

26. Carlo CATTANEO, Moroello MORELLINI, Vittorio ORTALI, Giuseppe PENSO
- Studi e ricerche sui micobatteri. — Nota VI. — L'azione dell'acido p-aminosalicilico sui micobatteri. Differenziazione dei bacilli tubercolari dai paratubercolari.

Riassunto. — E' stato studiato il comportamento di 286 ceppi di micobatteri tubercolari e paratubercolari di varia origine e provenienza nei confronti dell'acido p-aminosalicilico. Ne è risultata una diversa sensibilità dei ceppi di natura tubercolare e paratubercolare. Per questo è stato proposto un metodo di differenziazione basato sull'uso di terreni liquidi (Dubos) contenenti quantità scalari di acido p-aminosalicilico: è risultato in linea di massima che i tubercolari umani e bovini restano bloccati da 5 μ g di P.A.S. e gli aviari da 100 e che i paratubercolari non restano bloccati nemmeno da 1000 μ g di P.A.S.

Résumé. — Nous avons étudié la manière de se comporter de 286 souches de mycobacteries tuberculeuses et paratuberculeuses de diverse origine et de diverse provenance en présence de l'acide p-aminosalicylique. Nous avons constaté une sensibilité différente des souches de nature tuberculeuse et paratuberculeuse. Aussi avons-nous proposé une méthode de différenciation basée sur l'emploi de terrains liquides (Dubos) contenant des quantités décroissantes d'acide p-aminosalicylique: nous avons constaté en général que les bacilles tuberculeux humains et bovins restent bloqués par 5 μ g de P.A.S. et les bacilles tuberculeux aviaires par 100 μ g, de P.A.S. et que les bacilles paratuberculeux ne restent pas bloqués même pas par 1000 μ g de P.A.S.

Summary. — The behavior of 286 strains of tubercular and paratubercular mycobacteria of various origin and sources towards P.A.S. has been studied. It has been found that these tubercular and paratubercular strains show a different sensitivity towards this substance. For this reason a method for differentiation of these various strains kept in liquid media (Dubos) containing various amounts of P.A.S. is proposed: it might be generally said that human and bovine strains of tubercular bacilli remain inhibited by 5 μ g of P.A.S., while the avian strains by 100 μ g, the paratubercular strains are not even inhibited by quantities of 1000 μ g.

Zusammenfassung. — Man hat Verhalten von 286 Stämmen tuberkulöser und paratuberkulöser Mykobakterien verschiedener Herkunft und Abstammung gegenüber der p-Aminosalizylsäure studiert, mit dem Ergebnis dass bei den Stämmen tuberkulöser und denjenigen paratuberkulöser Natur eine verschiedene Sensibilität festgestellt worden ist. Aus diesem Grunde hat man eine Differenzierungsmethode vorgeschlagen, die auf die Verwendung von flüssigen Nährböden (Dubos) basiert, in welchen regelmässig abnehmende Mengen von p-Aminosalizylsäure enthalten sind; dabei hat man als grundsätzlich geltend gefunden, dass die tuberkulösen Mykobakterien der Menschen und der Rinder durch 5 μ g P.A.S., diejenigen der Vögel durch 100 μ g P.A.S. blockiert werden, währenddem nicht einmal 1000 μ g P.A.S. die paratuberkulösen Bazillen blockieren können.

Il riconoscimento specifico dei vari micobatteri costituisce ancor oggi un problema batteriologico complesso in quanto, come è noto, riesce a volte difficile anche la semplice distinzione dei bacilli tubercolari veri dai bacilli cosiddetti paratubercolari.

Gli uni e gli altri, infatti, hanno in comune molte proprietà, quali l'acido-resistenza, alcune esigenze colturali, una particolare composizione chimica caratterizzata dall'abbondanza di lipidi, mentre si differenziano notevolmente per altri caratteri, come la maggiore o minore esigenza colturale, la rapidità di sviluppo, la patogenicità o meno per gli animali superiori e per l'uomo. Ma la lentezza di sviluppo (massima per i bacilli tubercolari e minima per i paratubercolari), la facilità di crescita sui comuni terreni (minima per i tubercolari e massima per i paratubercolari), la patogenicità per gli animali da esperimento (massima per i tubercolari e minima o nulla per i paratubercolari), costituiscono elementi probativi, ma non strettamente specifici, giacchè esistono ceppi di paratubercolari che crescono lentamente e ceppi di tubercolari che possono crescere in agar comune, come verrà riferito in altro lavoro. La stessa patogenicità non costituisce un carattere strettamente specifico, in quanto esistono ceppi di micobatteri tubercolari non patogeni come il «saprophytic strain» di Merrill ed il ceppo 607 «non pathogenic» dell'American Type Culture Collection, mentre vi sono ceppi di micobatteri paratubercolari, come il Battaglini, ad esempio, che si dimostrano patogeni (PENSO G., LELLI G., ORTALI V., 1949).

Noi, come è noto (PENSO G., CATTANEO C., MORELLINI M., ORTALI V., 1948), abbiamo raccolto un numero molto rilevante di micobatteri: alcuni

provengono dalle varie collezioni, altri, i più, provengono da svariato materiale di origine animale e vegetale. Per questi ultimi si è posto il problema della classificazione e quindi del loro riconoscimento come tubercolari o come paratubercolari.

A scopo orientativo, è stato saggiato il comportamento dei ceppi di collezione e dei ceppi di nuovo isolamento verso i vari antibatterici dotati di proprietà antitubercolare. Particolarmente interessante, come dato differenziale tra i bacilli tubercolari e quelli paratubercolari, si è rivelata l'azione dello acido p-aminosalicilico sui vari ceppi di micobatteri (CATTANEO C., MORELLINI M., ORTALI V., PENSO G., 1949), e sui risultati di tali esperienze riferiamo nella presente nota.

