

NUOVI DATI SUL VIRUS TUBERCOLARE E SULLA NATURA DELLA « ESOTUBERCOLINA SPENTA »*

(Con due tavole fuori testo)

GUIDO FINZI

(Istituto di Patologia speciale e Clinica medica della Facoltà di Medicina veterinaria
della R. Università di Milano).

SUMMARY. — Disceptat Auctor de esotuberculinis diagnosticis et de esotuberculinis extinctis vel anallergicis in peculiari therapia tuberculari.

Loquitur deinde de inquisitionibus circa esotuberculinam extinctam et virus tuberculare percolans peractis, necnon circa virtutem antigenicam in ipsa esotuberculina extincta contentam.

Agitur denique de novis inventis quoad familiam carbohydratorum, contextum proteicum et virus tuberculare percolans in esotuberculina extincta anallergica.

In una precedente comunicazione [1], riferivamo intorno a nuovi dati acquisiti sulla biologia del bacillo tubercolare coltivato a 42°, indicando attraverso quali procedimenti tecnici si era addivenuti, per la prima volta, alla preparazione di « esotubercoline » anallergiche.

Più tardi nuove comunicazioni venivano da noi fatte sulla « esotubercolina spenta » e sulla sua possibile applicazione nella terapia specifica della tubercolosi [2].

Sul potere anallergico di questa tubercolina hanno riferito A. PERAZZI [3], G. C. COLOMBO [4] ed E. VALCARENGHI [5], confermando le nostre prime considerazioni. E sulle proprietà terapeutiche della « esotubercolina spenta », in Italia, in Francia, in Svizzera e in Austria, stanno

* Nota inviata da Giuseppe Caronia S. O. e presentata dall'Accademico Pontificio P. Agostino Gemelli O. F. M.

esperimentando, in Cliniche Universitarie specializzate, il prof. A. CECCHINI e il dott. PERAZZI, il prof. DONATI e il prof. CAVALLI, il prof. CARPI e il dott. FOSSATI, il prof. A. PASINI, il prof. TACCONE e il dott. COLOMBO, il prof. PARODI e il dott. DI MATTEO, i professori P. COURMONT, F. DUMAREST, A. PELLÉ e MAURER, e i dottori DAVY, LOWYS e TOBÉ, direttori di sanatori di alta montagna in Savoia.

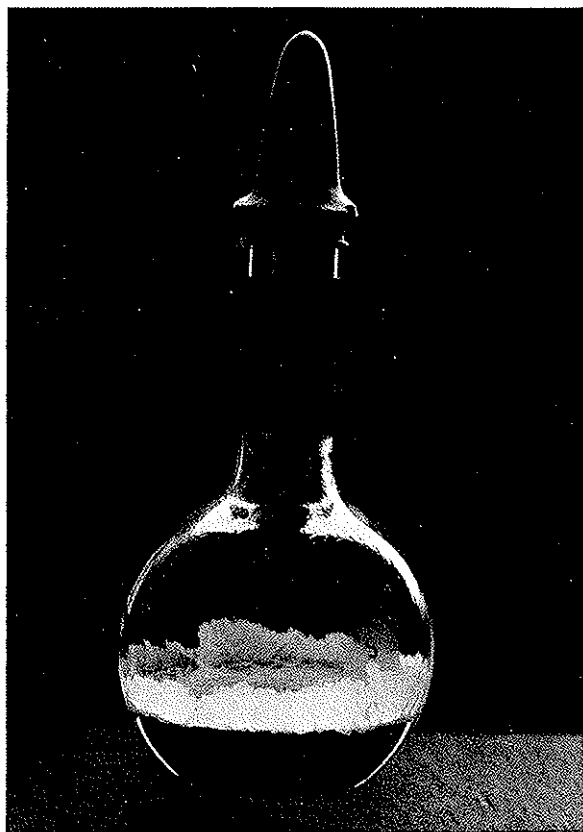
A questo riguardo sarebbe assolutamente azzardato qualsiasi parere, in quanto solo una lunga e metodica osservazione potrà in seguito acconsentire un giudizio fondato e sicuro sul valore terapeutico della « esotubercolina spenta ». Le prime pubblicazioni comparse sono tutte molto favorevoli.

Sulla sua natura noi ammettevamo che la temperatura a $41^{\circ}5-42^{\circ}$ agiva sui bacilli della tubercolosi dei mammiferi togliendo loro definitivamente la capacità di eliminare, nei mezzi di cultura, i principi solubili, diffusibili, le tossine genuine che, conservate nelle loro frazioni termolabili e termostabili, conferiscono alle « esotubercoline » un valore diagnostico superiore a qualsiasi altra tubercolina allergica, compresa quella standard internazionale indicata, dal Comitato di Igiene della Società delle Nazioni, come la più attiva.

