

50. Egidio TOSATTI — Il fattore diffusore (mucinasì) nei microrganismi in fase S ed R.

E' noto che gli estratti freschi di alcuni organi e tessuti normali e patologici di mammifero posseggono uno speciale fattore comunemente chiamato R o diffusore, capace di aumentare oltre la estensione e l'intensità delle lesioni determinate da alcuni batteri e virus anche la diffusione di svariate sostanze iniettate nel derma del coniglio (DURAN-REYNALS, MAC CLEAN, TOSATTI).

Sono stati più particolarmente impiegati a questo scopo svariati virus, alcune tossine, l'inchiostro di china, il trypanblau, il citrato di ferro ammoniacale e ferro cianuro di potassio, l'emoglobina (per quanto quest'ultima possegga un piccolo potere diffusore DURAN-REYNALS, TOSATTI e GRAZIADEI) preparati radiopachi (proposti a usati per il primo da TOSATTI e utilizzati con successo per ricerche sull'uomo e sull'animale da ROVERSI, BOLOGNA, BRUNO).

Ma gli organi e tessuti normali e patologici dei mammiferi non sono i soli a possedere il fattore R (1). Oltre che nello sperma (DURAN-REYNALS, RIZZATTI), nei globuli rossi (TOSATTI e GRAZIADEI), nella urina (TOSATTI e GRAZIADEI confermati da LUCCHETTI) questo è stato rinvenuto anche nei veleni dei serpenti, delle api, degli scorpioni, di alcuni pesci, nella testa della sanguisuga, negli estratti acquosi totali di ragni e zanzare ed infine anche in alcuni microrganismi patogeni.

Di questi ultimi che a noi più interessano sono stati studiati lo stafilococco e lo streptococco (DURAN-REYNALS, AUSTONI, PRADHAN ed' HEGEMANN), il pneumococco (MAC CLEAN), il *Cl. Welchii* (MAC CLEAN e MAADINAVEITIA), il *Cl. Chauvoei*, il *Cl. Oedematis maligni* (MAC CLEAN), il b. difterico (MAC CLEAN, GUARNA

(1) Non tutti gli organi, non tutti i veleni posseggono il fattore diffusore in eguale quantità: alcuni ne sono ricchissimi (testicolo) altri come ad es. il sistema nervoso ne sono scarsissimamente dotati. Il sangue ne sembra addirittura sprovvisto. TOSATTI e GRAZIADEI a questo proposito hanno riscontrato che solo i globuli rossi hanno capacità diffusoria e sono stati portati a sospettare che nel sangue esistano sostanze o condizioni capaci di neutralizzare il potere diffusore proprio degli eritrociti, confermati in ciò dal MALAGOLI che successivamente ha pure ammesso che il fattore R sia inattivato nel sangue.

e SCHIAVINI) e sono risultati tutti dotati di potere diffusore nel derma del coniglio.

I risultati ottenuti in proposito dai diversi Autori concordano in linea di massima, se si eccettua il fatto che secondo DURAN-REYNALS solo gli stafilococchi e gli streptococchi in fase S posseggono fattore diffusore e questo è proporzionale al loro potere patogeno mentre invece secondo AUSTONI lo stafilococco ha potere diffusore anche in fase R e non esiste alcun rapporto tra potere diffusore di questo germe e gravità dell'infezione da esso determinata.

La recente scoperta di CHAIN e DUTHIE relativa alla proprietà dell'estratto testicolare di far precipitare la viscosità di liquidi contenenti mucina la quale ha consentito a questi Autori di identificare il fattore R con un enzima da FAVILLI chiamato « mesomucinasì » capace di dissolvere la mucina (di origine mesenchimale) presente nel connettivo mi ha indotto ad eseguire una serie di ricerche atte ad indagare: 1) se lo stafilococco ha potere mucinolitico; 2) se esiste un rapporto tra eventuale attività mucinolitica dello stafilococco e stato di associazione dello stesso; 3) se esiste un rapporto tra eventuale attività mucinolitica dello stafilococco e virulenza dello stesso.

L'indagine di cui soltanto ora posso rendere noti i risultati, ideata ed iniziata nell'ormai lontano 1940, interrotta dal mio richiamo alle armi e dalla guerra, è stata condotta a termine soltanto nel marzo 1946 (1).

