

20. Rodolfo NEGRI - Alterazioni morfologiche del bacillo di Pasteur e Thuillier prodotte " in vitro ", dalla Penicillina.

In una mia precedente nota (1) ho illustrato la sensibilità del b. di Pasteur e Thuillier alla penicillina e stabilito il titolo di diluizione massima dell'antibiotico, capace ancora d'inibire completamente lo sviluppo del suddetto germe.

In un secondo gruppo di ricerche — che sono oggetto di questa nota — ho voluto studiare se anche il bacillo in questione andava incontro ad alterazioni morfologiche se veniva in contatto con diluizioni di penicillina che determinavano soltanto un ritardo di sviluppo del germe. Lo studio di dette alterazioni era già stato intrapreso su altri germi da vari AA. nell'intento di poter chiarire il meccanismo d'azione della penicillina.

Secondo GARDNER (2), il quale ha fatto uno studio sistematico sugli effetti della penicillina sui caratteri morfologici dei batteri, la penicillina in debole concentrazione determinerebbe negli stafilococchi un aumento di volume (forme giganti), con impedimento della riproduzione; negli streptococchi invece produrrebbe un allungamento delle catenelle, mentre nelle forme bacillari determinerebbe un aumento in lunghezza (forme filamentose).

Pure SMITH e HAY (3) descrissero tali alterazioni dimostrando che il rigonfiamento e la lisi — nello staphylococcus aureus — avvengono solo quando l'influenza della penicillina si esercita durante il periodo dell'accrescimento, mentre non si verificano negli stessi organismi quando hanno raggiunto il completo sviluppo anche usando ripetute dosi concentrate di penicillina. Secondo questi AA. la penicillina agirebbe sulla membrana cellulare, apportando modificazioni strutturali alla medesima e bloccando certi componenti dell'apparato enzimatico, in particolare i centri che presiedono alla divisione microbica.

Anche BIGGER (4) e DUBOS (5) pensano che la formazione di microrganismi giganti sarebbe espressione dell'inibizione che la penicillina esercita sul meccanismo di divisione del germe.

Analoghe alterazioni da penicillina ha osservato COGGI (6) nel pus di ascessi trattati con l'antibiotico. CARLIFANTI (7) ha messo in evidenza, con diluizioni di penicillina che determinano soltanto

un ritardo di sviluppo degli stafilococchi, un aumento di volume due o tre volte superiore a quello dei preparati di stafilococco normale. Nelle stesse condizioni, secondo questo A., gli streptococchi presentano delle forme giganti, intensamente gram positive disposte a catena, insieme a forme piccole e gram negative.

Alterazioni morfologiche sono state pure messe in evidenza nei gonococchi durante il trattamento penicillinico della blenor-

ragia da MILLER - SCOTT e MOELLER (8), TURNER, STEMBERG (9), e MONNIER (10).

Anch'io posso confermare nei riguardi del bacillo di Pasteur e Thuillier le alterazioni morfologiche da penicillina messe in evidenza dai su citati AA. per altri germi. Per mettere in evidenza tali alterazioni seminavo provette contenenti 4,5 cc. di brodo suino con una goccia di brodo-cultura di 24 h. del bacillo in questione ed aggiungevo per ogni provetta 1/2 cc. di diluizioni progressive di penicillina. Mettevo

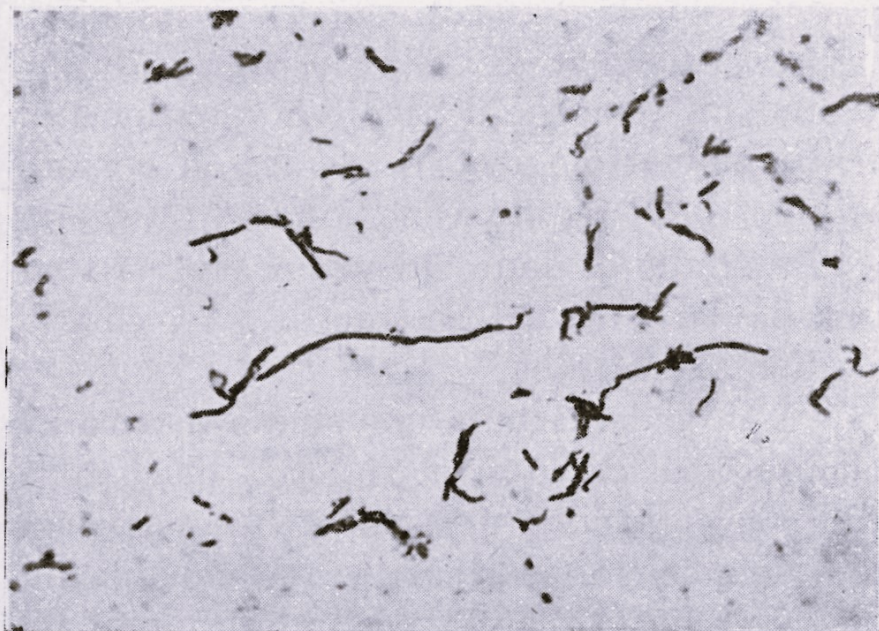


Fig. 1. — *Forme giganti di bacilli di Pasteur e Thuillier con presenza di vacuoli nel corpo batterico. Accanto si notano forme di germi di grandezza normale.*