Ciò è ormai riconosciuto in medicina umana e comparata attraverso numerosi lavori sperimentali italiani, tedeschi, francesi, spagnuoli e americani.

Secondo le indagini da noi eseguite, i bacilli tubercolari, messi a coltivare ad alta temperatura ($41^{\circ}5-42^{\circ}$), perderebbero la capacità di eliminare frazioni albuminiche atte a provocare reazioni positive alla prova sottocutanea. Di conseguenza, se nella « esotubercolina » allergica sono contenuti complessi primari che constano di albumine e di carboidrati, complessi responsabili di tutte le manifestazioni reattive riferibili alla tubercolina, nella « esotubercolina spenta » persiste solo il gruppo carboidrato (capace, come abbiamo dimostrato [6] di determinare le reazioni di flocculazione con il siero precipitante antitubercolinico di cavallo) mentre non esiste più il complesso proteico specifico che nell'« esotubercolina » diagnostica provoca le reazioni allergiche. Recentemente, in una comunicazione presentata alla Società Lombarda di Medicina [7], affermavamo:

1° che in cultura a sviluppo regolare, il massimo grado di tossicità raggiunto verso la sesta-ottava settimana non è assolutamente



c. c. 55 di « esotubercolina » S.
cm.² 16,60 di superficie.

subordinato all'ampiezza del velo ottenuto alla superficie del mezzo liquido e quindi al numero dei germi;

2° che il valore allergico dell'« esotubercolina » sembra ricondursi ad un determinato grado di concentrazione in esotossina;

3° che tale grado di concentrazione e di attività diagnostica viene raggiunto, sempre in 6-8 settimane, indipendentemente dalla quantità del mezzo liquido nel quale si effettua la cultura dei diversi bacilli tubercolari tipo Koch;

4° che l'attività allergica dell'« esotubercolina », lungi dall'essere esclusivamente subordinata al numero ed alla moltiplicazione dei bacilli atti ad eliminare veleni diffusibili, sembra essere legata anche allo sviluppo del bacillo tubercolare e alla presenza, nei mezzi di cultura, di un « virus tubercolare filtrante »;

5° che tale « virus tubercolare filtrante », lungi dal trovarsi unicamente aderente ai corpi bacillari e alla sostanza amorfa che unisce i bacilli stessi, è estremamente diffuso nel mezzo culturale già all'inizio della coltura;

6° che l'« esotubercolina » è una nuova tubercolina diagnostica, improntata ai componenti termostabili e alle frazioni termolabili dei prodotti di ricambio del bacillo di Koch e al potere allergico del « virus tubercolare filtrante » in essa contenuto.

* * *

Come è noto il bacillo di Koch, essendo un aerobio particolarmente avido di ossigeno, fu sempre ottenuto da mezzi di cultura messi in recipienti tali da permettere un largo contatto con l'aria, per quanto dimostrato che una esagerata concentrazione volumetrica dell'ossigeno nuocerebbe al suo sviluppo.

Tuttavia come germe squisitamente aerobio, nei substrati liquidi tende a svilupparsi abbondantemente alla superficie, a contatto diretto con l'ossigeno libero, con le caratteristiche culturali a tutti ben note.

Fin dalla nostra prima comunicazione [8], intesa a riferire sulla tecnica di preparazione della nostra « esotubercolina », noi si informava di avere usato « dei matracci a fondo piano, a collo relativamente largo e contenenti del brodo peptonato glicerinato fino al punto di più ampia circonferenza del matraccio ».

In altre parole consideravamo, d'accordo con tutti gli sperimentatori, che a cultura costituita da un largo, spesso, rugoso e piegheggiato velo, rigogliosamente arrampicantesi sulle pareti del matraccio, dovesse conseguentemente corrispondere, nel mezzo liquido, una più abbondante quantità di « esotubercolina » diagnostica. Con questo convincimento infatti, negli istituti dove si preparano in grande le « vecchie tubercoline », allo scopo di avere un maggior quantitativo di corpi microbici e una maggiore concentrazione in prodotti solubili, è abitudine corrente impiegare per le culture, i flaconi piatti di Roux o recipienti piatti circolari, appunto perchè più indicati a permettere un largo contatto con l'aria e a soddisfare la particolare avidità di ossigeno del bacillo di Koch.