MATERIALI E METODI.

In queste ricerche è stato usato il terreno di Dubos che, permettendo la crescita in profondità dei micobatteri, dà la possibilità di uno studio nefelometrico nel liquido colturale e di conseguenza permette la stesura delle curve di crescita.

Abbiamo utilizzato il terreno di Dubos, addizionato con concentrazioni scalari di acido p-aminosalicilico. Praticamente a 4,5 cm³ di terreno di Dubos aggiungevamo 0,5 cm³ di una soluzione contenente quantità di antibiotico tali da ottenere una concentrazione finale di 1µg, 5µg, 100µg, 1000µg/cm³. Le varie diluizioni di acido p-aminosalicilico sono state ottenute partendo da una soluzione madre all'1%, preparata di volta in volta sciogliendo il prodotto nella quantità stechiometrica di bicarbonato di sodio; nel caso che si usi il p-aminosalicilato di sodio solubile, il prodotto si scioglie direttamente in acqua distillata. Tale soluzione madre viene filtrata per Seitz subito dopo la sua preparazione ed è immediatamente utilizzata per l'allestimento delle successive diluizioni in solvente sterile. Poichè le soluzioni di p-aminosalicilato di sodio sono poco stabili, è bene operare in modo che tra la preparazione della soluzione madre e la semina dei terreni non passi più di un'ora.

La semina del terreno si pratica immettendo nell'a provetta 0,1 cm³ di una coltura in Dubos del germe in esame, coltura che deve aver raggiunto il massimo del suo sviluppo.

Per ogni prova noi abbiamo insemato 5 provette, oltre 2 di controllo nelle quali al posto della soluzione dell'antibatterico si aggiungeva mezzo cm³ di acqua distillata sterile. Il tutto era poi lasciato in termostato a 37° C. fino a che i tubi di controllo non avessero raggiunto la torbidità massima.

Per la valutazione ottica dello sviluppo ottenuto sono stati usati i seguenti simboli:

- assenza di sviluppo
- + crescita iniziale con scarso intorbidamento del terreno
- ++ crescita di media entità con discreto intorbidamento del terreno inferiore però a quello dei tubi di controllo.
- +++ crescita rigogliosa con intorbidamento analogo a quello ottenuto nei tubi di controllo.

Questo è stato il procedimento generale usato in tutte le nostre ricerche.

In alcuni casi particolari, a titolo di più precisa indagine e di documentazione grafica, abbiamo eseguito uno studio nefelometrico di talune colture in esame, trattando le curve di crescita dei germi coltivati in presenza ed in assenza di acido p-aminosalicilico. Il grado di torbidità è stato misurato all'apparecchio di Pullfrich.

Come materiale batterico è stato in gran parte usato quello sul quale abbiamo riferito in una nostra prima nota sui micobatteri (PENSO G., CATTANEO C., MORELLINI M., ORTALI V., 1948), aumentato di alcuni ceppi di nuovo isolamento o pervenutici nel frattempo da altre Collezioni. Si tratta di 286 ceppi tubercolari umani, bovini, aviari e paratubercolari, di collezione o da noi stessi isolati.

Tutti i ceppi incapaci di crescere in profondità nel terreno di Dubos sono stati eliminati, così come è stata controllata ogni crescita nel terreno di Dubos per evitare risultati falsi dovuti all'accidentale sviluppo di germi d'inquinamento, insensibili all'acido p-aminosalicilico.

RISULTATI.

I risultati ottenuti con la metodica ora descritta sono riportati nelle seguenti tabelle, nelle quali i diversi ceppi saggiati sono stati suddivisi in 5 gruppi:

- 1) ceppi di collezione ritenuti paratubercolari (tab. I);
- 2) ceppi di collezione ritenuti tubercolari umani o bovini (tab. II);
- 3) ceppi di collezione ritenuti tubercolari aviari (tab. III);
- 4) ceppi che noi abbiamo isolato dall'ambiente, da insetti, da animali a sangue freddo (tab. IV);
- 5) ceppi che noi abbiamo isolato da materiale patologico proveniente da ammalati di tubercolosi (tab. V).

TABELLA I

CEPPI DI MICOBATTERI DI COLLEZIONE RITENUTI PARATUBERCOLARI

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS $\mu\text{g cm}^3$ di terreno					
		1000	100	10	5	1	0
B. 10	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Barry	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Battaglini	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Be. 31	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Beck	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Beck RR.	Ist. Sup. Sanità Roma	+	+	+	+	+	+
Boquet	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Brinckerhoff I	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Brinckerhoff II	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Butter	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
By. 31	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Ch 4	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Ching Fong	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Clegg I	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Clegg II	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Cr. 5	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Cummins	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Currie	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
D. 6	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Danes	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Duval	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Elly	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Favia	Ist. Sup. Sanità Roma	+	+	+	+	+	+
Fish	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Fleol	Is. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Friburgensis	Ist. Cantacuzino Bucarest	+	+	+	+	+	+
Friedmann	Ist. Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Friedmann 946	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Frog	ATCC Washington	+	+	+	+	+	+

