

47. Brenno BABUDIERI - Azione probiotica e antibiotica di alcuni cocchi sul bacillo di Loeffler.

Tutti coloro che per lungo tempo hanno preparato anatosina difterica partendo dal terreno più abitualmente usato per questo scopo: quello di Loiseau e Philippe (1), conoscono per propria esperienza come la resa della tossina non sia sempre costante, anche a prescindere da eventuali mutazioni e variazioni del ceppo di B. di Loeffler usato e dalla sua crescita prevalente in superficie o in profondità.

Capita di tanto in tanto di imbattersi in una partita di brodo che pur essendo stata preparata con la tecnica abituale e non differendo apparentemente dalla norma, permette soltanto una crescita scarsa del B. di Loeffler e dà un contenuto di tossina assolutamente insufficiente agli scopi pratici.

Non mi consta che tale comportamento sia stato oggetto di particolari indagini.

Il punto di partenza delle mie ricerche che si sono iniziate 6 anni or sono, è stato dato da un'osservazione casuale. Nel novembre del 1940 una serie di bottiglie di Roux che avevo seminato con ceppo tossigeno di bacillo difterico, m'aveva dato una resa piuttosto scarsa di tossina. Le flocculazioni davano infatti per le

(1) Si preparano a parte:

1) *Peptone*: Si lavano, sgrassano e trituranò 350 gr. di stomaco di maiale. Vi si aggiunge 1 litro d'acqua di fonte e 10 cm³ di HCl (d = 1,19). Si tiene a bagnomaria a 45°-48° per 24 ore. Si arresta la digestione portando l'infuso rapidamente a 80° e mantenendolo a tale temperatura per 40'-50'. Si raffredda rapidamente sotto getto d'acqua e si decanta per due volte, dopo 2½ e dopo 4½ dì. Quindi si porta il pH a 7,2-7,4; si porta a bagnomaria a temperatura di poco inferiore ai 100°, finchè si forma un precipitato a grossi fiocchi. Quindi si filtra per carta.

2) *Infuso di vitello*: 600 gr. di carne di vitello da latte viene tritata e messa in infuso a freddo, per 24 ore, in 1 litro d'acqua di fonte. Quindi si scalda a 90° e si filtra.

Preparazione del brodo: 2 parti di peptone si aggiungono a 1 parte d'infuso. Il pH si porta a 8,2. Si scalda a bagnomaria a 92°, si filtra a caldo e se ne distribuiscono 500 cc. per ogni pallone da 2 litri.

In ogni pallone si versano 10 cm³ d'una soluzione acquosa di acetato di sodio al 50 %.

Si sterilizza per 20' a 112°. Si aggiunge il 2 % di glucosio ed il 6 % di maltosio, preparati a parte in soluzione e sterilizzati a 110°.

varie Roux valori che oscillavano tra le 25 e le 30 U. A. Ne facevano eccezione due sole bottiglie, una delle quali flocculava a 35 U. A., l'altra a 42. Ambedue tali bottiglie, pur mostrando una abbondante crescita del *B. Loeffler*, risultavano accidentalmente inquinate da cocci. Dalla prima di queste (N. 21) ho isolato uno stafilococco che ho contrassegnato col numero 21, e della seconda (N. 27) due germi diversi: una sarcina (ceppo 27 S) e un diplococco (ceppo 27 D).

Era presumibile che la maggiore resa offerta da queste due bottiglie fosse in rapporto con la presenza di questi germi d'inquinamento, e quando l'esperimento confermò questa ipotesi, mi parve interessante studiare più a fondo questo argomento.

CARATTERI DEI GERMI ISOLATI

Ceppo 21. — Si tratta di uno stafilococco che cresce bene nei comuni terreni. Su agar dà colonie umide, rilevate, lisce, lucenti, di colorito bianco giallastro. Su agar-zuccheri il colorito è decisamente giallo-oro. In brodo dà intorbidamento e formazione di un abbondante sedimento biancastro. Alle volte mostra tendenza a formare un vero velo in superficie. E' aerobio. Non fluidifica la gelatina. Fermenta il glucosio ed il maltosio, senza sviluppo di gas.

Ceppo 27 S. — E' una sarcina gialla, costituita da elementi di grandezza disuguale, in cui prevalgono però le forme di grosse dimensioni.

In agar dà colonie grandi, rotonde, rilevate, ombellicate, lisce. Sull'agar-zuccheri le colonie sono più chiare, quasi bianche.

In brodo, anche zuccherato, cresce molto scarsamente, senza intorbidamento, ma formando solo uno scarso sedimento granulare.

E' aerobio. Fluidifica la gelatina. Non fermenta il maltosio e solo lentamente e dopo lungo tempo il glucosio, senza dare sviluppo di gas.