(1) Nel corso di questi 6 anni altri si è occupato dello stesso argomento ed è comparso proprio sul potere mucinolitico dei microrganismi addirittura una « serie » di lavori dei quali chi scrive, impossibilitato per ragioni contingenti a seguire la bibliografia, è venuto a conoscenza soltanto quando queste ricerche erano già state ultimate. Il *Cl. Welchii* secondo CHAIN e DUTHIE, MAC CLEAN ed HALE, ROBERTSON, ROPES e BAUER, il *Cl. oedematis maligni* secondo MAC CLEAN ed HALE, lo streptococco secondo MAYER e collaboratori, HIRST, MAC CLEAN, CROWLEY, il pneumococco secondo MAYER, HOBBS, CHAFFER e DAVSON, HIRST, il b. difterico secondo GUARNA e SCHIAVINI, lo stafilococco secondo GUARNA e la BERGAMINI — già confermati da SCHWABACHER e collab. — sarebbero dotati di potere mucinolitico. Il b. del tetano ed il b. del tifo (SATA) ne sarebbero invece sprovvisti. Per quanto riguarda le indagini sullo stafilococco che più interessano il presente lavoro la BERGAMINI ha inoltre osservato che esiste un netto parallelismo tra attività mucinolitica dello stafilococco e potere patogeno per il coniglio e che non esiste alcun rapporto tra fase dello stafilococco ed attività mucinolitica dello stesso.

TECNICA

Le ricerche sono state condotte complessivamente su 60 stipiti di stafilococco di cui 50 fornitimi dal Laboratorio di Batteriologia dell'Istituto di Sanità di Roma (Collezione Prof. BABUDIERI) e 10 da me isolati direttamente dall'uomo (foruncoli, ascessi, favi, ecc.). Dei 50 stafilococchi dell'Istituto Superiore di Sanità 37 erano aurei, 9 albi, 4 citrei; 39 erano in fase S, 11 in fase R.

Per la determinazione della fase mi son sempre valso, oltre che dell'apprezzamento morfologico, della prova della agglutinazione con tripaflavina secondo SABATUCCI.

Le prove sono state eseguite usando brodoculture di 24 ore, sospensioni batteriche in soluzione fisiologica clorosodica, filtrati di brodocultura.

Per la determinazione del potere mucinolitico ho usato per una prima serie di prove l'umor vitreo. Venuto a conoscenza del lavoro di ROBERTSON e coll. (1) i quali hanno dimostrato che l'umor vitreo — come tale — male si presta per queste ricerche ho provveduto a ripetere tutte le prove usando come sostrato il cordone ombelicale secondo quanto è stato riportato da FAVILLI (2).

Le sospensioni batteriche, le brodoculture e i filtrati sono sempre stati aggiunti al sostrato nella proporzione del 10 %.

Le prove sono sempre state eseguite tenendo il viscosimetro in un bagno di acqua distillata a temperatura (38°) costante, controllata da un termometro Vertex munito di relais a bulbo di mercurio.

Le letture venivano praticate prima dell'aggiunta del materiale in esperimento e dopo 2', 20', 40', 60', 180'.

Per la determinazione della virulenza degli stafilococchi (ritenendo insufficiente allo scopo lo studio dei caratteri morfologici,

(1) Per la gentilezza del Prof. G. FAVILLI che di qui sentitamente ringrazio.

(2) Si tritano 10-15 funicoli (conservati in acetone) e si estraggono con 500 cc. di acido acetico. Dopo qualche giorno la poltiglia viene spremuta, lavata con alcool ed estratta con 300 cc. di acqua distillata dopo avere aggiunto Na OH 33 % fino a lieve alcalinità. Si sprema su garza, si filtra. Si ripete ancora l'estrazione acquosa 2 volte. I 3 liquidi vengono mescolati e precipitati con 4-5 volumi di alcool che viene aggiunto fin che tutta la mucina si è separata. Questa viene raccolta con una bacchetta di vetro, essiccata nel vuoto e su cloruro di calcio quindi polverizzata in mortaio. Questa polvere, solubilissima in acqua, dà una soluzione fortemente gommosa. Una soluzione al 0,25 % in soluzione fisiologica, a 25°, ha una viscosità relativa di 7 circa rispetto all'acqua.

dell'emolisi, della coagulazione del latte e del sangue citratato, della liquefazione della gelatina, della resistenza al calore, e al carbonato di sodio, della cromogenesi, della fase di dissociazione) mi son valso dello studio del « potere dermonecrotico » (sec. AUSTONI) di 10 stafilococchi isolati direttamente da favi, foruncoli, ascessi di altrettanti pazienti. Specialmente perchè nel corso di altre prove avevo potuto constatare che lo studio del potere dermonecrotico dello stafilococco dà risultati analoghi a quelli forniti dalla indagine sul potere dermonecrotico, letale ed emolitico della tossina che, secondo AUSTONI, rappresenta il metodo più attendibile per la valutazione della patogenicità degli stafilococchi.

RISULTATI

Su 50 ceppi di stafilococco esaminati 32 si sono dimostrati dotati di potere mucinolitico.

Questo però non è esclusivo della fase S. La fase S è più frequentemente mucinolitica della R; su 39 ceppi in fase S: 29 positivi; su 11 in fase R: 3 positivi.

