

27. Luciano VELLA e Alfredo ZAMPIERI. — Il fenomeno dell'anello di Nicolle studiato su alcuni fagi ad azione antimicobatterica.

Riassunto. — Alcune sostanze chimiche hanno azione inattivante la lisi fagica. Con la tecnica di Nicolle si può facilmente valutare qualitativamente l'azione di queste sostanze. Sulla base di questa nuova tecnica è stato compiuto lo studio di una serie di sostanze chimiche che inattivano la lisi di ceppi di batteriofagi attivi sui micobatteri.

Résumé. — Certaines substances chimiques exercent une action d'inhibition sur l'activité lytique des bactériophages. Par la technique de Nicolle il est facile d'évaluer qualitativement l'action de ces substances. Sur la base de cette nouvelle technique, on a étudié une série de substances chimiques qui inactivent des bactériophages ayant une action lytique sur des mycobactéries.

Summary. — Some chemical substances have an action which inhibits the lysis by bacteriophages. By Nicolle's technique it is easy to make a qualitative evaluation of the action of these substances. On the basis of this new technique, a study has been made of a series of chemical compounds inhibiting the lysis by bacteriophages active on mycobacteria.

Zusammenfassung. — Einige chemische Stoffe haben eine die Phagolyse inaktivierende Wirkung. Mit der Technik kann man die qualitative Wirkung dieser Substanzen leicht schätzen. Auf Grund dieser neuen Technik ist eine Reihe chemischer Substanzen beobachtet worden, die die Lyse von auf Micobakterien aktiven Bakteriophagenstämmen, inaktivieren.

Recentemente Nicolle (1947), studiando il comportamento del batteriofago di fronte agli antisettici, descriveva un metodo per valutare rapidamente l'azione delle sostanze inibenti la lisi fagica.

Tale azione inibente era da tempo nota.

Krueger e Baldwin (1934) studiarono l'azione del bicloruro di mercurio al 2,8% sul batteriofago antistafilococcico e quella (1935) dell'a safranina.

Guller (1935) esaminò il comportamento dell'acido fenico sul fago anti-dissenterico e antitifico e notò come il primo venisse inattivato da una diluizione del 4 % in 30 minuti primi, mentre il secondo conservasse la propria attività anche dopo un'ora di esposizione a tale soluzione.

Lominski (1939) inattivò il fago con sostanze ossidanti (permanganato di potassio, jodio, acqua ossigenata, ozono) ottenendo successivamente la sua riattivazione trattandolo con sostanze riducenti, tra le quali l'acido ascorbico, che a sua volta, a titoli poco più alti, può avere azione inattivante (1936).

Levaditi, Haber e Hornus (1934) descrissero l'azione inibente della gonacrina sull'attività dei fagi.

Burnet e collaboratori (1935 e 1937) inattivarono i vari fagi antistafilococcici (Au 2, Au 3, Au 4, Au 12, D e beta H) aggiungendo bleu di metilene diluito 1: 25,000 ed esponendo la sospensione a una sorgente luminosa di 100 candele per 30 minuti primi. Gli stessi autori dimostrarono l'azione inattivante dell'urea al 27 % e del citrato di sodio all'1,5 % cercando di applicare il criterio della inattivazione fagica ai fini della classificazione. (citato dal Bergey 1948).

Kreuger e Strietmann (1938) studiarono le modifiche subite dal fago in presenza di solfato di sodio M/8, e notarono un aumento del tempo di lisi, un rallentamento nella produzione del fago con conseguente aumento della quantità di fago necessaria per ottenere la lisi microbica.

Kliger, Olenik e Czazkes (1943) descrissero un metodo per l'isolamento di shigelle dalle feci inattivando il fago, quasi sempre presente, con formaldeide all'1:10.000. A tale diluizione la formaldeide non avrebbe alcun effetto sullo sviluppo del germe.

Fitzgerald e Babbitt (1946) hanno dimostrato l'azione inibente degli acridinici. Guelin (1947) infine, ha descritto l'azione inattivante dei polisaccaridi, ed in particolare della destrina, sulla lisi fagica.

La tecnica di Nicolle è ispirata, grosso modo, ai metodi auxanografici di Beijerinck (1889) per la valutazione dei metaboliti necessari ai microbi. Il metodo consiste nel seminare una piastra di agar con una emulsione del germe e del relativo batteriofago mescolati in modo da ottenere, dosando opportunamente fago e germe, una lisi completa del germe ospite. Su questo agar si aggiungono quindi le sostanze in esame.

In base al comportamento delle varie sostanze si avranno le seguenti possibilità:

- 1) La sostanza inibisce completamente il fago, ma lascia indenne il germe; si avrà allora un'area di sviluppo circoscritta attorno al punto ove la sostanza è stata deposta.

- 2) La sostanza è attiva a dosi forti anche sul germe e a dosi piccole soltanto sul fago; la zona di inibizione della lisi fagica assumerà allora una forma anulare, corrispondente a quella zona in cui la sostanza, filtrando e diluendosi attraverso il terreno, è insufficiente ad inibire la moltiplica-

zione del germe, ma sufficiente a bloccare l'azione del fago (anello di Nicolle).

3) La sostanza è inattiva sia sul fago che sul germe; si avrà allora lisi completa come sui controlli.

Da queste tre possibilità di risultati si può facilmente comprendere come il metodo di Nicolle sia realmente utile e pratico per valutare qualita-



Anello di Nicolle su ceppo di *Mycobacterium smegmatis* e *Phagus smegmatis*, con acido citrico al 10 %.

tivamente e in breve tempo l'azione delle varie sostanze inibenti l'attività di un fago.