Ceppo 27 D. — E' un diplococco che dà su agar colonie bianche, lucenti, lisce, rilevate. In brodo dà scarso intorbidamento e formazione di abbondante sedimento. Questi caratteri si conservano anche nei terreni zuccherati.

E' aerobio. Non fluidifica la gelatina. Fermenta il glucosio ed il maltosio, senza sviluppo di gas.

L'attività fermentativa dei tre ceppi si può dedurre anche dalla rapidità con cui essi modificano il pH del terreno di Loiseau e Philippe che, come è noto, contiene glucosio e maltosio.

	pH di partenza	dopo 3 dì	dopo 7 dì	dopo 10 dì
21	8	6,6	5,7	5,6
27 S	8	7,9	7,8	7,6
27 D	8	5,5	5,5	5,5

In brodo non zuccherato i 3 ceppi non modificano invece per nulla il pH.

INFLUENZA DEI TRE CEPPI SULLA PRODUZIONE DI TOSSINA DIFTERICA

Dopo essermi accertato che i tre ceppi isolati seminati da soli nel terreno di Loiseau e Philippe non davano a questo la capacità di flocculare in presenza di siero antidifterico, dimostrando così che il più alto valore flocculante delle culture inquinate era dovuto ad un reale aumento della produzione di tossina difterica, iniziai lo studio delle modalità secondo le quali tale aumento si manifestava.

Dirò subito che dei tre germi isolati, quello che alle prove risultò avere la maggiore attività, è stato il ceppo 21; seguono il 27 D e il 27 S.

Iniziai le prime prove usando una partita di terreno Loiseau e Philippe che era pressochè incapace di dare tossina.

Distribuii tale terreno in bottiglie di Roux e le seminaì col bacillo di Loeffler. Gruppi di 4 Roux furono insemenate nello stesso tempo con uno dei tre ceppi di cocchi; in altre 4, semine dei cocchi furono eseguite dopo 24 o dopo 48 ore dalla semina del B. di Loeffler. I risultati controllati in decima giornata, furono molto dimostrativi.

	media delle U. A.
Semina con il solo B. di Loeffler	8
» con il B. di Loeffler e col ceppo 21	25
» » » » 27 D	20

							media delle U. A.
Semina con il B. di Loeffler e col ceppo	27 S						15
» » » »	27 D (dopo	24	ore)				35
» » » »	27 D »	48	»				20
» » » »	27 S »	24	»				35

Una prova fatta seminando prima il ceppo 27 D, e dopo 24 ore il B. di Loeffler, mostrò una crescita scarsissima di questo ultimo, e non diede produzione sensibile di tossina.

Nelle Roux invece, in cui la semina dei cocchi fu contemporanea o successiva a quella del B. di Loeffler, quest'ultimo germe si sviluppò più rapidamente e rigogliosamente che nei controlli.

Anche la produzione di pigmento, da parte di questo germe, fu più abbondante (1).

Una prova ripetuta con una partita di brodo di Loiseau e Philippe che di per sè dava una buona produzione di tossina (32 U. A.) dimostrò che in tale caso l'aggiunta dei cocchi non ne aumentava la produzione. Risultava cioè fin dalle prime prove che i tre ceppi di cocchi avevano la facoltà di favorire la crescita e l'attività tossigena del bacillo di Loeffler soltanto fino ad un certo massimo, che il bacillo di Loeffler da solo era capace di raggiungere in alcune partite di terreno, non in altre.

Si trattava ora di vedere se l'azione dei cocchi fosse legata alla presenza dei loro corpi batterici e non piuttosto a quella di un loro prodotto metabolico.

A questo scopo allestii con un'altra partita di terreno di Loiseau e Philippe una nuova esperienza, aggiungendo a questo, invece dei germi, il filtrato di una loro abbondante cultura. Il filtrato fu aggiunto nelle varie Roux in proporzioni che variavano dal 0,6 al 13%.

Le medie dei risultati ottenuti furono le seguenti:

Semine con il solo B. di Loeffler:	27,17 U. A. $\pm$ 0,948
Semine del B. di Loeffler + filtrato del ceppo 21:	34,4 U. A. $\pm$ 0,625
Semine del B. di Loeffler + filtrato del ceppo 27 D:	35 U. A. $\pm$ 3,41
Id. id. 27 S	32,5 U. A. $\pm$ 3,41
Semine del B. di Loeffler + semine dei ceppi 27 D e 27 S (dopo 24 e 48 ore):	31,2 U. A.

(1) Il momento più favorevole per la semina dei cocchi sembra essere quello di 24-36 ore dopo la semina del bacillo di Loeffler; una semina troppo

Da queste prove e da numerose altre che confermarono tali risultati, si può dedurre che l'aggiunta del filtrato dei germi favorisce la produzione di tossina difterica ancor maggiormente che la semina diretta dei cocchi.