Segue : TABELLA I

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $\mu\text{g cm}^3$ di terreno					
		1000	100	10	5	1	0
Frosch	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Ga. 32	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
GP. 60	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
GP. 61	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Grassbacillus	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Grassberger	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Grassberger	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Grustern	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
H. 10	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Hallibut	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Istisan VIII	Ist. Sup. Sanità Roma	+	+	+	+	+	+
Karlinski	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Karlinski	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Kedrowski	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Korn	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
L. 619	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Lanterna	Ist. Pat. Gen. Pavia	+	+	+	+	+	+
Loewenstein	Lab. Loewenstein Vienna	+	+	+	+	+	+
Marpmann	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Mayeranne	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Milch	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Moeller	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Muir	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. enteritidis</i>	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. marinum</i>	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. muris</i> D. 15	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. phlei</i> 54	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. phlei</i> 525	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. smegmatis</i>	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. smegmatis</i>	Nat. Biol. Mus. New York	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. smegmatis</i> 53	Nat. Biol. Mus. New York	+	+	+	+	+	+
	Univ. of Washington	+	+	+	+	+	+
	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+

Segue: TABELLA I

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $\mu\text{g cm}^3$ di terreno					
		1000	100	10	5	1	0
<i>Myc. stercoris</i> 77	ATCC Washington	+	+	+	+	+	+
<i>Myc. stercoris</i> 281	ATCC Washington	+	+	+	+	+	+
Nabarro Bayon	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Needham 361	NIH Washington	+	+	+	+	+	+
Ninni N. 16	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Pellegrino	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Pseudoperlsucht	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Rabinowitsch R	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Rabinowitsch S	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Randoni	Ist. Pat. Gen. Pavia	+	+	+	+	+	+
Rost Williams	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+
Schildkröte	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Seine	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Serpent S. 20	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Smegma 19	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Smegma 22	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
T. 21	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Timoteo	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Vallée gelb	Ist. R. Koch Berlino	+	+	+	+	+	+
Vip. 27	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
Vip. 28	Ist. Pasteur Parigi	+	+	+	+	+	+
18 « 518 »	NCTC Londra	+	+	+	+	+	+

CEPPI DI MICOBATTERI RITENUTI TUBERCOLARI UMANI O BOVINI

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $\mu\text{g cm}^3$ di terreno						Osservazioni
		1000	100	10	5	1	0	
Allison	Ist. Lister Londra	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
BCG	Ist. Pasteur Parigi	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Boeuf 6	Ist. Pasteur Parigi	—	—	—	+	++	++	Tbc nella cavia
Boeuf 11	Ist. Pasteur Parigi	—	—	+	+	++	++	Tbc nella cavia
Dup. S.	Ist. Pasteur Parigi	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Gray 15702	Ist. Lister Londra	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
H. 37	NCTC Londra	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
H. 522	Ist. C. Forlanini Roma	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Lasfargue	Ist. Pasteur Parigi	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Maggiora	Ist. Sup. Sanità Roma	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Osborne	Ist. Lister Londra	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Tb. 1	Ist. Ehrlich Marburgo	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
Vallée	Ist. Pasteur Parigi	—	—	—	—	+	++	Tbc nella cavia
12940	Ist. Lister Londra	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia

TABELLA III
CEPPI DI MICOBATTERI DI COLLEZIONE RITENUTI TUBERCOLARI AVIARI

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $\mu\text{g cm}^3$ di terreno					
		1000	100	10	5	1	0
<i>Myc. Avium</i> Bang	NCTC Londra	—	—	++	++	++	++
» Cow 18	NCTC Londra	++	++	++	++	++	++
» Cow 19	NCTC Londra	++	++	++	++	++	++
» Cow 70	NCTC Londra	++	++	++	++	++	++
» Cow 73	NCTC Londra	—	++	++	++	++	++
» Cow 75	NCTC Londra	++	++	++	++	++	++
» Göring	NCTC Londra	++	++	++	++	++	++
» Lafont	Ist. Pasteur Parigi	—	++	++	++	++	++
» M.	Ist. Forlanini Roma	—	++	++	++	++	++
» New Haw	NCTC Londra	—	++	++	++	++	++
» P.	Ist. Forlanini Roma	—	++	++	++	++	++
» Poulet	Ist. Pasteur Parigi	—	++	++	++	++	++
» Rhode Island	NCTC Londra	—	++	++	++	++	++
» Senthille	Ist. Pasteur Parigi	—	++	++	++	++	++
» W.P.	NCTC Londra	—	++	++	++	++	++
» Z. 8	NCTC Londra	—	++	++	++	++	++
» 17	Ist. Pasteur Parigi	—	++	++	++	++	++
» Courmont	Ist. Igiene Losanna	—	++	++	++	++	++

CEPPI DI MICOBATTERI ISOLATI DALL'AMBIENTE, DA INSETTI O DA ANIMALI A SANGUE FREDDO

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $\mu\text{g cm}^3$ di terreno						Osservazioni
		1000	100	10	5	1	0	
2105	<i>Musca</i>	+	+	+	+	+	+	
2107	»	+	+	+	+	+	+	
2110	»	+	+	+	+	+	+	
2111	»	+	+	+	+	+	+	
2113	»	+	+	+	+	+	+	
2114	»	+	+	+	+	+	+	
2116	»	+	+	+	+	+	+	
2117	»	+	+	+	+	+	+	
2118	»	+	+	+	+	+	+	
2119	»	+	+	+	+	+	+	
2120	»	+	+	+	+	+	+	
2121	»	+	+	+	+	+	+	
2122	»	+	+	+	+	+	+	
2123	»	+	+	+	+	+	+	
2125	»	+	+	+	+	+	+	
2126	»	+	+	+	+	+	+	
2127	»	+	+	+	+	+	+	
2128	»	+	+	+	+	+	+	
2130	»	+	+	+	+	+	+	
2132	»	+	+	+	+	+	+	
2138	»	+	+	+	+	+	+	
2143	»	+	+	+	+	+	+	
2150	»	+	+	+	+	+	+	
2152	»	+	+	+	+	+	+	
2153	»	+	+	+	+	+	+	
2154	»	+	+	+	+	+	+	
2174	»	+	+	+	+	+	+	
2208	»	+	+	+	+	+	+	
2210	»	+	+	+	+	+	+	