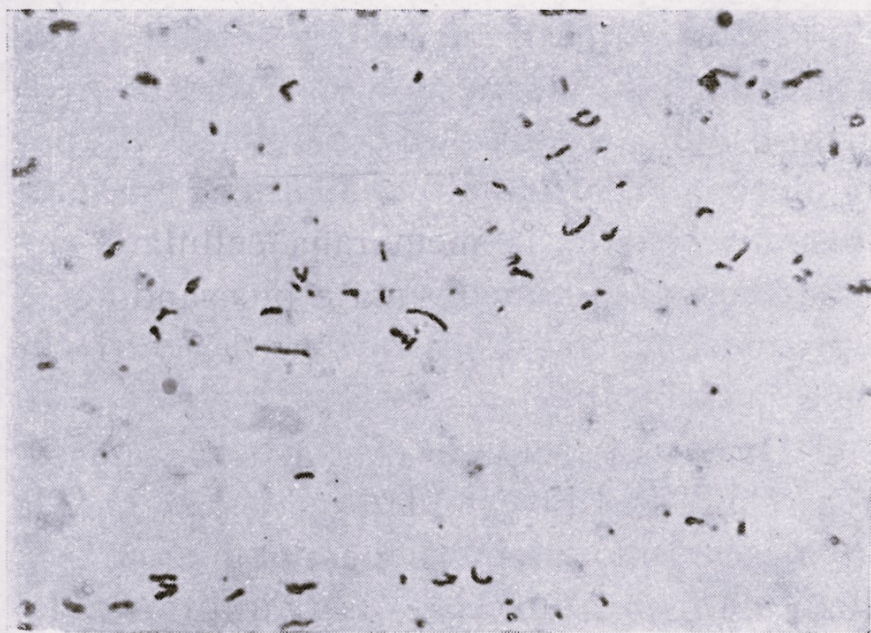


Fig. 2. — *Bacilli di Pasteur e Thuillier normali per forma e grandezza*

in termostato le provette: dopo 24 h. eseguivo la lettura e aspiravo con pipetta Pasteur il brodo delle provette contenenti diluizioni di penicillina che avevano determinato soltanto un ritardo di sviluppo del germe. Centrifugavo infine il tutto per mezz'ora a 2-3 mila giri e dal tenue sedimento eseguivo degli strisci colorati col metodo del Gram. L'esame microscopico metteva in evidenza accanto a diversi bacilli di grandezza normale, Gram positivi, numerosissimi bacilli — pure Gram positivi — aumentati di volume « in toto » ma soprattutto in lunghezza (V. fig. n. 1). Tale volume medio dei germi era superiore di 4-5 volte a quello di preparati normali (V. fig. n. 2). Nel mezzo del corpo batterico era possibile altresì mettere in evidenza qualche vacuolo rifrangente mentre nulla si potè rilevare a carico della membrana bacillare con gli usuali apparecchi di microscopia.

Tali fenomeni, a mio giudizio, sono da interpretarsi come manifestazioni degenerative e rappresentano forse una forma iniziale del processo che in seguito conduce alla completa distruzione del germe.

L'osservazione di tali alterazioni morfologiche col microscopio elettronico potrà forse chiarire se in realtà si tratti di processi degenerativi o di manifestazioni morfologiche della batteriostasi, espressione dell'inibizione esercitata dalla penicillina sul meccanismo di riproduzione nel senso di una mancata scissione di forme che non hanno cessato del tutto di accrescersi.

Stabilito dunque che anche il bacillo di Pasteur e Thuillier subisce notevoli alterazioni morfologiche con diluizioni di penicillina che determinano soltanto un ritardo di sviluppo del germe, ho voluto vedere se tali manifestazioni morfologiche potevano essere messe in evidenza anche in tali germi privati di sostanze nutritive. Le ricerche vennero eseguite seguendo il metodo adottato dal CARLIFANTI (7) per gli stafilococchi e streptococchi.