Con prove successive determinai che l'optimum d'attività si ha con l'aggiunta di circa il 13% di filtrato al brodo. Dosi maggiori non aumentano il vantaggio. Ciò risulta chiaro dai seguenti risultati:

							media delle U. A.
terreno senza filtrato							8
terreno +	1,3 %	di filtrato	del ceppo	21			10,5
» +	3,3 %	»	»	»	»	»	12
» +	6,7 %	»	»	»	»	»	17,7
» +	10,0 %	»	»	»	»	»	18,2
» +	13,3 %	»	»	»	»	»	28,7
» +	16,7 %	»	»	»	»	»	24
» +	20,0 %	»	»	»	»	»	23,5
» +	26,7 %	»	»	»	»	»	28,5
» +	33,3 %	»	»	»	»	»	28

L'attività del filtrato non viene distrutta dal calore; essa permane inalterata anche se il filtrato viene portato per mezz'ora a mezza atmosfera. Ciò permette di usufruire in pratica del potere attivante dei metaboliti dei cocchi, pur evitando la noiosa operazione della filtrazione delle loro brodo-culture. Si può infatti o aggiungere semplicemente al terreno di Loiseau e Philippe non ancora sterilizzato una brodo-cultura vivente dei cocchi e sterilizzare quindi il terreno, o anche insemenzare direttamente il terreno di Loiseau e Philippe con un cocco, e sterilizzare in autoclave, dopo aver permesso al cocco di svilupparsi per 12-24 ore.

Infatti il minor potere di attività dimostrato dalle culture dei cocchi rispetto ai loro filtrati, non è dovuto alla presenza dei corpi batterici come tali, ma soltanto alla circostanza della loro vitalità.

D'altra parte che l'attività sia dovuta a un prodotto metabolico dei cocchi e non sia legata direttamente al corpo dei microrganismi, è provato anche dalla circostanza che l'aggiunta al brodo di cocchi uccisi al calore e lavati, non esercita alcuna azione favorevole sul bacillo di Loeffler.

precoce danneggia lo sviluppo di questo germe; una troppo tardiva permette uno sviluppo insufficiente del cocco, per quanto anche dopo 60-84 ore, si ottengono discreti risultati.

Ho voluto vedere se l'azione favorente lo sviluppo del B. di Loeffler fosse caratteristica diffusa fra i microorganismi, specie tra quelli provvisti di intensa attività fermentativa, o se fosse invece limitata a pochi ceppi, quali quelli da me isolati. Ho saggiato a questo scopo, secondo gli schemi sopra esposti, numerosi ceppi di cocchi, di bacilli, di blastomiceti e di ifomiceti.

Ho visto così che anche qualche altro germe ha una certa azione favorente, scarsa però e non comparabile a quella dei tre ceppi da me primamente isolati. Anche i blastomiceti saggiati, per quanto dotati di intensa attività biochimica, danno soltanto uno scarso aumento dell'attività tossigena del bacillo di Loeffler.

Si deve ancora ricordare che non in tutti i casi un brodo Loiseau-Philippe che non risponda può essere reso attivo dall'aggiunta dei cocchi e dei loro filtrati; vi sono alcune partite che non ne risentono alcun beneficio o soltanto uno alquanto scarso.

Ricorderò ancora che per ottenere i filtrati, ho coltivato per lo più i cocchi in terreno di Loiseau e Philippe dove questi germi crescono più rigogliosamente che in brodo semplice. L'attività del loro filtrato non scema per nulla o di poco soltanto, se i cocchi sono coltivati in terreno di Loiseau e Philippe senza zuccheri; essa è minore invece in brodo comune glucosato, e minima in brodo comune senza zuccheri. In conclusione si può dire che l'attività dei filtrati non è legata alla presenza di idrati di carbonio nei terreni da cui sono stati ottenuti, ma che è in diretto rapporto con il rigoglio della crescita dei cocchi.

MECCANISMO D'AZIONE DEI COCCHI

Dimostrato così che nel filtrato delle culture dei tre cocchi c'è un quid che potenzia la crescita e l'attività tossigena del bacillo di Loeffler, si trattava ora di determinare attraverso quale meccanismo tale potenziamento si espliciti.

In ricerche preliminari constatai che il filtrato agisce non solo sul terreno di Loiseau e Philippe, ma anche in altri terreni zuccherati, quale il terreno di Taylor, mentre è del tutto inefficiente nel brodo comune.

Veniva logico di pensare che l'azione fosse in stretto rapporto con il metabolismo degli idrati di carbonio.

Per accertare tale ipotesi determinai giornalmente il conte-

nuto in idrati di carbonio e il pH di 4 culture di B. Loeffler in terreno di Taylor contenente il 2% di maltosio. A due delle Roux erano stati aggiunti 20 cm³. di filtrato del ceppo 21.

