

**47. Brenno BABUDIERI, Giambattista BIETTI (*), Dario BOCCIARELLI. —
La batteriolisi prodotta dal "lysozym", lacrimale studiata
al supermicroscopio elettronico.**

Nelle lacrime trovasi, come è noto, contenuta una speciale sostanza descritta da Fleming (1) nel 1922, dotata di spiccata attività litica verso determinati germi e denominata « lysozym » dal suddetto autore. Essa si rinviene anche in altre secrezioni dell'organismo umano (p. es. nel muco nasale, nello sputo), in molti tessuti, nell'albume d'uovo ed in vari vegetali. Particolarmente ricchi in lysozym sono l'albume d'uovo, le lacrime ed i leucociti.

Il lysozym possiede le principali caratteristiche degli enzimi, e come tale viene considerato dai più: è solubile in acqua, non passa attraverso le membrane semipermeabili, viene distrutto dall'ebollizione; resiste alla luce ed all'essiccamento. L'optimum di azione si ha ad una temperatura di 56-60° ed a reazione neutra del mezzo.

Il lysozym agisce bene soprattutto sopra molti germi saprofiti dell'aria, anche ad altissime diluizioni, è invece dotato di azione assai scarsa o addirittura nulla (Callerio [2], Venco [3]) sui principali germi patogeni, alcuni dei quali, secondo Ridley (4) verrebbero però attaccati, ma solo da lacrime non diluite. Il lysozym contenuto nel secreto lacrimale adempie alla importante funzione di mantenere il sacco congiuntivale libero dai germi dell'aria, che altrimenti vi pullulerebbero in gran numero; secondo Ridley (4) agirebbe forse anche ostacolando, sia pure in misura assai minore, lo sviluppo di certi germi patogeni, ciò che viene però contestato da altri AA. (Venco [3]).

Questi i dati essenziali sul principio litico delle lacrime; per una migliore conoscenza dell'argomento rimandiamo, oltre che alle pubbli-

(*) Direttore della Clinica oculistica di Sassari, ospite dell'Istituto.

(1) FLEMING, « On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions », Proc. Roy. Soc. Ser. B., 93, 306 (1922).

(2) CALLERIO, « Studi sul Lysozym », Boll. Soc. Med., Pavia, 699 (1932).

(3) VENCO, « Ricerche sul Lysozym nelle lacrime », Rass. It. d'Ott., 2, 519 (1933).

(4) RIDLEY, « The tears » (Lysozym), Modern Trends in Ophthalmology-Butterworth and Co. Publish., 383, London (1940).

cazioni di Fleming ⁽¹⁾, Fleming e Allison ⁽²⁾, Ridley ^(4,6), Wolff ⁽⁷⁾, Nakamura ⁽⁸⁾, Anderson ⁽⁹⁾, Hallauer ^(10,11), Cavka e Prica ⁽¹²⁾, ai più recenti pregevoli lavori di Callerio ⁽³⁾, di Venco ⁽⁵⁾ e di Caselli ⁽¹³⁾.

Alcuni hanno voluto rilevare somiglianze fra l'azione del lysozym e quella del batteriofago, ma mentre il primo non si rigenera nè si esaurisce durante la lisi, il secondo è capace di moltiplicarsi nel corso della lisi stessa e di formare chiazze nelle patine batteriche. Esso inoltre attacca solamente germi vivi, mentre il lysozym aggredisce anche germi morti.

Le recenti ricerche di Ruska ⁽¹³⁾ al supermicroscopico sul batteriofago, indagini che hanno permesso di portare notevole luce sul processo di lisi batterica che avviene per opera del principio di Twort-D'Herelle, ci hanno indotto a studiare il comportamento della batteriolisi da lysozym al supermicroscopio elettronico, onde poter stabilire attraverso questo nuovo prezioso mezzo d'indagine, più minute differenze fra le due forme di lisi dei germi.