Segue: TABELLA IV

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $\mu\text{g cm}^3$ di terreno						Osservazioni
		1000	100	10	5	1	0	
2904	<i>Musca</i>	—	++	++	++	++	++	
2912	»	++	++	++	++	++	++	
3006	»	++	++	++	++	++	++	
3156	»	++	++	++	++	++	++	
3757	»	++	++	++	++	++	++	
3758	»	++	++	++	++	++	++	
3763	»	++	++	++	++	++	++	
3782	»	++	++	++	++	++	++	
3789	»	++	++	++	++	++	++	
3798	»	++	++	++	++	++	++	
2391	»	++	++	++	++	++	++	
3821	»	++	++	++	++	++	++	
3840	»	—	++	++	++	++	++	
3930	»	++	++	++	++	++	++	Tbc cavia
2988	»	++	++	++	++	++	++	Tbc cavia
2997	»	++	++	++	++	++	++	
3063	»	++	++	++	++	++	++	
3615	»	++	++	++	++	++	++	
3852	»	++	++	++	++	++	++	
3855	»	++	++	++	++	++	++	
3875	»	++	++	++	++	++	++	
3966	»	++	++	++	++	++	++	
4020	»	++	++	++	++	++	++	
4022	»	++	++	++	++	++	++	
4031	»	++	++	++	++	++	++	
4036	»	—	++	++	++	++	++	Tbc cavia
4350	»	++	++	++	++	++	++	Tbc cavia
4453	»	++	++	++	++	++	++	Tbc cavia
4456	»	++	++	++	++	++	++	
4496	»	++	++	++	++	++	++	
4526	»	++	++	++	++	++	++	

Segue: TABELLA IV

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: μ /cm ³ di terreno						Osservazioni
		1000	100	10	5	1	0	
6470	Intestino di rospo	—	—	—	—	—	+	Tbe cavia
3367	Geotrupes	+	+	+	+	+	+	
6821	Mosca non identificata	+	+	+	+	+	+	
1865	Insetto non identificato	+	+	+	+	+	+	
1817	Espettorato	+	+	+	+	+	+	
1857	Letame	+	+	+	+	+	+	
1869	»	+	+	+	+	+	+	
1911	»	+	+	+	+	+	+	
1875	»	+	+	+	+	+	+	
1861	Paglia fradicia	+	+	+	+	+	+	
1864	Segatura legno fradicia	+	+	+	+	+	+	
1886	Legno fradicio	+	+	+	+	+	+	
1809	»	+	+	+	+	+	+	
Or.	Zamenis gemonensis intestino	+	+	+	+	+	+	

TABELLA V

CEPPI DI MICOBATTERI DA NOI ISOLATI DA MATERIALE PATOLOGICO PROVENIENTE DA MALATI DI TUBERCOLOSI

Nome del ceppo	Provenienza	Sensibilità al PAS: $1'g\ cm^3$ di terreno						Osservazioni
		1000	100	10	5	1	0	
145	espettorato	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
146	»	—	—	—	—	—	++	»
147	»	—	—	—	—	—	++	»
149	»	—	—	—	—	—	++	Non inoculato
158	»	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
286	»	—	—	—	—	—	++	Non inoculato
349	»	—	—	—	—	—	++	»
351	»	—	—	—	—	—	++	»
352	»	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
354	»	—	—	—	—	—	++	»
355	»	—	—	—	—	—	++	»
356	»	—	—	—	—	—	++	»
359	»	—	—	—	—	—	++	»
360	»	—	—	—	—	—	++	»
363	»	—	—	—	—	—	++	»
370	»	—	—	—	—	—	++	Non inoculato
375	»	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
377	»	—	—	—	—	—	++	Non inoculato
382	»	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
392	»	—	—	—	—	—	++	»
403	»	—	—	—	—	—	++	»
407	»	—	—	—	—	—	++	»
412	»	—	—	—	—	—	++	Non inoculato
437	»	—	—	—	—	—	++	»
114	»	—	—	—	—	—	++	»
Carab.	»	—	—	—	—	—	++	»
Di Can.	»	—	—	—	—	—	++	Tbc nella cavia
La Rob.	»	—	—	—	—	—	++	»
P. 6	pus empiematico	—	—	—	—	—	++	»
P. 198	»	—	—	—	—	—	++	»
P. 374	»	—	—	—	—	—	++	»
P. 375	»	—	—	—	—	—	++	»
P. 379	»	—	—	—	—	—	++	»
P. 400	»	—	—	—	—	—	++	Non inoculato
P. Ca.	»	—	—	—	—	—	++	»
P. C. 8828	milza cavia P. Ca.	++	++	++	++	++	++	Tbc nella cavia
		—	—	—	—	—	++	Non inoculato