Terreno di Taylor semplice					Terreno di Taylor + filtrato			
giorni	Idrati di C		Idrati di C	pH	Idrati di C		Idrati di C	
	%	pH			%	pH	%	pH
I	20	7,2	20	7,2	20	7	20	7
II	17	6,3	17,2	6,4	15,9	6,7	18,9	6,9
III	15,7	6,2	15,4	6,1	14,8	6,6	14,5	6,6
IV	16,4	6,2	16,7	6,2	10,9	6,7	14,1	6,5
V	16,7	6,2	15,4	6,2	11,7	6,6	11,4	6,3
VI	16,3	6,2	16,2	6,1	9,6	6,5	9,6	6,3
VII	15,5	6,2	14,1	5,7	10,3	6,5	9,5	6,9
VIII	13,5	6,2	16,1	6	9,8	6,5	9,6	7,6
IX	13,5	6,2	15,1	6,3	9,1	6,5	7,2	7,9
X	13,8	6,2	15,3	6,3	9,6	6,5	6,4	8,3
U. A.	8		8		25		34	

In altre 4 Roux di tale partita, i valori finali in U. A. e il contenuto in idrati di C furono i seguenti:

Terreno di Taylor semplice				U. A.	idrati di C
I				8	13,5 %
II				8	14,8 %
+ filtrato (20 cm ³)	I			25	4,2 %
» (20 cm ³)	II			31	10,6 %
+ » (50 cm ³)	III			31	7,1 %
» (50 cm ³)	IV			25	7,4 %

Un'altra prova eseguita con terreno di Loiseau e Philippe discretamente buono, ma sensibile all'azione dei filtrati, diede i seguenti risultati finali:

Terreno di Loiseau e Philippe semplice				U. A.	pH	idrati di C
I				22	9,2	3,01 %
II				22	9,2	3,01 %
+ filtrato	I			35	9,3	1,86 %
»	II			35	9,4	1,89 %

Da questi risultati appare evidente che il meccanismo d'azione dei filtrati consiste nel favorire una più rapida e più completa utilizzazione degli idrati di C da parte del bacillo di Loeffler, utilizzazione che, come è noto, è indispensabile a questo germe per la produzione di una buona tossina.

Si deve però rilevare che il valore della tossina ottenuta non è sempre esattamente proporzionale all'avvenuta utilizzazione degli idrati di carbonio. Per quanto risulti chiaro che nei terreni aggiunti di filtrato questa avvenga in una misura notevolmente maggiore che nei controlli, pure si vede che in qualche caso ad un residuo più basso fa riscontro un valore di tossina meno elevato che in altri casi.

Ciò avviene in quei casi in cui manca il caratteristico aumento finale del valore del pH.

Questa proprietà di alcuni cocchi di favorire il metabolismo degli idrati di carbonio, non sembra esplicarsi nel riguardo di tutti i microorganismi; ad esempio essa manca rispetto a *Penicillium notatum*.

AZIONE DEI COCCHI E FATTORI DI CRESCITA DEL BACILLO DI LOEFFLER

Si trattava ora di indagare, per quanto possibile, la natura delle sostanze prodotte dai tre cocchi, capaci di favorire il metabolismo degli idrati di carbonio da parte del bacillo di Loeffler. E' presumibile che tali sostanze siano comuni a tutti e tre i ceppi, e infatti l'aggiunta al brodo dei filtrati di due o tre cocchi insieme non dà un risultato migliore di quello dato da una sufficiente quantità di filtrato di un cocco solo, e precisamente di quello più attivo. Questa sostanza ha le caratteristiche di una vitamina e si può considerare come uno dei « fattori di crescita » del bacillo di Loeffler, beninteso qualora non si dia a questo termine il significato eccessivamente restrittivo che gli attribuisce Lwoff (1).

Avendo osservato che alcuni lieviti, veri magazzini di vitamine, esercitavano sulla crescita del bacillo difterico un'azione simile, per quanto meno intensa, di quella esercitata dai tre cocchi, fui indotto a studiare l'azione delle singole vitamine contenute nel lievito. Dopo varie prove negative, mi soffermai sull'acido nicotinic e sulla sua amide che, aggiunti nella dose di 1.4 mgr. % al brodo di Loiseau e Philippe, esercitano un'azione press'a poco pari come tipo e intensità, a quella esercitata dai cocchi.

Anche l'azione dell'acido nicotinico si manifesta attraverso ad una più completa utilizzazione degli idrati di carbonio da parte

del bacillo di Loeffler, come risulta bene dai seguenti dati finali (X giornata):

			idrati di carbonio	pH	U. A.
			residui		
brodo Loiseau-Philippe semplice			3,01 ‰	9,2	22
»	»	»	3,01 ‰	9,2	22
»	»	+ ceppo 21	1,86 ‰	9,3	35
»	»	»	1,89 ‰	9,4	35
»	»	+ ac. nicotinic (1,4 mgr.%)	2,24 ‰	9,5	32
»	»	»	2,41 ‰	9,4	35
»	»	»	2,41 ‰	9,4	35

La quantità minima di acido nicotinic che dà il massimo effetto, s'aggira su 3 mgr. per litro di terreno; dosi maggiori non sono nocive.