Ci eravamo pure proposti di estendere maggiormente il nostro campo di ricerca esaminando al supermicroscopio anche il comportamento dei germi nell'invecchiamento ed in altre forme di lisi (da acqua distillata, da digestione peptica ecc.) non ancora studiate. Purtroppo ciò non ci è stato possibile, poichè il supermicroscopio elettronico dell'Istituto Superiore

(1) FLEMING e ALLISON, « Further observations on a bacteriolytic element found in tissues and secretions », Proc. Roy. Soc., Ser. B, 94, 142 (1922).

(2) RIDLEY, « Lysozym: an antibacterial body present in great concentration in tears, and its relations to infection of the human eye », Proc. Roy. Soc., 21, 1495 (1928).

(3) WOLFF, « Untersuchungen ueber das Lysozym », Zeitschr. f. Imm., 50, 88 (1927) e 57, 188 (1928)

(4) NAKAMURA, « Ueber Lysozymwirkungen », Zeitschr. f. Imm., 38, 425 (1923).

(5) ANDERSON, « Untersuchungen ueber das Lysozym aus dem "Micrococcus lysodeicticus" », Zeitschr. f. Imm., 70, 90 (1931).

(6) HALLAUER, « Ueber das Lysozym », Zbl. f. Bakter. I. Orig., 114, 519 (1929).

(7) HALLAUER, « Klinische und experimentelle Untersuchungen ueber dem Lysozymgehalt im Bindehautsack u. in der Tränenflüssigkeit », Arch. f. Augenheilk., 103, 199 (1930).

(8) CAVKA e PRICA, « Ueber Lysozymwirkung in normalen und pathologischen Augensekreten », Graefes Arch. f. Ophth., 1121, 740 (1929).

(9) RUSKA, « Morphologische Befunde bei der bakteriophagen Lyse », Arch. f. Virusf., 2, 345 (1942).

di Sanità è stato ai primi di ottobre del 1943, trasferito in Germania per ordine delle autorità militari germaniche.

PARTE SPERIMENTALE

Per le nostre ricerche ci siamo serviti di due ceppi di cocchi cromo-



FIG. 1. - Aspetto normale dei cocchi dell'aria in soluzione fisiologica.

geni, Gram-negativi, isolati dall'aria, che si erano mostrati particolarmente sensibili all'azione del lysozym, non essendo riusciti ad ottenere alcuno stipite di « *Micrococcus lysodeicticus* », cioè di quel germe dell'aria isolato da Fleming (1) che s'è rivelato sensibilissimo alla lisi.

Patine di cultura di 24 ore su agar dei suddetti germi venivano emulsionate con lacrime diluite in soluzione fisiologica nella

proporzione di 1:50-1:200. Le lacrime venivano preferibilmente prelevate ricorrendo a stimolazioni meccaniche della congiuntiva. Le emulsioni batteriche di cui sopra si suddividevano poi in varie provette che si ponevano in termostato a 37°. Esse venivano poi tolte dal termostato in tempi diversi, sino a che il liquido contenuto nelle provette appariva completamente chiarificato e limpido (da 15 minuti a 3 ore), in modo da poter sorprendere la lisi in varie fasi successive. Una provetta contenente un'emulsione di germi in soluzione fisiologica senza aggiunta di lacrime serviva per controllo (fig. 1). Alla emulsione batterica, appena tolta dal termostato, si aggiungeva il 10% di formalina o alcune gocce di acido osmico all'1% come fissatore. Si provvedeva poi a centrifugare la provetta a 10.000 giri per 20' e si lavava per tre volte il sedimento con acqua distillata, centrifugando nuovamente ogni volta. Il sedimento così lavato veniva quindi esaminato al microscopio elettronico.

Il processo della lisi da lysozym si svolge, per quanto abbiamo potuto osservare sui germi da noi presi in esame, attraverso successive fasi che si possono così identificare.