Come esistono stafilococchi in fase S assolutamente sprovvisti di potere mucinolitico (10 su 39) ci son stafilococchi in fase R che ne sono dotati (3 su 11).

Risultati positivi ié possono ottenere tanto impiegando le brodoculture o le sospensioni batteriche in acqua fisiologica quanto sperimentando sui filtrati. Sono però sempre assai più evidenti utilizzando le brodoculture. (Inutile dire che il brodo per cultura non ha potere mucinolitico).

Ho trovati stafilococchi albi, citrei, aurei provvisti di potere mucinolitico; ho trovati stafilococchi albi, vitrei, aurei assolutamente sprovvisti di tale potere.

I risultati ora riportati mentre (1) ci dicono che la capacità diffusoria riscontrata da DURAN-REYNALS, AUSTONI, ecc. a carico dello stafilococco è dovuta a vero potere mucinolitico, non confermano l'osservazione secondo la quale i germi in fase R sarebbero sprovvisti di potere diffusore (DURAN-REYNALS), concordano con quelli

(1) Confermano in linea di massima quelli ottenuti da GUARNA nel 1942, dalla BERGAMINI nel 1943 e da SCHWABAKER nel 1945.

di AUSTONI secondo il quale gli stafilococchi in fase R possono avere potere diffusore.

Per quanto riguarda il rapporto tra virulenza e potere mucinolitico dello stafilococco sei volte su dieci è risultato un netto parallelismo, due volte si è osservato che ad una notevole virulenza corrispondeva un lieve potere mucinolitico ed infine due stafilococchi sono risultati assolutamente sprovvisti di potere mucinolitico pur manifestando i segni di una discreta virulenza.

Questo risultato (1) mentre contrasta con quelli di AUSTONI secondo i quali non vi è alcun rapporto tra potere diffusore del germe e gravità dell'infezione, non corrisponde esattamente con quelli di DURAN-REYNALS secondo i quali l'attività diffusoria di un microrganismo è proporzionale al suo potere patogeno.

Nel corso delle ricerche ora riportate sono state eseguite alcune prove collaterali di cui riporto brevemente i risultati.

1) Ho già ricordato che dall'esame della letteratura risulta che altri microrganismi oltre allo stafilococco sarebbero dotati di potere diffusore.

Esperimentando su alcuni (quattro) ceppi di streptococco ho potuto vedere che questo germe, come lo stafilococco, può avere potere mucinolitico (2). Mentre invece non ho assolutamente potuto riscontrare tale capacità a carico di alcuni (quattro) ceppi di enterococco e di bc. di Friedländer all'uopo studiati.

2) La penicillina americana, la vivicillina preparata dal Prof. Babudieri dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma, alcuni (dieci) miceti fornitimi dal Laboratorio di Batteriologia dello stesso Istituto sono risultati assolutamente sprovvisti di potere mucinolitico.

3) La penicillina, e la vivicillina non sono capaci di modificare il potere mucinolitico degli stafilococchi che ne sono dotati.

Roma - Istituto Superiore di Sanità e Clinica chirurgica dell'Università, 13-1-1947.

(1) Conferma in linea di massima quelli ottenuti allo stesso proposito dalla BERGAMINI nel 1943.

(2) Questo risultato conferma quelli ottenuti da MAYER e coll. nel 1941, da CROWLEY nel 1944.

RIASSUNTO

L'A. che da oltre 10 anni sta occupandosi del fattore R riferisce in questo lavoro di avere riscontrato (esperimentando sopra una settantina di ceppi di microrganismi): 1) che lo stafilococco e lo streptococco possono essere dotati di potere mucinolitico; 2) che lo stafilococco può essere mucinolitico tanto nella fase S che in quella R; 3) che la fase S dello stafilococco è più frequentemente mucinolitica della R; 4) sei volte su 10 un netto parallelismo tra virulenza dello stafilococco e suo potere mucinolitico. Riporta infine i risultati ottenuti nel corso di alcune prove sperimentali collaterali sul potere mucinolitico della penicillina, della vivicillina, di una serie di miceti e sull'azione esercitata dalla penicillina e dalla vivicillina nei riguardi dell'attività mucinolitica dello stafilococco. (Dal Laboratorio di Batteriologia dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma).

RÉSUMÉ

L'Auteur, qui depuis plus de 10 ans s'occupe du facteur R, rapporte dans ce memoire qu'au cours d'une série d'expériences effectuées sur environ soixante-dix souches de micro-organismes il a constaté: 1) que le staphylocoque et le streptocoque peuvent être doués de pouvoir mucinolytique; 2) que le staphylocoque peut être mucinolytique, tant dans la phase S que dans la phase R; 3) que la phase S du staphylocoque est plus fréquemment mucinolytique que la R; 4) que six fois sur dix un net parallélisme existait entre la virulence du staphylocoque et son pouvoir mucinolytique.