Partendo da ceppi microbici tipo umano e tipo bovino, già coltivati a 42°, e quindi atti a dare soltanto « esotubercoline spente » anallergiche, abbiamo seminato, nelle identiche condizioni di esperimento, lo stesso mezzo di Sauton (ph. 7.2), distribuito in matracci di capacità identica fino a raggiungere, in taluni un livello oltre i due terzi del matraccio (c. c. 220), in altri un livello molto basso (c. c. 55).

Nei due matracci l'ampiezza delle superfici raggiunte dal liquido è identica: cm.² 16,60.

In altre parole ci siamo preoccupati di ottenere delle culture su superfici identiche, con quantità massime e minime di terreno nutritivo.

Dopo 8 settimane dalla semina, quando i veli della superficie del mezzo erano diventati spessi, rugosi, increspatisi, rimontanti la parete del matraccio, quando non avevamo ormai motivo di sorta per pensare ad un possibile aumento dell'attività specifica della nostra « esotubercolina spenta », abbiamo, seguendo la tecnica già indicata, estratto e preparato dai diversi matracci l'« esotubercolina » anallergica.

Ne consegue che all'ottava settimana avevamo, per ognuno dei ceppi umani e bovini, 2 campioni di « esotubercolina spenta ».

Il 1° proveniente da un velo di cm.² 16,60 su c. c. 200 di mezzo Sauton.

Il 2° proveniente da un velo di cm.² 16,60 su c. c. 55 di identico mezzo Sauton.

Naturalmente, in conformità di quanto fino a ieri sembrava acquisito noi avremmo dovuto avere, sia per il ceppo umano come per il ceppo bovino, 2 campioni di « esotubercolina spenta » a potere floc-

culante diverso, che, per quanto grossolanamente, si poteva così supporre: minima nel campione 1°; massima nel campione 2°.

La determinazione sperimentale del valore antigene intrinseco dei due campioni di «esotubercolina spenta» venne eseguita mediante l'unico mezzo a nostra disposizione, vale a dire con la reazione di flocculazione specifica [6].

Questa si esegue preparando un determinato numero di provette [6] contenenti ciascuna, e in quantità varie, la «esotubercolina spenta» (precipitogene), ferma restando la quantità di siero antitubercolinico (siero flocculante).

Infatti se in quattro serie di provette contenenti c.c. 15 di siero anti, noi introduciamo c.c. 5-4-3-2-1-0,5 di «esotubercolina spenta», campione 1° (b. umano), e ripetiamo questa serie con i diversi campioni: 1° (b. bovino); 2° (b. umano); 2° (b. bovino), e se in quattro serie di provette contenenti c.c. 20 dello stesso siero flocculante antitubercolinico, ripetiamo le stesse diluizioni, noi vediamo, dopo 4 ore alla temperatura di laboratorio e dopo 2 ore alla temperatura di 38°5, l'apparizione dei primi segni di una intensa flocculazione che poi procede intensificandosi rapidamente, per essere notevole e massima alla nona-decima e settima-ottava ora. Nelle prime quattro serie la prima provetta nella quale si svolge più intenso ed identico il fenomeno è costantemente la 5^a, nella seconda serie il fenomeno si appalesa identico o con le stesse precise caratteristiche nelle provette 5^a e 6^a.

Da quanto sopra, risulta nel modo più chiaro e convincente, che i due campioni di «esotubercolina spenta», preparati nelle condizioni indicate, hanno un valore antigene intrinseco perfettamente identico, anzi assolutamente sovrapponibile, giacchè i rapporti ottimali fra antigene precipitogeno e antisiero flocculante sono perfettamente uguali nei due campioni di «esotubercolina spenta», sia per il bacillo tipo umano che per quello tipo bovino.

Il potere antigene raggiunto dai diversi campioni di «esotubercolina spenta» non è quindi assolutamente subordinato all'ampiezza del velo ottenuto alla superficie del mezzo liquido, e conseguentemente al numero dei germi, giacchè tale valore antigene sembra legato ad un grado determinato di concentrazione di gruppi atomici capaci di legare *in vitro* le precipitine dell'antisiero flocculante. Tale concentrazione viene raggiunta indipendentemente dalla quantità del mezzo liquido

nel quale si effettua la semina e, indipendentemente dal numero dei germi.