In una *prima fase* si assiste ad una parziale, non uniforme rarefazione del protoplasma batterico. Il corpo del germe mostra delle aree meno dense, più facilmente visibili nelle porzioni periferiche (figg. 2, 3).

In una *seconda fase* il protoplasma si frammenta, più marcatamente alla periferia, con formazione di blocchi più grandi e di granuli più piccoli di varie dimensioni, che in alcuni casi si dispongono a ridosso della membrana batterica, sempre all'interno di essa, a guisa di corona di rosario. La membrana batterica, che diviene nettamente evidente, appare integra: il germe tende a rigonfiarsi, e si differenzia nettamente al disotto della membrana, uno spazio quasi trasparente (figg. 4-7).

Nella *terza fase* la frammentazione del protoplasma è proceduta ulteriormente sino ad aversi una plasmolisi totale. Il corpo batterico si mostra spesso rigonfio, ma in misura variabile: talora il rigonfiamento è note-



FIGG. 2-3. - Cocchi nella prima fase della lisi lysozymica

vole, tal'altra invece modesto (figg. 8-13). Il sacco costituito dalla membrana batterica continua ad apparire integro ed è divenuto quasi del tutto



FIGG. 4-5. - Cocchi nella seconda fase della lisi lysozymica.

trasparente; contiene solo ancora scarsi detriti protoplasmatici, che non possiedono particolari caratteristiche (figg. 10-13).

In nessuna delle tre fasi, collegate naturalmente fra loro da numerosi aspetti di passaggio, è stato possibile osservare fuoriuscita di protoplasma dalla membrana batterica, nè sono apparse visibili deiscenze di quest'ultima.

La membrana non presenta però sempre un aspetto del tutto normale. Piuttosto spesso, specie negli stati più avanzati di lisi, ha un aspetto zigrinato, abbastanza caratteristico (figure 11, 13).

Non si è mai notata l'esistenza di residui protoplasmatici interni, che potessero far pensare ad una sostanza centrale nucleoidica più resistente alla lisi. In nessuna fase si constata la presenza di elementi corpuscolati al di fuori della membrana batterica, sia in rapporto con essa che nel liquido circostante.

Da rilevare che non in tutti i germi il processo di lisi impiega, per essere completo, un tempo costante. Così dopo 30' si osservano già germi che hanno raggiunto lo stadio ultimo della batteriolisi, accanto ad altri

trasparente; contiene solo ancora scarsi detriti protoplasmatici, che non possiedono particolari caratteristiche (figg. 10-13).

In nessuna delle tre fasi, collegate naturalmente fra loro da numerosi aspetti di passaggio, è stato possibile osservare fuoriuscita di protoplasma dalla membrana batterica, nè sono apparse visibili deiscenze di quest'ultima.

La membrana non presenta però sempre un aspetto del tutto normale. Piuttosto spesso, specie negli stati più avanzati di lisi, ha un aspetto zigrinato, abbastanza caratteristico (figure 11, 13).

Non si è mai notata l'esistenza di residui protoplasmatici in-

ancora integri o quasi. Solo dopo qualche ora il processo è completo per tutti i germi. Non abbiamo osservato sensibili diversità morfologiche nei germi fissati con formalina o con acido osmico.

Abbiamo già ricordato che non ci è stato possibile, come desideravamo, estendere le nostre ricerche allo studio sistematico di altre forme di lisi; siamo tuttavia in grado di poter affermare, per quello che ci appare da precedenti indagini nostre e di altri AA., che esistono sicuramente differenze rilevabili al microscopio elettronico fra la batteriolisi da lysozym e le altre forme di lisi più note studiate sin qui.

