph naturale o lievemente alcalinizzato per l'addizione di alcune gocce di carbonato di sodio al 5 %.

2° Latte di capra cui era addizionato 1 cc. di sangue di coniglio defibrinato.

3° Un peptoagar lievemente alcalino cui si aggiungevano 4 cc. di latte di capra per ogni provetta, facendo poi solidificare a becco di clarino.

Questi terreni assumevano un bel colorito bianco e solidificandosi davano luogo alla formazione di circa 1-1 ½ cc. di acqua di condensazione.

4° Terreni N N N classici cui dopo la prova di sterilità si aggiungevano 3 cc. di latte di capra sterilizzato all'acqua di condensazione.

La semina nei nostri terreni al latte si praticava facendo cadere una o due gocce dell'acqua di condensazione dalla coltura in terreno N N N originaria. I tubi così seminati, erano tenuti alla temperatura di 22°-25°, giudicata l'optimum per il parassita. Praticavamo quindi i passaggi tra il 10° ed il 12° giorno, quando cioè la coltura aveva raggiunto uno sviluppo rigoglioso, come avevamo potuto osservare dall'esame giornaliero di ciascun tubo. Nell'accluso prospetto esponiamo sinteticamente i risultati delle nostre ricerche, riportandoli dal diario di esperienza. Commentiamo per altro subito il comportamento del parassita in ciascun mezzo di coltura.

Le colture in latte solo hanno mostrato uno sviluppo alquanto scarso nei primi giorni dalla semina, divenendo apprezzabile solo verso il 10° giorno. Nei passaggi successivi il numero delle leishmanie sviluppatosi era soddisfacente, ma non è stato mai rigoglioso. Nessuna differenza culturale abbiamo rilevato nei terreni al latte alcalinizzato rispetto alle colture in latte a Ph naturale.

Le colture in latte con aggiunta di un cc. di sangue di coniglio hanno anche mostrato uno sviluppo iniziale piuttosto lento, però nei successivi passaggi si è potuto osservare un aumento notevole del numero di leishmanie.

Le colture in peptegar lievemente alcalino, cui si mescolava del latte di capra, si sono rivelate insufficienti per conservazione del nostro ceppo: infatti dopo uno stentato attecchimento iniziale al 3° passaggio la coltura non si sviluppava più.

Le colture in terreno N N N con aggiunta di latte all'acqua di condensazione si sono mostrate fortemente positive fin dalla prima semina, essendo sempre rigogliose nei passaggi successivi. Nei preparati a goccia pendente di tali colture potevamo sempre osservare una abbondante massa di parassiti, talora raccolti in gruppi intrecciati variamente dai loro flagelli. Le forme isolate erano animate da vivaci movimenti ondulanti e soprattutto traslatori, per cui si potevano a stento seguire mentre attraversavano velocemente il campo microscopico. Quasi tutte le forme provviste di un lungo flagello, sempre bene evidente; i parassiti erano di grandezza varia, facendo osservare talvolta forme a notevole sviluppo. Molto frequenti, specie verso il 10°-15° giorno della coltura si osservavano le forme in via di scissione. Del resto tanto negli esami a fresco come negli strisci colorati con MAY GRUNVALD GIEMSA, non abbiamo mai notato alcuna apprezzabile differenza morfologica tra le forme flagellate cresciute sui terreni al latte rispetto a quelle sviluppatesi sul terreno N N N. Dobbiamo in oltre dire che i tubi di N N N più latte, concordemente alle osservazioni di altri, hanno presentato una notevole resistenza all'invecchiamento. Il parassita si conserva vitale nella coltura, tenuta in adatte e necessarie condizioni, per più mesi. Noi abbiamo trovato leishmanie vive in tubi vecchi di oltre 110 giorni e da queste colture abbiamo anche ottenuto trapianti positivi. Nei preparati colorati delle colture più vecchie ci è avvenuto di osservare con una certa frequenza, accanto alle forme flagellate dei piccoli corpi ovali, caratterizzati tipicamente da un citoplasma, da un nucleo e da un corpo parabasale. Il reperto nelle colture di elementi che sono morfologicamente analoghi alle leishmanie della vita parassitaria è stato del resto descritto, per quanto non frequentemente