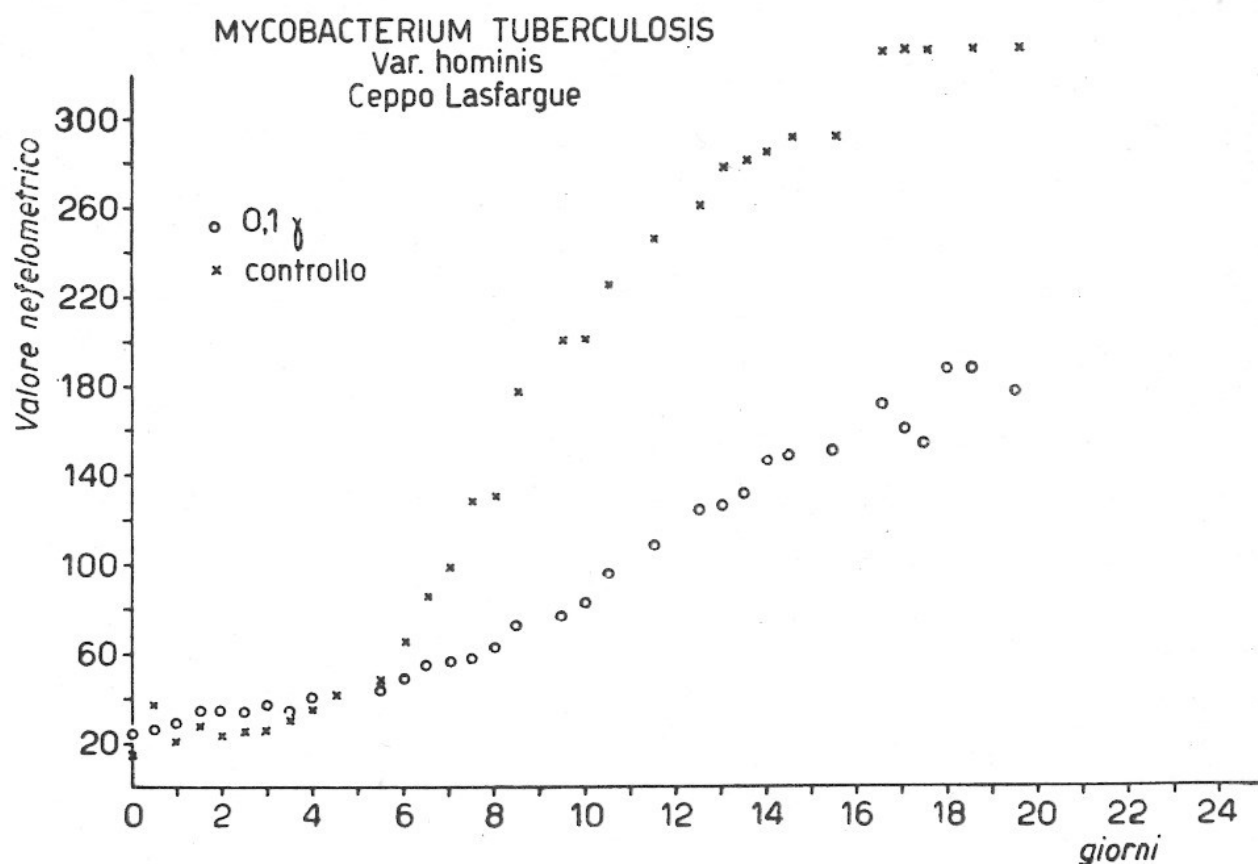


Figura 1

Curva di crescita del *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (ceppo Lasfargue) trattato con dose subinibenti di Pas (μ g 0,1/cm³)

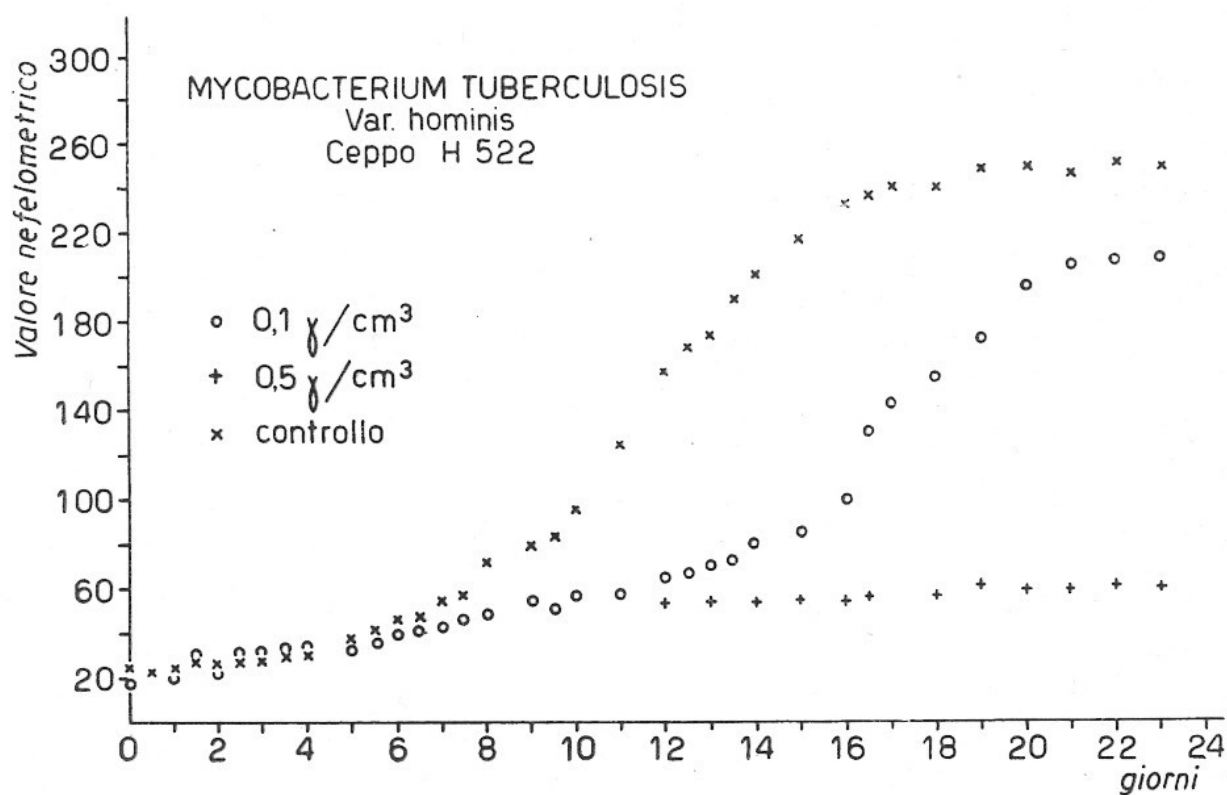


Figura 2

Curva di crescita del *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (ceppo H 522) trattato con dosi subinibenti di Pas (μ g 0,1 e 0,5/cm³)