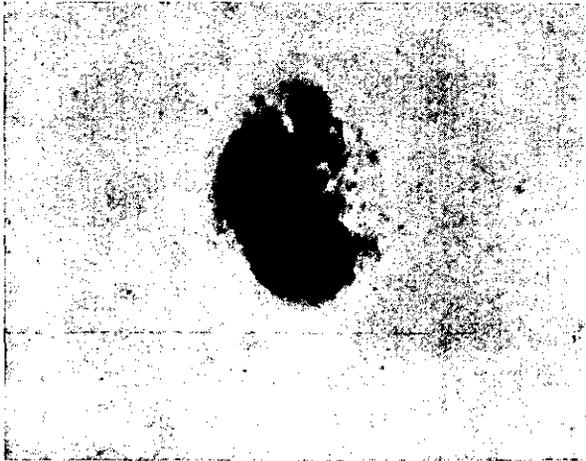
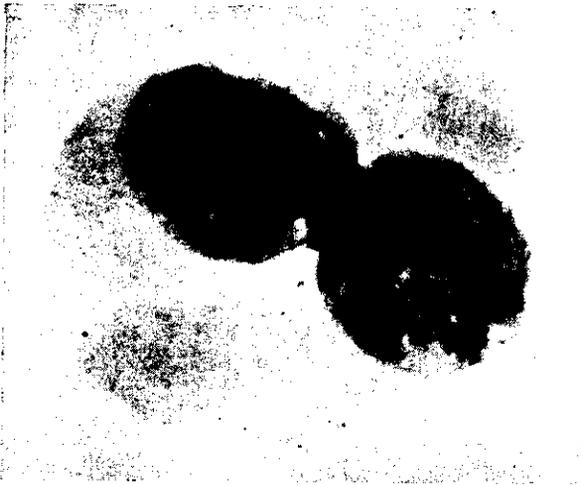
Per quanto concerne il *batteriofago* vediamo anzitutto che nel lysozym mancano le tipiche formazioni rotondeggianti situate fuori del corpo batterico ed interpretate come gli

elementi viventi del principio litico suddetto. L'assenza nel lysozym di tali forme conferma l'ipotesi che il lysozym possa essere considerato come un fermento, differenziandosi così nettamente dal batteriofago, vera e propria formazione vivente, al quale esso era stato più volte in certo senso avvicinato. Differenze sembrano esistere anche nella morfologia dei corpi



FIGG. 6-7. - Cocchi nella seconda fase della lisi lysozymica

batterici lisati: vediamo infatti come nella lisi batteriofagica non si abbia una così evidente frammentazione del protoplasma, come risulta non solo



FIGG. 8-9. — Cocchi nella terza fase della lisi lysozymica.

corpo batterico. Per quanto il fenomeno non si sia potuto studiare, come era nostra intenzione, sui due ceppi di cocchi impiegati nelle nostre esperienze col lysozym, possiamo tuttavia rilevare, attraverso quanto ci consta da

dalla nostra figura che riportiamo (fig. 14), ma anche dalle fotografie del lavoro di Ruska (fig. 15). La membrana batterica rimane integra in entrambi i casi, sebbene debbano esservi modificazioni della sua permeabilità.

Quanto alle alterazioni che subiscono i germi per azione dei *sulfamidici*, studiate da Gaertner (¹⁴), vi è da notare che il sulfamidico agirebbe provocando una deiscenza della membrana batterica, con fuoriuscita di protoplasma alterato (figura 16), fenomeno che manca invece, come abbiamo veduto, col lysozym.

Anche nell'*invecchiamento* dei germi si hanno alterazioni del

(¹⁴) GAERTNER, « Die Sulfonamidwirkung im Lichte der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie », C. f. Bakter. Orig., 150, 97 (1943).

precedenti osservazioni su altri germi, che mentre nella batteriolisi da lysozym si osserva una frammentazione granulare del protoplasma, nel germe invecchiato tale frammentazione non ha luogo, e il protoplasma tende a diafanizzarsi in modo piuttosto uniforme, mentre nell'interno del corpo batterico si differenziano corpi nucleoli (stadio terziario di Piskorski-Ruska).