La miscela filtrato di cocchi-acido nicotinic non ha un'azione maggiore di quella del suo componente più attivo.

Questa circostanza e il fatto che non mi sono mai imbattuto in un terreno che risentisse l'azione dell'acido nicotinic e non quella del filtrato, o viceversa, m'hanno indotto a pensare che l'azione dei cocchi non sia dovuta ad altro se non al fatto che essi

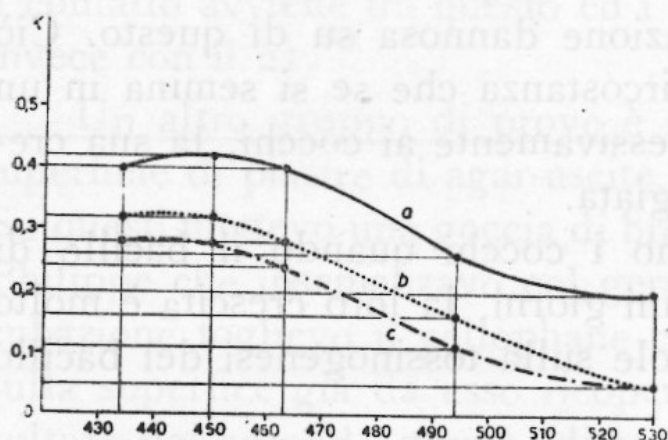


Fig. I

Ascisse: lunghezza d'onda (in mμ).

Ordinate: coefficiente d'estinzione.

a) 0,25 cm³ di amide nicotinic in soluzione al ‰ portati a 10 cm³ con i reattivi;

b) 2 cm³ di brodo-filtrato del ceppo 21, portati a 10 cm³ con i reattivi;

c) 2 cm³ di brodo comune, portato a 10 cm³ con i reattivi.

sarebbero capaci di sintetizzare l'acido nicotinic nei terreni di cultura.

Ricerche successive m'hanno però obbligato ad abbandonare questa ipotesi. Ho dosato infatti, con il metodo di Swaminatham (2), standardizzato da Shaw e Macdonald (3), usando il colorimetro di Pulfrich (filtro n. 11) l'acido nicotinic contenuto in varie partite di terreni di Ramon e di Taylor, che risentivano molto dell'aggiunta di acido nicotinic, prima e dopo averli insemenzati con i cocchi. Non notai in essi alcun apprezzabile aumento nel

contenuto d'acido nicotinico dopo la crescita dei germi (fig. 1). La quantità di Vitamina P contenuta in ogni caso, confrontata con soluzioni campioni di acido nicotinico, s'aggrò sui $4-8 \cdot 10^{-4}$.

Tali risultati furono confermati dalla determinazione biologica dell'acido nicotinico, secondo il metodo di Fildes (4), usando il *Proteus*, germe per il quale, come è noto, l'acido nicotinico costituisce un fattore indispensabile di crescita.

Si deve quindi ritenere che la sostanza prodotta dai cocchi da me studiati, pur essendo biologicamente molto affine all'acido nicotinico e alla sua amide, non si possa però identificare con questi. La determinazione della sua natura richiede ulteriori indagini.

RAPPORTI RECIPROCI FRA COCCHI

E B. DI LOEFFLER

Un punto restava ancora da studiarsi: quello dei rapporti reciproci tra bacillo di Loeffler e i cocchi da me studiati. Mentre da una parte i cocchi producono un fattore che favorisce la crescita del bacillo difterico, d'altra parte e in particolari condizioni, la loro crescita esercita anche un'azione dannosa su di questo. Ciò è dimostrato ad esempio dalla circostanza che se si semina in un brodo il bacillo di Loeffler successivamente ai cocchi, la sua crescita ne è notevolmente danneggiata.

D'altra parte se si seminano i cocchi quando il bacillo di Loeffler ha uno sviluppo di alcuni giorni, la loro crescita è molto limitata e la loro azione favorevole sulla tossinogenesi del bacillo di Loeffler è nulla o quasi.

Esistono certamente fra cocchi e bacillo rapporti complessi e in parte contrastanti, che mi parve interessante studiare più a fondo.

A questo scopo ho usato piastre di agar-ascite-germi, che incubavo per 36 ore fino ad ottenere un abbondante sviluppo dei germi incorporati nell'agar. Dopo di che versavo sulla superficie dell'agar una goccia di una sospensione in brodo (per i cocchi) o in terreno di Ramon (per il difterico) del germe che volevo studiare e rimettevo la piastra in termostato per altre 60 ore.