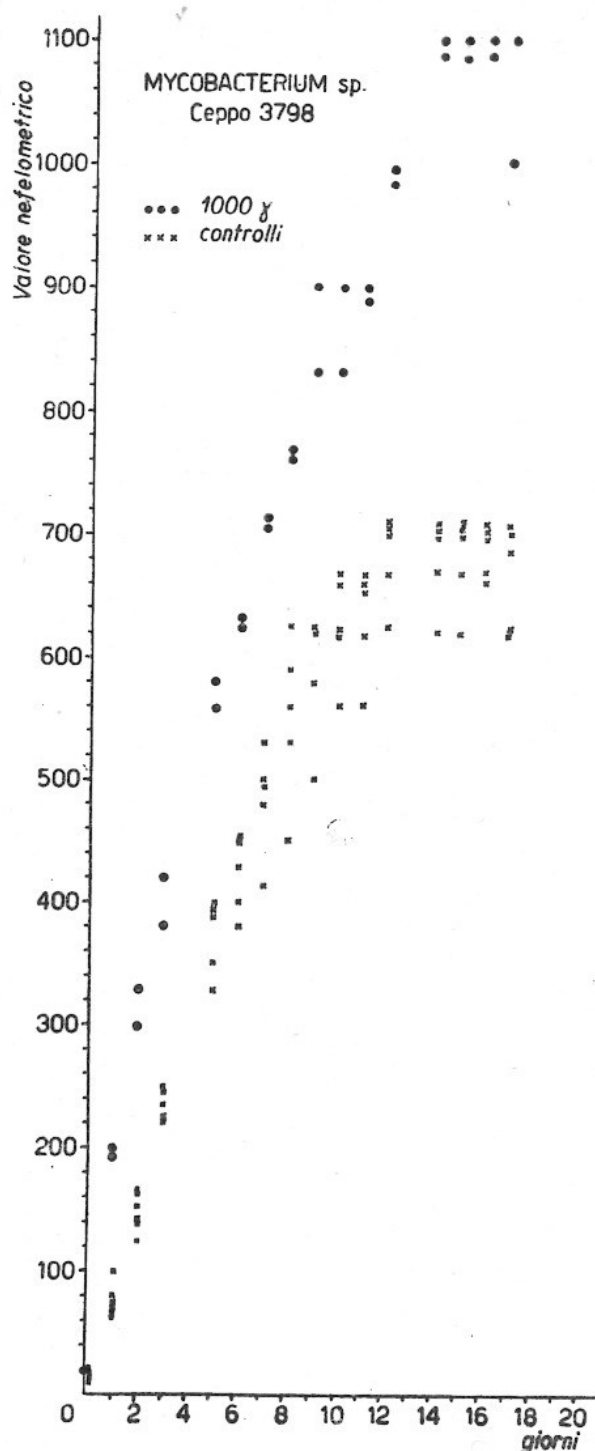


Figura 3
Curva di crescita di un paratubercolare
(*Mycobacterium* sp. - ceppo 3798)
trattato con μg 1000 di Pas cm^3 .

I risultati dello studio della moltiplicazione batterica di alcuni ceppi in esame mediante l'analisi della curva di crescita sono rappresentati nelle figure 1, 2, 3, nelle quali sono riportati in ascissa il tempo in giorni e in ordinata i valori nefelometrici.

Le figg. 1 e 2 si riferiscono a ceppi di micobatteri tubercolari di tipo umano; la fig. 1 dà la moltiplicazione batterica del ceppo Lasfargue in assenza e in presenza di acido p-aminosalicilico ($0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), la figura 2 si riferisce alla moltiplicazione del ceppo H522 in assenza ed in presenza di acido p-aminosalicilico ($0,1 - 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$).

La figura 3 è invece un esempio della moltiplicazione di un paratubercolare seminato su terreno di Dubos semplice e sullo stesso terreno adizionato di acido p-aminosalicilico ($1000\mu\text{g}/\text{cm}^3$).

ANALISI DEI RISULTATI.

Dall'esame dei dati riportati nella tabella I risulta che i ceppi di micobatteri di collezione classificati come paratubercolari si sviluppano normalmente anche in presenza di acido p-aminosalicilico ($1000\mu\text{g}/\text{cm}^3$ di terreno). Un solo ceppo fa eccezione: il Vallée gelb nelle sue due varianti pigmentata ed apigmentata, la cui sensibilità risulta compresa tra 100 e $1000\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

La tabella II si riferisce ai ceppi di micobatteri di collezione classificati come tubercolari di tipo umano o bovino. Essa comprende 16 ceppi di *Myc. tuberculosis var. hominis* e 4 di *Myc. tuberculosis var. bovis*. Tutti questi ceppi sono stati inibiti nel loro sviluppo non soltanto da $1000\mu\text{g}$ di acido p-aminosalicilico per cm^3 , ma anche da 100, 10, 5 e quasi sempre anche da $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$ di antibiotico. La varietà bovina è forse leggermente meno sensibile dell'umana ma si tratta di una sfumatura, diremo quasi di una impressione, più che di una realtà, che non è ancora suffragata da una sufficiente esperienza. Il BCG in ogni modo si comporta come un tubercolare vero, il che sta a dimostrare come il comportamento nei confronti dell'acido p-aminosalicilico sia in rapporto con la natura tubercolare del microbo, indipendentemente dalla sua virulenza. Due ceppi di varietà umana, e precisamente il ceppo Lasfargue e H522, sono stati studiati analizzando lo andamento delle curve di crescita (figg. 1 e 2), confrontando il comportamento su terreno di Dubos normale e su terreno di Dubos contenente acido p-aminosalicilico ($0,1\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $0,5\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Come risulta dalle due curve la presenza di acido p-aminosalicilico riduce la velocità della moltiplicazione batterica.