Riproduciamo anche un singolare aspetto di lisi spontanea che abbiamo osservato in vecchie culture di un fotobatterio (*Coccobacillus Pierantoni*) (fig. 17).

La membrana appare qui integra, il protoplasma presenta una caratteristica frammentazione granulare. Nell'interno del corpo batterico compaiono inoltre formazioni filamentose e un ammasso nucleo-simile di dubbia interpretazione.



FIGG. 10-11. - Cocchi nella terza fase della lisi lysozymica.

Quanto all'intimo meccanismo di azione del lysozym sul batterio non è facile avanzare una sicura spiegazione. Sembra tuttavia che si possano ammettere alterazione della permeabilità della membrana batterica tali da permettere un assorbimento di acqua da parte del plasma batterico, come appare dal rigonfiamento del germe. Bisogna ritenere inoltre che la membrana sia o diventi permeabile allo stesso lysozym.

Ad ogni modo le nostre ricerche portano a conclusioni che non concordano con quelle raggiunte da Caselli ⁽¹⁵⁾ in un suo recente lavoro, pur



FIGG. 12-13. - Cocchi nella terza fase della lisi lysozymica.

soltanto secondaria avrebbero i processi di rigonfiamento idrolitico del corpo batterico e le alterazioni della permeabilità cellulare.

L'immagine elettronica, che mette in evidenza la distribuzione della densità dell'oggetto osservato e non già quella degli indici di rifrazione,

⁽¹⁵⁾ CASELLI, « Ricerche sulla bacteriolisi: dimostrazione dei germi dopo la lisi da lisozima », Boll. Ist. Sier. Mil., 22, 336 (1943).

dandoci la spiegazione delle sue deduzioni. Secondo questo A. infatti « la scomparsa dei germi in seguito alla lisi aspecifica è un fenomeno apparente, illusorio, poichè essi possono essere rimessi in evidenza in opportune condizioni, e specialmente mediante la azione prolungata di coloranti o l'aggiunta alla sospensione di particolari prodotti chimici. Secondo Caselli l'apparente scomparsa dei germi sarebbe dovuta essenzialmente a modificazioni del loro indice di rifrazione, per cui i germi stessi non sarebbero più differenziabili, alla osservazione microscopica, dal mezzo in cui sono sospesi. Importanza



FIG. 14. - Lisi batteriofagica di un germe che appare circondato dai corpuscoli del batteriofago.

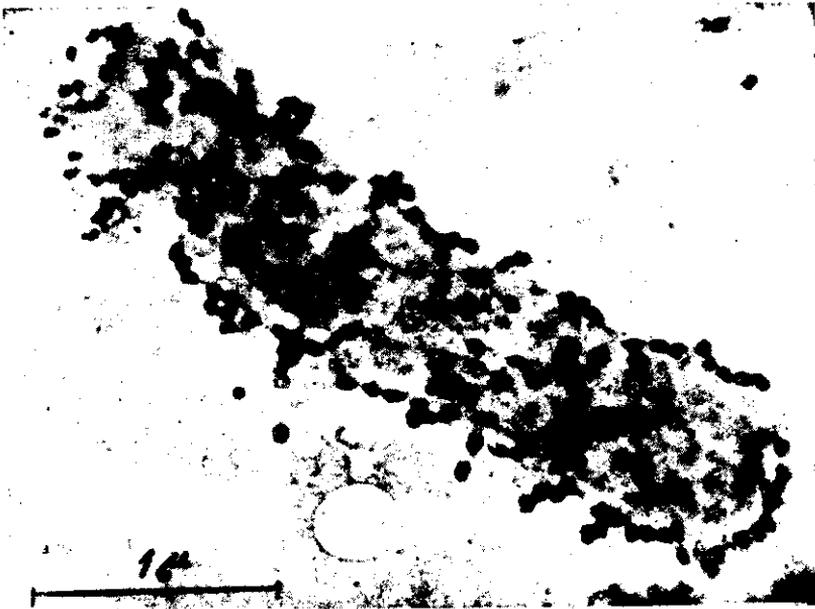


FIG. 15. - Lisi batteriofagica del bacillo del tifo (da Ruska).