Volendo ora analizzare brevemente i risultati da noi ottenuti con la coltura della leishmania tropica in terreni al latte, dobbiamo anzitutto premettere che in realtà il latte di capra data la sua concentrazione salina, presenta l'ambiente ottimo per la vita del parassita. Infatti da vari Autori è stato affermato che la presenza di sali nel substrato di coltura per le *L.* ne favorisce lo sviluppo; ed è stato in oltre dimostrato che l'aggiunta di zucchero, quale il glucosio o lattosio, determina un arricchimento della coltura stessa. Ora il latte di capra per il suo contenuto in sali (calcio, fosforo, potassio, magnesio...) e per la presenza di lattosio realizzerebbe un terreno ideale per il nostro parassita. In realtà però nei terreni al latte solo non abbiamo mai ottenuto uno sviluppo rigoglioso, anche se la sopravvivenza delle colture perdurava per un tempo soddisfacente. Inoltre è stata segnalata da alcuni Autori la necessità di un substrato neutro che serva di sostegno alla coltura delle *L.*, per cui la superficie dell'agar nei terreni solidi si comporterebbe come una membrana dializzante, con funzione di lasciar passare gradualmente nell'acqua di condensazione le sostanze nutritive. Nei nostri terreni al peptoagar-latte, come del resto nel terreno N N N, si era appunto in tali condizioni, ma non abbiamo avuto in realtà dei risultati favorevoli. Le colture più rigogliose e di massima vitalità le abbiamo ottenute nei terreni N N N con aggiunta di latte di capra nell'acqua di condensazione, come già si è detto; abbastanza soddisfacenti son risultati anche i terreni al latte con aggiunta di sangue. Non vogliamo in questo nostro lavoro entrare per nulla nella discussione sull'importanza dell'emoglobina nei terreni di coltura degli emoparassiti, certo è che con difficoltà abbiamo visto attecchire e sviluppare la *L. tropica* nei terreni esenti da ogni traccia di emoglobina. Riteniamo pertanto poter trarre dalle nostre ricerche le seguenti conclusioni:

1° Il latte di capra per le sue caratteristiche fisico-chimiche, rappresenta un buon mezzo di coltura per la *L. tropica*, sicuramente più adatto che non altri terreni consigliati da vari ricercatori.

2° Il latte di capra arricchito dalla aggiunta di sangue è certamente un terreno molto favorevole per lo sviluppo e la conservazione della *L. tropica* in vitro.

3° Il latte di capra aggiunto al terreno N N N classico, rappresenta il più vantaggioso tra i mezzi di coltura noti per le leishmanie. È evidente che i due mezzi si integrano reciprocamente, per cui assicurano un costante attecchimento ed uno sviluppo rigoglioso del parassita, oltre ad una maggiore resistenza della coltura al disseccamento, proprietà questa di notevole interesse.

DIARIO D'OSSERVAZIONE

Semina e trapianti successivi	latte	latte + sangue	peptonazur + latte	N N N + latte	N N N controllo
13-III ^a -39	—	—	+	—	—
23-III ^a -39	—	—	+	+++	+++
13-IV ^a -39	—	—	++	+++	+++
23-IV ^a -39	—	++	+	+++	+++
5-V ^a -39	++	+++	—	++++	+++
16-V ^a -39	+++	+++	—	++++	+++
26-V ^a -39	+++	+++	—	++++	+++
6-VI ^a -39	++	++	—	+++	+++
18-VI ^a -39	—	++	—	+++	+++
28-VI ^a -39	+++	++	—	+++	+++
7-VII ^a -39	—	—	—	+++	+++
18-VII ^a -39	—	—	—	+++	+++

AUTORIASSUNTO

L'A. ha coltivato un ceppo di leishmania tropica in terreni a latte di capra variamente modificati.

Conclude che debbesi ritenere il latte uno dei mezzi più adatti alla vita delle leishmanie, purchè siano in esso contenute almeno piccole quantità di emoglobina.

BIBLIOGRAFIA

3. ANDERSON. — Arch. Inst. Pasteur de Tunis, 1932.
6. ANDERSON. — Arch. Inst. Pasteur de Tunis, 1935.
8. BARREBI. — Arch. Inst. Pasteur de Tunis, 1936.
7. BIANCHI. — Boll. Soc. Med. Chir. — Pavia, 1935.
5. NATTAN. — Lattiez e Grimard-Richard. — Bull. Soc. Path. Exot., 1934.
4. RAY. — Ind. Il. Med. Res., 1932.
1. CHRISTOPHERS, SHORTT e BARBAUD. — Ind. Il. Med. Res., 1925.
2. CHRISTOPHERS, SHORTT e BARBAUD. — Ind. Il. Med. Res., 1926.
9. CASTELLANI e JACONO. — Manuale di clinica tropicale, 1935.
10. PUNTONI. — Manuale di Microbiologia, 1935.
11. LAURINSICH. — La Pediatria — Napoli, 1937.

343S19

1000