L'Auteur rapporte enfin les résultats obtenus au cours de quelques recherches expérimentales parallèlement conduites sur le pouvoir mucinolytique de la penicilline, de la vivicilline et d'une série de mycètes, ainsi que sur l'action exercée par la pénicilline et la vivicilline à l'égard de l'activité mucinolytique du staphylocoque.

SUMMARY

The Author, who has been engaged for more than 10 years in studying the R factor, reports in this paper that on the basis of tests carried out on nearly seventy strains of micro-organisms he has ascertained: 1) that the staphylococcus and streptococcus may be

endowed with mucinolytic power; 2) that the staphylococcus can be mucinolytic both in the S and in the R phase; 3) that the S phase of staphylococcus is more frequently mucinolytic than the R phase; 4) that six times out of ten a clear parallelism existed between the virulence of the staphylococcus and its mucinolytic power.

The Author reports also the results obtained in the cours of various test conducted in a parallel experimental direction on the mucinolytic power of penicillin, vivicillin and a group of mycetes, as well as on the action exerced by penicillin and vivicillin relative to the mucinolytic activity of the staphylococcus.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser, der sich seit zehn Jahren mit dem Faktor R befasst, berichtet in dieser Arbeit, dass er (die Untersuchungen wurden auf circa siebzig Stämmen von Mikro-organismen gemacht) folgendes beobachtet hat: 1) Dass der Staphylokokkus und der Streptokokkus eine Mucinolytische Eigenschaft besitzen können; 2) dass der Staphylokokkus in der Phase S sowie in Phase R mucinolytisch sein kann; 3) dass die Phase S des Staphylokokkus häufiger mucinolytisch ist als jene R; 4) dans sechs zu zehn mal ein vollständiger Paralellismus zwischen der Virulenz des Staphylokokkus und seiner mucinolytischen Wirkung besteht. Er berichtet über die Ergebnisse, welche er während einiger praktischen Untersuchungen über die mucinolytische Wirkung des Penicillins, des Vivicillins, einer Serie von Myceten und über die Wirkung des Penicillins und Vivicillins hinsichtlich der mucinolytischen Aktivität des Staphylokokkus gemacht hat.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AUSTONI, *Boll. Ist. Sierot. Mil.*, 1939, vol. 18, pag. 246.
- 2) BERGAMINI, *Giorn. Batt. e Imm.*, voll. 30 e 31, 1943-44.
- 3) BRUNO, *Riv. Ital. Ginecologia*, 1941, vol. 24, pag. 455.
- 4) CHAIN e DUTHIE, *Nature*, 1939, vol. 144, pag. 977.
- 5) CROWLEY, *J. Pat. a Bact.*, 1944, 57, 27.
- 6) DURAN-REYNALS, *J. Exp. Med.*, 1933, vol. 58, pag. 161.
- 7) FAVILLI « Fenomeni di diffusione nei tessuti » *I.T.E.R.*, 1941, Torino (Bibliografia). *Boll. I.S.M.*, 1940, 19, 481. *Riv. Biol. e Imm.*, 1942, 21, 1.
- 8) GOODNER, *J. Exp. Med.*, 1933, vol. 58, pag. 153.

- 9) GUARNA citato da SATTA e dalla BERGAMINI.
- 10) GUARNA e SCHIAVINI cit. da FAVILLI.
- 11) HEGEMANN, citato da SATTA.
- 12) HIRST, citato da FAVILLI.
- 13) LUCCHETTI, *La Ginecologia*, 1938, vol. 4, pag. 110.
- 14) MACCLEAN, *J. Path. a. Bacter.*, 1936, vol. 42, pag. 477.
- 15) MAC-CLEAN e HALE, *Nature*, 1940, vol. 145, pag. 867.
- 16) MALAGOLI, *Boll. Soc. It. Biol. Sperim.*, 1940, vol. 15, pag. 668.
- 17) MAYER e coll., cit. da FAVILLI.
- 18) PRADHAN, *Brit. J. Exp. Path.*, 1938, vol. 18, pag. 90.
- 19) ROBERTSON e coll. cit. da FAVILLI.
- 20) ROVERS e BOLOGNA, *Atti Soc. Med. Lombarda*, 1938, vol. 27, pag. 673.
- 21) SATTA, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, 1945, pagg. 273, 274, 281, 518, 519, 569, 570.
- 22) SCHIAVINI, citato da SATTA e da FAVILLI.
SCHWABAKER e coll., *Brit. J. Exp. Path.*, 1945, 26, 12.
- 23) TOSATTI, *Pathologica*, 1937, vol. 29, 550.
- 24) TOSATTI e GRAZIADEI, *Pathologica*, 1937, vol. 29, pag. 541.