ci dimostra invece che l'ipotesi di Caselli non è accettabile. Sotto l'azione del lysozym il corpo batterico si dissolve veramente, e resiste soltanto, poco

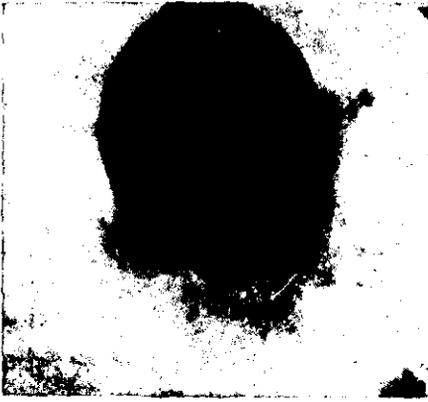


FIG. 16. - Lisi da sulfamidico in stafilococco aureo (da Gaertner).

alterata, la membrana cellulare. E' questa membrana che, trattata a lungo, si colora e dà la torbida immagine del germe distrutto, osservata dal Caselli. E che ciò accada lo conferma anche il risultato ottenuto dal Caselli stesso nelle prove di centrifugazione delle sospensioni lisate, risultato forse non abbastanza valutato nel suo significato. Infatti la più difficile sedimentazione delle sospensioni di germi trattate con il lysozym è evidentemente dovuta al fatto che

non sono già germi, per quanto invisibili, che qui sedimentano, bensì le loro membrane, molto più leggere di questi.

Il nostro reperto dell'integrità della membrana batterica nei germi sottoposti all'azione del lysozym conferma invece le osservazioni fatte nel 1938 da Boasson ⁽¹⁶⁾ mediante esami in campo oscuro ed in preparati colorati. Egli affermava infatti che la membrana batterica non viene distrutta dal lysozym, ma solo resa permeabile al suo

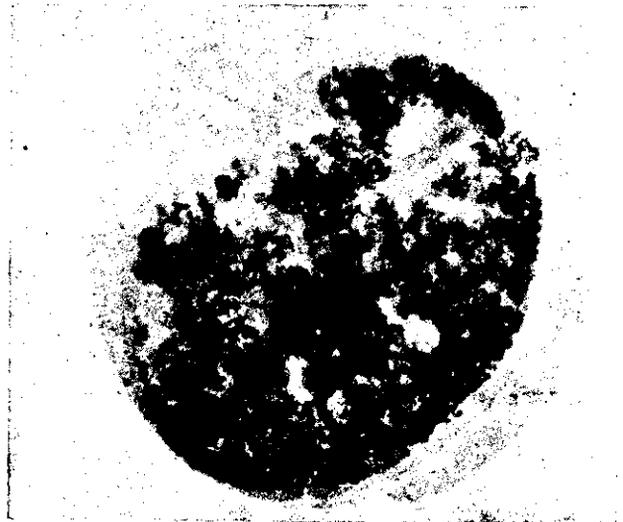


FIG. 17. - Lisi spontanea nell'invecchiamento di un fotobatterio (Cocco-bacillus Pierantoni).

(16) BOASSON, « Bacteriolysis by Lysozyme », J. of Imm., 39, 281 (1938).

contenuto cellulare; si tratterebbe di una reazione di superficie. Non condividiamo peraltro l'opinione che manchi un rigonfiamento del corpo batterico (già trovato da Kigasawa) e che Boasson attribuisce solamente all'effetto meccanico dell'appiattimento del germe del preparato.

RIASSUNTO

Gli AA. studiano, servendosi del supermicroscopio elettronico, l'azione del lysozym lacrimale su alcuni cocci dell'aria, e descrivono i successivi aspetti morfologici di questo tipo di lisi.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di fisica e di batteriologia.