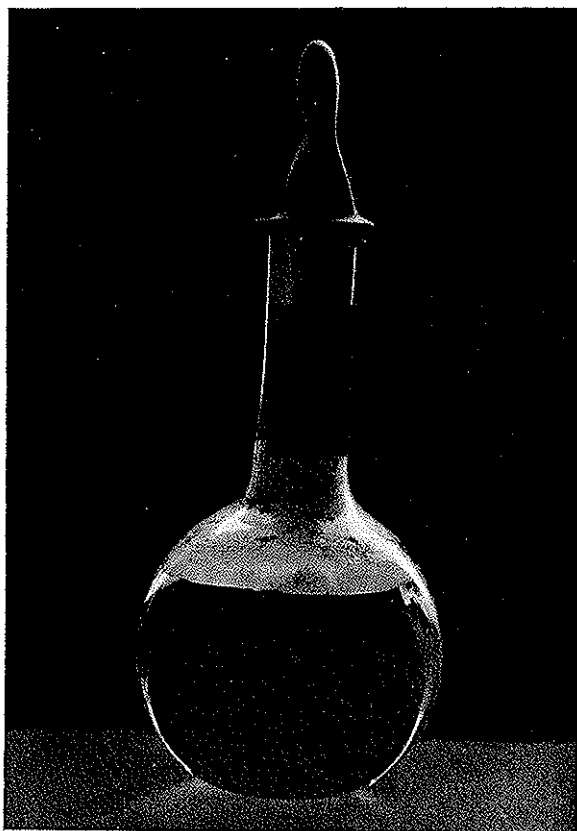
Ne consegue che il potere antigene intrinseco dell' « esotubercolina spenta », analogamente a quanto abbiamo osservato per la « esotubercolina » allergica, sembra essere legato allo sviluppo del bacillo tuberculare.

Come abbiamo fatto [7] partendo da culture in mezzo liquido, di bacilli tubercolari non esposti in precedenza all'azione del calore ($41^{\circ}5-42^{\circ}$), ci siamo proposti di stabilire se anche in questo caso si trovava diffuso nel mezzo di cultura, coltivantesi in profondità, un germe invisibile capace di attraversare le candele filtranti e nel contempo patogeno per gli animali da esperimento.

Da culture in mezzo Sauton (pH 7.2), di pochi giorni (3-6-15), allestite con ceppi umani e bovini atti a darci « esotubercoline spente », non appena si vedeva che l'esile porzione di velo seminata nella parte più periferica della superficie del mezzo di coltura, tendeva ad allargarsi sulla stessa superficie del mezzo, si aspirava una conveniente quantità (c. c. 25-50-75) di liquido mediante una comune pipetta a bolla, tenendoci ben discosti dal bordo del velo che coi soliti caratteri andava costituendosi ed allargandosi, indi si estraeva la pipetta badando non solo di non toccare, ma neppure di sfiorare i margini del velo. Anche in questo caso tale liquido, sempre perfettamente limpido e trasparente, veniva in primo tempo centrifugato per 20', poi filtrato prima due volte su carta, poi infine su candela Berkfeld N. Dimostratane la sterilità sui diversi terreni di cultura, veniva iniettato nel peritoneo di cavie sane, del peso di 300-400 grammi, alla dose di c. c. 5-10 sempre in una sola iniezione (gruppi di 10-20 cavie).

(L'esame microscopico della porzione più profonda del liquido centrifugato, naturalmente senza il benchè minimo deposito, fu sempre negativo di fronte a forme bacillari acido-resistenti e non).

Anche per queste indagini alcune delle cavie iniettate venivano sacrificate in terza-quarta giornata dalla iniezione, allo scopo di allestire strisci con materiale ottenuto da una rigorosa triturazione dell'epiploon e con materiale ottenuto raschiando con bisturi la superficie della parete peritoneale; le altre venivano seguite per 4-6-8 mesi con precauzioni speciali (alimentazione scelta ed abbondante, custodia in ampi, igienici ricoveri cambiati una o due volte per settimana).



c. c. 220 « esotubercolina » S.
cm.² 16,60 di superficie.

Dopo mesi e mesi di osservazione, si è constatato che tutte le cavié iniettate erano rimaste perfettamente indifferenti alla iniezione subita. Malgrado la più paziente ricerca, l'esame microscopico degli strisci allestiti col materiale più indicato proveniente da cavié sacrificate in periodi diversi, fu sempre negativo. Ne consegue che nelle nostre culture, ottenute con ceppi esposti all'azione del calore ($41^{\circ}5-42^{\circ}$), non coltiva in profondità nessun germe invisibile capace di attraversare le candele filtranti.