I risultati ottenuti nelle numerose prove eseguite, furono i seguenti: sull'agar incorporante il bacillo di Loeffler, il ceppo 27 S

ha uno sviluppo pressochè nullo, il 21 ne ha uno molto scarso, il 27 D uno un po' maggiore, ma sempre più scarso che nei controlli.

D'altra parte sull'agar-germi-ceppo 21, il bacillo di Loeffler non cresce assolutamente, e sull'agar-germi-27 D o 27 S la crescita è scarsissima.

Sull'agar-tossina difterica (5 cc. di tossina filtrata per 15 cc. di agar) i tre cocchi crescono rigogliosamente; i due ceppi 27 D e 27 S però un po' meno abbondantemente che nei controlli.

A questo proposito ricordo che già Zoeller (5) aveva notato che lo streptococco, come anche altri germi, crescono un po' meno rigogliosamente nell'anatossina difterica, che nel terreno di controllo.

Se sulla stessa piastra di agar-ascite si seminano contemporaneamente il bacillo di Loeffler ed i cocchi, le colonie si sviluppano fino a venire a contatto, e senza dimostrare una reciproca evidente azione di inibizione o di favoreggiamento.

Però mentre il difterico venuto a contatto con i ceppi 27 D e 27 S sovrappone l'orlo della sua patina a questi, col 21 ciò non avviene. Se i cocchi sono seminati tre giorni prima del difterico, il contatto avviene tra questo ed i ceppi 27 D e 27 S, non avviene invece con il 21.

Un altro gruppo di prove è stato eseguito distendendo sulla superficie di piastre di agar-ascite, quadratini di cellophane sterili. Su questi mettevo una goccia di brodo semplice o di brodo Loiseau-Philippe che insemenzavo col germe in esame. Dopo 48 ore d'incubazione toglievo il cellophane con la cultura, e lasciavo cadere sulla superficie già da esso ricoperta, una grossa goccia di brodo-cultura del secondo germe, distendendola poi con una spatola, sì che debordasse dall'area già ricoperta dal cellophane. Controlli venivano naturalmente eseguiti su piastre coperte da cellophane senza culture sovrapposte.

Dopo 24 ore di ulteriore incubazione risulta che ad opera del bacillo di Loeffler il 27 S e il 21 non subiscono alcuna inibizione e il 27 D soltanto una scarsa. Lo stesso s'osserva dopo 48 ore di incubazione.

D'altra parte il bacillo difterico subisce una netta inibizione ad opera del 27 D e del 21, una lieve ad opera del 27 S. Se invece che dopo 48 ore, il cellophane è stato allontanato dopo 24

ore, allora l'inibizione è completa soltanto ad opera del ceppo 21, è parziale ad opera del 27 D, è nulla ad opera del 27 S.

L'esistenza di una azione inibente da parte di certi cocchi sul bacillo di Loeffler non è del resto una novità. E' stata osservata per la prima volta, in vivo, già nel 1909 da Schioetz (6), un medico danese che ne tentò anche applicazioni pratiche, nella terapia della difterite, con scarso successo però. Più tardi, nel 1932, Dujardin e Beaumetz (7) osservarono anche in vitro tale antagonismo.

Queste inibizioni non sono certamente dovute a modificazioni banali del pH del terreno, che, come ho potuto controllare, si modifica soltanto in lieve grado.

Da queste ricerche si può dedurre che il bacillo di Loeffler esercita con la sua crescita un'azione inibente di grado più o meno rilevante, sui cocchi. Tale azione è legata alla presenza dei corpi batterici viventi (agar-germi, brodo) ed è forse dovuta a fenomeni di concorrenza vitale e di sottrazione di sostanze nutritive da parte del bacillo di Loeffler; soltanto in minima misura essa è dovuta ad una vera azione antibiotica del bacillo difterico, come sarebbe dimostrato dalla scarsa azione esercitata dal suo brodo filtrato.

D'altra parte la molto più evidente azione inibente esercitata dai cocchi sulla crescita del bacillo difterico, sembra dovuta in buona parte non già ad un'azione di concorrenza vitale, bensì alla produzione di una vera sostanza antibiotica, presente nel filtrato e capace di attraversare il foglio di cellophane.

Come si concilia quest'azione inibente con quella favorente, studiata più sopra? Non è facile stabilirlo. E' da poco che la scienza è entrata nel campo delle sostanze d'origine microbica che impediscono o favoriscono la vita. Come per le prime è stato creato il termine di antibiotici, così per le seconde vorrei coniare il nome di probiotici: questi e quelli sono metaboliti microbici, filtrabili, ma ad azione biologica contraria *). Ma non è detto che alle volte essi non possano anche confondersi tra loro; lo farebbero tra

(*) Un esempio tipico di probiosi ci è offerto dalla nota azione di alcuni cocchi saprofiti favorenti la crescita di *Haemophilus influenzae*. D'ordine diverso è invece l'azione di alcuni germi (*B. subtilis*), attivi consumatori d'ossigeno, e capaci perciò di favorire in cultura lo sviluppo di anaerobi, e del pari a fenomeni d'altra natura è secondo ogni probabilità da attribuirsi la più rigogliosa crescita di alcuni microorganismi, se messi in contatto con lisati della stessa specie batterica o di specie affini, fenomeno su cui sono ritornati di recente Challinor (8) per *Penicillium notatum* e Previtera e Bongiorno (9) per *Eberthella typhi*.