Il terzo gruppo (tabella III) infine comprende 18 ceppi di bacilli tubercolari di tipo aviario, provenienti da varie collezioni e pervenutici tutti con la dicitura « *Myc. avium* ». I ceppi appartenenti alla varietà aviaria presentano un comportamento meno uniforme di quello dei ceppi appartenenti alle altre varietà. Infatti il ceppo Bang è completamente inibito da $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico e lo è parzialmente da 10,5 e $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$; anche il Courmont è parzialmente inibito da 100, 10 e $5\mu\text{g}/\text{cm}^3$ di questo antibatterico ed il New Haw, il P, il Rhode Island, lo Z.8 lo sono da $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Cinque ceppi invece e precisamente il Cow 18, Cow 19, Cow 70, Cow 75 ed il Goring, tutti provenienti dalla N.C.T.C. di Londra, sono insensibili anche a $1000\mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico, presentando

così un comportamento analogo a quello dei micobatteri paratubercolari. Ma i cinque ceppi in questione hanno anche altre proprietà in comune: sono sensibili a uno stesso fago (PENSO G., ORTALI V., 1949), producono tubercoli sulla membrana corioallantoidea di pollo (CASTELNUOVO G., ORTALI V., PENSO G. 1949), hanno proprietà metaboliche che li distinguono dagli altri ceppi di micobatteri aviari.

Ciò premesso, i nostri risultati starebbero a dimostrare che per gli aviari i $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico rappresentano pressochè la soglia tra la sensibilità e l'insensibilità.

Restano da considerare gli ultimi due gruppi che comprendono i micobatteri non classificati, perchè di nuovo isolamento. Nel quarto gruppo abbiamo inclusi i ceppi da presumere appartenenti ai paratubercolari, perchè isolati dall'ambiente, da insetti o da animali a sangue freddo, mentre nel quinto gruppo abbiamo elencato i ceppi presumibilmente tubercolari veri, perchè isolati da pazienti clinicamente ammalati di tubercolosi.

Come risulta dalla tabella IV, il primo di questi gruppi è costituito da 136 ceppi la maggior parte dei quali si è dimostrata insensibile anche a $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico, come i paratubercolari di collezione. Fanno eccezione i ceppi 2125 e 2425 sensibili a $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, i ceppi 2537, 3840, 4350, 6470 sensibili anche ad $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di antibatterico ed i ceppi 2904, 2988, 4036, 4456 dotati di una sensibilità intermedia più o meno marcata. Il comportamento di uno dei ceppi di questo gruppo, il 3798, è stato saggiato anche attraverso l'analisi delle curve di crescita in terreno di Dubos normale ed in terreno di Dubos contenente $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico. La moltiplicazione si è rivelata più abbondante in presenza che non in assenza di acido p-aminosalicilico (fig. 3). Da questo risultato si può dedurre che l'acido p-aminosalicilico non è sempre un inibitore della moltiplicazione dei bacilli paratubercolari. Ciò starebbe a dimostrare una profonda diversità nelle proprietà metaboliche e più generalmente biologiche, dei ceppi tubercolari e paratubercolari.

Per confermare la natura tubercolare o meno, tutti questi ceppi microbici sono stati inoculati nella cavia. Ne è risultato che i 4 ceppi sensibili a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico sono patogeni per la cavia come i tubercolari veri, così pure due dei parzialmente sensibili (n. 2988 e n. 4456) e due degli insensibili a $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di antibiotico (n. 4526 e n. 4819). Tutti gli altri ceppi non hanno provocato nelle cavie il quadro caratteristico della malattia tubercolare. La maggior parte si è rivelata innocua per l'animale da esperimento; tutt'al più alcuni ceppi hanno provocato lesioni analoghe a quelle più volte descritte per i micobatteri paratubercolari. La patogenicità dei due ceppi insensibili all'acido p-aminosalicilico si può interpretare a parer nostro ammettendo che la colonia di isolamento

esaminata fosse costituita da una coltura mista. Ci orienta verso questa ipotesi il risultato di una ricerca eseguita sull'espettorato di un ammalato di tubercolosi, i cui risultati sono riportati nella tabella V. La coltura di primo isolamento (P.Ca.) si era dimostrata resistente a $1000 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di antibatterico. La stessa coltura, inoculata nella cavia, ha dato origine a un quadro tubercolare vero e proprio e dalla milza dell'animale infettato è stato isolato un ceppo (P.Ca 8828) sensibile a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico. La colonia di primo isolamento doveva essere costituita da un ceppo di tubercolare vero e da un ceppo di un saprofita acido resistente, e nella coltura mista in presenza di acido p-aminosalicilico quest'ultimo aveva preso il sopravvento. Il passaggio nella cavia ha selezionato il tubercolare vero, che in secondo tempo è stato isolato dall'organo in coltura pura. E' molto presumibile che anche nei due casi in parola si tratti di un fenomeno analogo.

Per quanto riguarda i pochi ceppi la cui sensibilità oscilla tra 100 e $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico, non patogeni per la cavia, ci mancano a tutt'oggi elementi per una qualsiasi spiegazione. Il comportamento di questi ceppi è ancora in studio.