I bacilli di Pasteur e Thuillier, coltivati in brodo suino, venivano lavati tre volte in soluzione fisiologica e risospesi nella medesima, tamponata a pH 7, ed aggiunti a diluizioni progressive di penicillina. Dalle numerose prove eseguite ho potuto rilevare che sia il potere battericida che quello batteriolitico della penicillina è nullo in mancanza di sostanze nutritive. Però è sufficiente aggiungere piccole quantità di peptone o di brodo perchè — a se-

conda delle diluizioni di penicillina — si verifichi lisi o batteriostasi con le modificazioni morfologiche dianzi descritte.

Nei germi « in riposo » si nota soltanto — come nei controlli senza penicillina — un impicciolimento del corpo batterico dovuto probabilmente alle condizioni di stasi metabolica nella quale si trovano i germi. Questi si presentano, inoltre, per la maggior parte, sul limite della Gram positività.

Da quanto esposto posso concludere che anche il bacillo di Pasteur e Thuiller va incontro « in vitro » ad alterazioni morfologiche notevoli se messo in contatto con diluizioni di penicillina che determinano soltanto un ritardo di sviluppo del germe. Tali fenomeni, a mio giudizio, sono da interpretarsi come manifestazioni degenerative e rappresentano forse una forma iniziale del processo che porta poi alla completa distruzione del germe.

I germi sospesi in soluzione fisiologica (germi « in riposo ») sono insensibili all'azione della penicillina; essi non vengono ne lisi, ne uccisi, ne alterati nei loro caratteri morfologici ma solo leggermente modificati nei loro caratteri tintoriali, malgrado il prolungato contatto con l'antibiotico. Basta aggiungere però a tali sospensioni una piccola quantità di brodo o anche di solo peptone perchè la penicillina provochi rapidamente battericidia e lisi oppure le caratteristiche alterazioni morfologiche già descritte.

L'interpretazione di tale insensibilità dei germi in riposo metabolico presenta notevole interesse perchè potrebbe contribuire a chiarire il meccanismo d'azione dei chemioterapici e le cause della loro specificità.

Roma - Istituto Superiore di Sanità — Laboratorio di batteriologia.

RIASSUNTO

L'A. ha dimostrato « in vitro » le alterazioni morfologiche del bacillo di Pasteur e Thuiller, prodotte da diluizioni di penicillina che determinano soltanto un ritardo di sviluppo del germe. Ha inoltre dimostrato che se tali germi vengono messi in condi-

zione di riposo la penicillina non produce né battericidia, né lisi, né alterazioni morfologiche ad eccezione di lievi modificazioni delle loro affinità tintoriali. —

RESUMÉ

L'Auteur a démontré « in vitro » les altérations morphologiques du bacille de Pasteur et Thuiller, produites par des dilutions de pénicilline ne déterminant qu'un retard dans le développement des germes. En outre, il a démontré que si ces germes sont mis en condition de repos, la pénicilline ne produit aucune action bactéricide ni bactériolytique, et de même aucune altération morphologique, sauf de légères modifications de leurs affinités tinctoriales.

SUMMARY

The A. shows « in vitro » the morphological changes produced in the Pasteur-Thuillier bacillus by penicillin diluted so as to cause only a delay in the development of germs. Besides, the A. demonstrates that penicillin does not act on bacilli in rest conditions (no bactericidal action and no lysis and no morphological changes are detectable as well) save little modifications of their dye-affinity.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser hat « in vitro » die morphologischen Veränderungen des Pasteur und Thuillier Bacillus dargestellt, die durch Penicillin Verdünnungen herforgerufen werden, welche nur eine Verzögerung des Wachstums des Keimes bewirken. Er hat auch bewiesen, dass das Penicillin, wenn jene Keime in Ruhestand gesetzt werden, weder Bakteriolyse, noch Lysine, noch morphologische Veränderungen, mit Ausnahme von kleinen Veränderungen in ihrer Färbungsaffinität bewirkt.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) R.NEGRI (Rendiconti Ist. Sup. Sanità, 1946, in corso di stampa).
- (²) GARDNER A. D. (Nature 1940, 153, 146, 837).
- (³) SMITH L. D. - and. HAY T. (J. Franklin Inst. 1942, 233, 598).
- (⁴) BIGGER J. W., THOMAS G. E. and CALDWELL W. G. O. (J. Path. Bact. 1944, 56, 266).
- (⁵) DUBOS R. J. (J. Amer. Med. Ass., 1944, 124, 633).
- (⁶) GOGGI G. (Boll. I.S.M., 1944, 23).
- (⁷) CARLINFANTI E. (Clinica Nuova — 15 agosto 15 sett. 1945 — vol. I n. 6, 7, 8 pag. 176).
- (⁸) MILLER, SCOTT e MOELLER (Journ. Amer. Med. Ass. 1944, 125, 607).
- (⁹) TURNER, STENBERG (J. Amer. Med. Ass. 1944, 124, 133).
- (¹⁰) MONNIER J. (La pénicilline a la portée du praticien 146, 120).