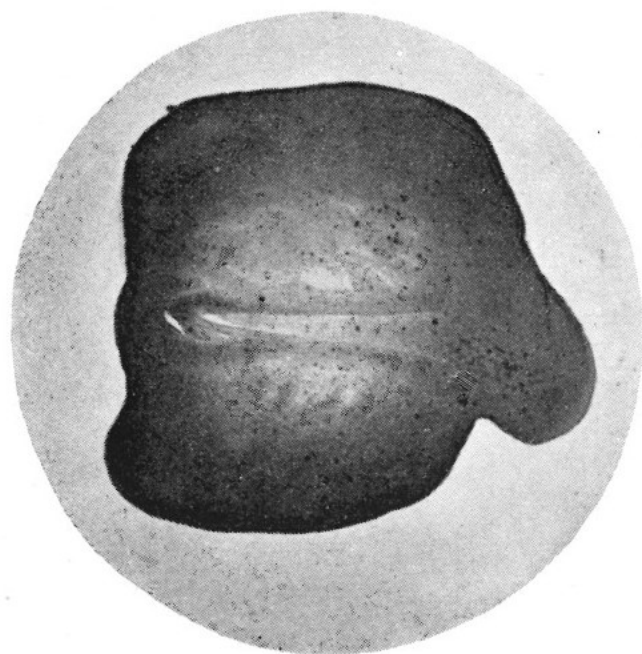


Fig. 2. — Azione antibiotica del Bacillo di Loeffler sul cocco 27 D (attraverso il cellophane).

Fig. 3. — Azione antibiotica del cocco 27 sul Bacillo di Loeffler (attraverso il cellophane).

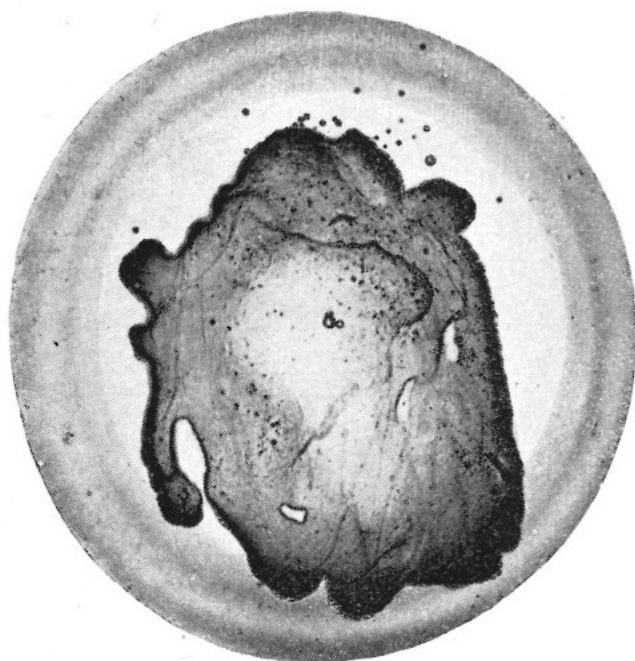


Fig. 4. — Azione antibiotica del cocco 27 S sul bacillo di Loeffler (attraverso il cellophane).

l'altro pensare quegli strani anelli di rigogliosa crescita batterica che circondano nell'agar-germi la zona d'inibizione data da una goccia di penicillina.

Bisogna qui pensare che i cocchi da me studiati siano in grado di produrre due diverse sostanze, fors'anche chimicamente imparentate tra i loro (vedi sulfamidici e ac.p-aminobenzoico), di cui l'una favorisce la crescita del bacillo difterico, probabilmente attraverso il meccanismo di una più completa utilizzazione da parte di questo degli idrati di carbonio; l'altra invece lo ostacola col meccanismo dell'antibiosi. La prima sembra predominare sulla seconda, e quindi l'aggiunta di cocchi alla cultura del B. di Loeffler esercita un'azione favorevole. Se però il cocco ha iniziato la sua crescita prima di questo, ed il suo sviluppo è stato rigoglioso ed ha già utilizzato la più parte degli idrati di carbonio contenuti nel terreno, o lo sviluppo avviene in un terreno privo di zuccheri, allora è l'azione antibiotica quella che prevale, e la crescita del bacillo difterico è ostacolata.