La tabella V, infine, si riferisce all'ultimo gruppo saggiato: si tratta di 36 stipiti che abbiamo isolato da materiale patologico proveniente da ammalati di tubercolosi. Sette ceppi provengono dalla semina di pus empiematico, i rimanenti dalla semina di espettorati di pazienti affetti da tubercolosi polmonare aperta. Come risulta dai dati riportati, tutti questi ceppi sono sensibili a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di acido p-aminosalicilico ad eccezione del ceppo P.Ca, del quale abbiamo precedentemente parlato, che si è rivelato come una coltura mista. Del resto più volte noi ci siamo trovati dinanzi a colture di acido resistenti miste, nelle quali la presenza di due diversi micobatteri si è rivelata attraverso la inibizione tagica di una specie e la coltura dell'altra.

CONCLUSIONI

Risulta chiaro dall'analisi di tutti i dati esposti in questo lavoro che i micobatteri in funzione della loro sensibilità all'acido p-aminosalicilico si possono dividere in tre gruppi:

- 1) micobatteri insensibili alla presenza di $1000 \mu\text{g}$ di acido p-aminosalicilico per cm^3 di terreno;
- 2) micobatteri sensibili a $1000 \mu\text{g}$ e insensibili a $100 \mu\text{g}$ di acido p-aminosalicilico per cm^3 di terreno;

3) micobatteri sensibili a meno di 5 μg di acido p-aminosalicilico per cm^3 di terreno.

Nel primo gruppo risultano compresi i micobatteri noti generalmente con il nome di paratubercolari, nel secondo gli aviari, nel terzo i tubercolari veri.

Certamente in natura non potranno mancare, e non mancheranno, eccezioni a questo schema, come succede del resto ogni qual volta si generalizzi un fenomeno. Tuttavia lo studio colturale dei micobatteri in presenza di concentrazioni scalari di acido p-aminosalicilico può fornire a parer nostro un valido elemento orientativo e probativo della natura tubercolare o meno di un micobatterio. Va anche tenuto in considerazione che la ricerca ha il vantaggio di essere di semplice esecuzione e rapida.

Si potrebbe obiettare che i risultati di una ricerca così condotta potranno essere infirmati dall'eventuale presenza nelle colture in esame di ceppi microbici divenuti resistenti all'acido p-aminosalicilico in seguito alla azione prolungata dell'antibatterico sul microbo stesso, fenomeno ormai ben conosciuto nelle sue manifestazioni e forse anche nella sua stessa essenza per quanto riguarda altri antibatterici e specialmente la streptomycin. Una tale evenienza, proprio nel caso dell'acido p-aminosalicilico, era stata fino a poco tempo fa esclusa. Tuttavia ricerche recenti stanno a dimostrare che una certa resistenza all'acido p-aminosalicilico è un fatto che può anche verificarsi dopo molti mesi di terapia. Ma il grado di resistenza fin qui almeno accertato è molto al di sotto di quel valore che noi abbiamo stabilito come limite differenziale tra i ceppi tubercolari ed i ceppi paratubercolari, e che è di 1000 μg di antibiotico per cm^3 di terreno. Le resistenze fin qui accertate non superano i 20 o 30 μg per cm^3 . (DELAUDE A. M., KARLSON A. G., CARR D. T. FELDMAN W. H., PFUETZE K. H. 1949; KARLSON A. G., DELAUDE A. M., NEEDHAM M., 1950).

Roma, Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia - e Istituto Carlo Forlanini, 20 maggio 1950.

BIBLIOGRAFIA

- CATTANEO G., MORELLINI M., ORTALI V. e PENSO G., Studi e ricerche sui micobatteri. Nota VI. L'azione dell'acido p-aminosalicilico sui micobatteri. Differenziazione tra tubercolari e paratubercolari, Rend. Ist. Sup. di Sanità, 13, 390 (1950).
- CASTELNUOVO G., ORTALI V. e PENSO G., Studi e ricerche sui micobatteri. Nota IV. Tubercolosi sperimentali sulla membrana corioallantoidea dell'embrione di pollo da determinati ceppi di tubercolare aviario, Rend. Ist. Sup. di Sanità, 12, 926 (1949).

- DELAUDE A. M., KARLSON A. G., CARR D. T., FELDMAN W. H. e PFUETZE H. K., Increase in Resistance of Tubercle Bacilli to Sodium p-aminosalicylic Acid: Observations on Cultures Isolated from Patients during Chemotherapy, *Proceed. Staff, Mayo Clin.*, 24, 341 (1949).
- KARLSON A. G., DELAUDE A. M. e NEEDHAM G. M., L'emploi de la gélose au jaune d'oeuf pour la mise en évidence des bacilles tuberculeux résistants à la streptomycine ou à l'acide para-aminosalicylique, *Ann. Inst. Pasteur*, 78, 97 (1950).
- PENSO G., CATTANEO C., MORELLINI M. e ORTALI V., Studi e ricerche sui micobatteri. Nota I. Premesse generali ed elenco dei ceppi di collezione e di nuovo isolamento, *Rend. Ist. Sup. di Sanità*, 11, 1496 (1948).
- PENSO G., LELLI G. e ORTALI V., Studi e ricerche sui micobatteri. Nota III. Sul potere patogeno di un micobatterio: il cosiddetto « ceppo Battaglini », *Rend. Ist. Sup. di Sanità*, 12, 919 (1950).
- PENSO G. e ORTALI V., Studi e ricerche sui micobatteri. Nota II. I fagi dei micobatteri, *Rend. Ist. Sup. di Sanità*, 12, 903 (1949).
-