Sulla base di questa nuova tecnica noi abbiamo compiuto una serie di ricerche su alcune sostanze chimiche inattivanti la lisi dei seguenti fagi antimicobatterici: *Phagus phlei*, *Phagus lacticola*, *Phagus pellegrini*, *Phagus smegmatis* (P. e O. 1949).

Riferiamo qui sui risultati ottenuti con l'acido ossalico, il bleu di metilene, l'acido citrico, l'acido picrico e l'urea.

L'acido ossalico al 10 % determina il fenomeno di Nicolle molto netto con tutti i fagi presi in esame.

Il bleu di metilene impiegato alla diluizione di 1:10.000 produce l'anello di Nicolle col *Phagus phlei*, col *Phagus lacticola*, col *Phagus pellegrini*, mentre ha una azione molto meno evidente col *Phagus smegmatis*.

L'acido citrico nella diluizione del 10 % determina un netto anello di Nicolle col *Phagus phlei*, col *Phagus lacticola* e col *Phagus smegmatis*, mentre non dà nulla col *Phagus pellegrini*.

L'acido picrico al 10 % dà il fenomeno di Nicolle solo col *Phagus pellegrini*, mentre non lo dà col *Phagus phlei*, col *Phagus lacticola* e col *Phagus smegmatis*.

L'urea usata alla diluizione del 10% non ha alcun effetto sui quattro fagi studiati.

I risultati che abbiamo ottenuti sono riassunti nella tabella che riportiamo,

TABELLA n. 1

	acido ossalico 10%	bleu di metilene 1:10.000	Acido citrico 10%	Acido picrico 10%	Urea 10%
<i>Phagus phlei</i>	A	A	A	—	—
<i>Phagus lacticola</i>	A	A	A	—	—
<i>Phagus pellegrini</i>	A	A	—	A	—
<i>Phagus smegmatis</i>	A	(A)	A	—	—

A - Anello di Nicolle.

Concludendo, possiamo affermare che il metodo di Nicolle può costituire un ottimo mezzo per la rapida valutazione qualitativa delle sostanze inibenti la lisi batteriofagica, il che ha un notevole interesse potendo, le sostanze chimiche inattivanti i fagi, avere applicazioni pratiche sia in laboratorio per purificare ceppi lisogeni ed isolare germi da ambiente inquinato da fagi, sia nel campo industriale per proteggere le culture microbiche dell'azione fagica.

BIBLIOGRAFIA

- BEIJERINCK M. W., L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. - Arch. néerl. sc. ex. et nat. 23, 367, (1889).
- BROFENBRENNER J. e HELTER D. M., Effect of urca upon activity of bacteriophage. - Proceed. Exper. Biol. and. Med. 30, 1308 (1933).
- BURNET F. M., KEOG F. V. e LUSH D., The immunological reaction of the filterable viruses. - Australian J. Exper. Biol. 15, 227 (1937).
- BURNET F. M. e LUSH D., The staphylococcal bacteriophage. - J. Path. and Bact. 40, 455 (1935).
- GULLER W., Verhalten verschiedener Bakteriophagen gegenüber chemischen und physikalischen Eiwirkungen. - Zeitschr. f. Immunitätsf. 86, 284 (1935).
- KLIGLER S. J., OLENIK E. e CZAZKES I., Improved tecnie for isolation of dysentery bacteria. - Am. J. Publ. Health, 33, 682 (1943).
- GUELIN A., Inactivation du bactériophage par la dextriane. - Ann. Inst. Past. 73, 1032 (1947).
- FITZGERALD R. J. e BABBIT E., Studies of bacterial viruses. - The effect of certain compounds on the lysis of *Esch. Coli* by bacteriophage. - J. Immunol. 72, 121 (1946).
- KRUEGER A. P. e BALDWIN D. M., The reversible inactivation of bacteriophage by bicloride of mercury. - J. Gen. Physiol. 17, 499 (1934).
- KRUEGER A. P. e BALDWIN D. M., The reversible inactivation of bacteriophage with safranine. - J. Infect. Dis. 57, 207, (1935).
- KRUEGER A. P. e STRIETMANN W. L., Effect of sodium sulfate on the phage-bacterium reaction. - J. Gen. Physiol. 22, 131 (1938).
- KRUEGER A. P. e WEST H. S., The accelerating effect of manous jons on the phage action. - J. Gen. Physiol. 19, 75 (1935).
- LEVADITI C., HABER P. e HORNUS G., Etudes des rapports entre les bactéries, les ultravirus, les bactériophages, les toxines, les enzymes au moyen de l'action exercée in vitro par la gonacrine. - Bull. Acad. Méd. 112, 572 (1934).
- LOMINSKI I., Inactivation du bactériophage par oxidaxion. - C. R. Soc. Biol. 119, 952 (1935).
- LOMINSKI I., Inactivation du bactériophage par oxidaxion. Réactivation par l'acid ascorbic. - C. R. Soc. Biol. 119, 1345 (1935).
- NICOLLE P., Empêchement de la bactér ophagie par un antiseptique: phénomène de l'anneau de colonies intactes en milieu contaminé par le bactériophage. - Ann. Inst. Past. 73, 705 (1947).
- NICOLLE P. e MIMICA M., Bactériophages et antiseptiques. Analyse du phénomène de l'anneau de culture. - Ann. Inst. Past. 73, 1072 (1947).
- PENSO B. e ORTALI V., Studi e ricerche sui micobatteri. Nota II - I Fagi dei micobatteri. - Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità, 21, 903 (1949).
-