Ciò che ci fa pensare che tra la sostanza probiotica e quella antibiotica possa esistere una certa affinità chimica e la possibilità anche di una certa reversibilità, è l'osservazione del fatto che se noi accresciamo l'aggiunta di filtrato di cocchi al terreno di cultura oltre al limite ottimo, non abbiamo perciò una diminuzione apprezzabile nella resa in tossina difterica, mentre ci si attenderebbe che oltre ad un certo limite l'azione probiotica dovrebbe restare costante (massimo dell'utilizzazione degli idrati di carbonio) mentre l'azione antibiotica dovrebbe accrescersi, il che invece non avviene.

D'altra parte se i cocchi sono stati seminati parecchio prima del B. di Loeffler, l'azione probiotica non si manifesta più, forse anche per la già avvenuta utilizzazione parziale degli idrati di carbonio, e resta solo quella antibiotica.

Se invece la semina è contemporanea, può stabilirsi fra i due germi, grazie alle loro reciproche proprietà antibiotiche, un delicato equilibrio che permetta al B. di Loeffler di approfittare del fattore probiotico.

Queste osservazioni portano a preferire l'ipotesi della presenza nei filtrati di due sostanze, una probiotica e una antibiotica, all'ipotesi della presenza di una sostanza sola, ad azione probio-

tica se in scarsa quantità, antibiotica se presente in quantità maggiore.

Ripeto ad ogni modo che si tratta di un complesso di manifestazioni e di rapporti tutt'altro che semplici e che richiedono di essere ancora indagati.

Ricorderò infine, per il suo interesse pratico, che la tossina difterica ottenuta con l'addizione di filtrato o di acido nicotinico, è facilmente trasformabile in un'anatossina perfettamente innocua per gli animali e per l'uomo e dotata di un notevole potere immunizzante.

Perciò ho adottato da tempo, nella preparazione industriale dall'anatossina difterica, l'aggiunta di 0,002% di acido nicotinico ai terreni di cultura per il bacillo di Loeffler.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Batteriologia, 20-12-1946.

RIASSUNTO

L'A. studia i complessi rapporti di probiosi e antibiosi, intercorrenti tra tre ceppi di cocchi da lui isolati, ed il B. di Loeffler. Il filtrato di tali cocchi favorisce il metabolismo degli idrati di carbonio da parte del bacillo difterico e accresce la produzione di tossina da parte di questo. L'azione è biologicamente simile a quella esercitata dall'acido nicotinico o dalla sua amide, ma è dovuta ad un fattore diverso da questi ultimi.

RÉSUMÉ

L'A. étudie les rapports assez complexes de probiose et d'antibiose observés entre trois souches de cocci isolées par lui et le B. de Loeffler. Le filtrat de ces cocci favorise le métabolisme des hydrates de carbone effectué par le bacille diphtérique et augmente sa production de toxine. Cette action est biologiquement semblable à celle exercée par l'acide nicotinique ou par son amide, mais elle est due à un facteur différent de ceux-ci.

SUMMARY

The A. investigates the nature of the complex relations observed between three strains of cocci isolated by him, and the Loeffler's bacillus. The filtrate of these cocci favours the metabolism

of carbo-hydrates by the diphtheria bacillus and increases its toxin production. Such action is biologically similar to the one exercised by the nicotinic acid or its amide, but it is due to a factor quite different from these.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser erforscht die komplexen Verhältnisse von Fro- und Antibiosis, welche zwischen drei von ihm isolierten Kokkenstämmen und dem Löffler-Bazillus bestehen. Das Filtrat dieser Kokken fördert den Metabolismus der Kohlenhydrate von Seite des Diphtheriebazillus und erhöht die Toxinproduktion durch denselben. Die Wirkung ist biologisch der Wirkung der Nikotinsäure oder Amide ähnlich, aber sie ist an einem anderen, von diesen verschiedenen, Faktor zuzuschreiben.

BIBLIOGRAFIA

1. LWOFF A., Les Facteurs de croissance pour les microorganismes. I Congrès des Microbiol. de Langue française. Paris (1938).
2. SWAMINATHAM, Nature (1938), 141, 380.
3. SHAW G. E., MACDONALD C. A., Quart. J. of Pharmacy (1938) 11, 380.
4. FILLES P., Brit. J. exper. Pathol. (1938) 19, 239.
5. ZOELLER CHR., C. R. Soc. Biol. (1925) 92, 435.
6. SCHIOETZ A., Ugeskr, Laeg. (1909) 71, 50.
7. DUJARDIN, BEAUMETZ Ed., C. R. Soc. Biol. (1932) 110, 1210.
8. CHALLINOR S. W., Nature (1942) 150, 688.
9. PREVITERA A., BONGIARDO N., Giorn. di Batter. e Immun. (1946) 35, 181.