Nel 1934 [1] noi si affermava che la temperatura di $41^{\circ}5-42^{\circ}$ agiva sui bacilli tipo Koch togliendo loro definitivamente la capacità di eliminare, nei varî mezzi di cultura, principî attivi speciali, che invece conferiscono, alla « esotubercolina » allergica, un valore diagnostico superiore a quello di qualsiasi altra tubercolina. Oggi noi riteniamo poter affermare che l'azione del calore, non soltanto toglie ai bacilli tubercolari la capacità di eliminare le frazioni albuminiche, il complesso proteico responsabile di tutte le manifestazioni reattive riferibili alla « esotubercolina » allergica, ma toglie anche ad essi la capacità di ingenerare, nei mezzi culturali più appropriati, un virus tubercolare filtrabile che, nelle culture ottenute con ceppi non esposti all'azione del calore ($41^{\circ}5-42^{\circ}$), sarebbe sempre presente ed estremamente diffuso nel mezzo già all'inizio della cultura.

In questo caso, neppure seguendo la tecnica più raccomandabile (NINNI), ci fu dato dimostrare l'esistenza di tale virus tubercolare filtrante nè aderente ai corpi bacillari, nè nella sostanza amorfa che unisce e lega i bacilli stessi.

Oggi quindi ci domandiamo fino a che punto le caratteristiche anallergiche della nostra « esotubercolina spenta » sono riferibili alla mancanza del complesso proteico, e fino a che punto tali caratteristiche sono riferibili alla mancanza del virus tubercolare filtrante, dato che a questo è oggi necessario riconoscere un potere allergico.

CONCLUSIONI

1° Il potere antigene della « esotubercolina spenta » non è assolutamente in rapporto all'ampiezza del velo ottenuto alla superficie del mezzo liquido e quindi al numero dei germi, giacchè tale valore antigene sembra essere indubbiamente legato ad un determinato grado di

concentrazione di gruppi atomici capaci di legare in *vitro* le precipitine di un antisiero flocculante.

2° Il valore antigene della « esotubercolina spenta » anallergica viene raggiunto in un determinato periodo di tempo, indipendentemente dalla quantità del mezzo liquido nel quale si effettua la semina. Ne consegue che il potere antigene intrinseco dell'« esotubercolina spenta », lungi dall'essere subordinato alla moltiplicazione dei germi è, analogamente a quanto abbiamo osservato per la « esotubercolina » diagnostica, unicamente subordinato allo sviluppo del bacillo tubercolare.

3° Se nei mezzi di cultura adatti, accanto ai diversi bacilli tipo Koch, si sviluppa in profondità, sin dall'inizio, un « virus tubercolare filtrante », nei mezzi di cultura seminati con bacilli tubercolari ancora patogeni, ma esposti all'azione del calore (41°5-42°), non è possibile dimostrare l'esistenza di un « virus tubercolare filtrante ».

4° Le caratteristiche anallergiche della nostra « esotubercolina spenta », che riteniamo assolutamente meritevole di indagini nel campo della terapia specifica della infezione tubercolare, sembrano riferibili non solo alla mancanza del complesso proteico, ma benanco alla mancanza, nel mezzo di cultura, del « virus tubercolare filtrante ».

BIBLIOGRAFIA

- [1] FINZI G., *Nuovi dati sulla biologia del bacillo tubercolare e sulle «esotubercoline»*. Pontificia Accademia dei Nuovi Lincei. Seduta del 21 gennaio 1934. — «Profilassi», fasc. 4, aprile 1934.
- [2] FINZI G., *Über die Biologie des Mycobacterium tuberculosis und über «gelöschtes Tuberkulin»*. — «Wiener Tierärztlichen Monatsschrift», vol. XXI, 1934, fasc. 15.
- *Nouvelles données sur la biologie du mycobacterium tuberculosis. Les «exotuberculines éteintes»*. — «Revue de la Tuberculose», serie 4^a, tomo II, n. 5, maggio 1934.
- «*Exotuberculines» allergiques et «exotuberculines éteintes»*. — «Bollettino della Sezione Italiana della Società Internazionale di Microbiologia», fasc. VIII-IX, agosto-settembre 1935.
- [3] PERAZZI A., *Le caratteristiche anallergiche della «esotubercolina spenta»*. — «Profilassi», fasc. 7, luglio 1934.
- [4] COLOMBO G. C., *La «esotubercolina Finzi» nella diagnosi della tubercolosi infantile*. Comunicazione fatta il 6 ottobre 1935 a Brescia nella seduta della Sezione Lombarda della Associazione Italiana di Pediatria.
- [5] VALCARENghi E., *L'action anallergique de l'«exotuberculine éteinte» chez les bovins tuberculeux*. — «Bull. de l'Académie Vétérinaire de France», tomo VII, 1934, n. 7.
- [6] FINZI G., in «Académie des Sciences», 10-24 luglio 1933, tomo 197, pag. 361.
- [7] FINZI G., *Nuovi dati sulla preparazione e sulla natura delle «esotubercoline»*. Società Lombarda di Medicina. Seduta del 22 novembre 1935-xiv.