

14. G. DE FELIP e Littoria von LORCH. — Studio sierologico di alcuni lattobacilli e delle loro mutanti artificialmente rese antibiotico-resistenti.

Riassunto. — Gli AA. hanno eseguito uno studio sierologico di alcuni lattobacilli (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei* 22, *Streptococcus lactis* R 8043) e delle loro mutanti a resistenza indotta agli antibiotici (penicillina, streptomina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicolo). Nel corso di dette ricerche è stata utilizzata la reazione di precipitazione.

Il comportamento delle mutanti antibiotico-resistenti ha evidenziato che l'induzione di resistenza non modifica le proprietà antigeniche nei riguardi degli stipiti originari.

Inoltre gli AA. hanno evidenziato, con la reazione di precipitazione, l'assenza di comunanza antigenica tra il *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus bifidus*.

Résumé. — Les auteurs ont effectué une étude sérologique de quelques lactobacilles (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei* 22, *Streptococcus lactis* R 8043) et de leurs mutants résistants aux antibiotiques (pénicilline, streptomycine, néomycine, tétracycline, chloramphénicol). Au cours de ces recherches on a utilisé la réaction de précipitation.

Le comportement de ces mutants a mis en évidence que cette résistance artificiellement produite ne modifie pas les propriétés antigéniques par rapport aux souches originaires.

Les auteurs, en outre, ont démontré par réaction de précipitation, le manque d'une communauté antigénique entre le *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* et *Lactobacillus bifidus*.

Summary. — Immunological studies have been performed on several lactobacilli (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei* 22, *Streptococcus lactis* R 8043) and on artificial mutants with induced antibiotic resistance (to penicillin, streptomycin, neomycin tetracycline, chloramphenicol). Precipitation reactions were used throughout. The behaviour of the antibiotic resistant mutants shows that the induction of resistance does not alter the antigenic properties from those of the original strains.

Evidence has also been obtained, with the precipitation reaction, that there is no common antigen amongst *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus bifidus*.

Zusammenfassung. — Die Autoren haben ein serologisches Studium einiger Milchbazillen (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei* 22, *Streptococcus lactis* R 8043) und ihrer Variationen die einen künstlichen Widerstand gegen die Antibiotica besitzen, ausgeführt (Penicillin, Streptomycin, Neomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol). Im Laufe der beschriebenen Versuche wurde die Niederschlag-Reaktion benutzt.

Das Benehmen der Variationen, die widerstandsfähig gegen die Antibiotica sind, hat gezeigt, dass der hervorgerufene Widerstand nicht die Eigenheiten der Antigene modifiziert, in Bezug auf die Originalstämme.

Ausserdem haben die Autoren mit der Niederschlag-Reaktion das Fehlen der Antigengemeinschaft zwischen den *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* und *Lactobacillus bifidus* hervorgehoben.

Un problema sorto recentemente è quello relativo alle alterazioni, di diversa natura, che l'induzione di resistenza agli antibiotici può provocare sui microrganismi. Le eventuali modificazioni causate possono riguardare il comportamento biochimico, la morfologia, la struttura antigenica, la virulenza e l'attività sintetica nei riguardi dei fattori di crescita [MC MURTRIE ⁽¹⁾; MIKA ⁽²⁾; CASSATA ⁽³⁾; ROSA ⁽⁴⁾; PETERSON ⁽⁵⁾; WYSS ⁽⁶⁾; FLOREY ⁽⁷⁾; MILLER ^(8, 9, 10); KLEIN KIMMELMAN ⁽¹¹⁾; MURRAY ⁽¹²⁾; MIDDLEBROOK ⁽¹³⁾; SCHNEIERSON ⁽¹⁴⁾].

In un nostro precedente lavoro ⁽¹⁵⁾ ci siamo occupati di evidenziare le alterazioni morfologiche, provocate dall'induzione di resistenza, in alcuni stipiti di lattobacilli; inoltre uno di noi ⁽¹⁶⁾ si è interessato del problema, relativo alla conservazione della capacità B-vitamina-sintetizzatrice, da parte di alcuni microrganismi artificialmente resi antibiotico-resistenti.

Nel quadro di tali ricerche ci siamo proposti di evidenziare, mediante la reazione di sieroprecipitazione, una eventuale modificazione, nei

confronti degli stipiti originari, dei caratteri sierologici di alcuni lattobacilli, resi antibiotico-resistenti.

Inoltre abbiamo cercato di differenziare, su basi sierologiche, il *Lactobacillus acidophilus* dal *Lactobacillus casei*. Questi stipiti batterici e le loro mutanti antibiotico-resistenti vengono comunemente usati in terapia e, pertanto, si presenta spesso la necessità di dovere differenziare una specie dall'altra.

Come è noto la sistematica dei lattobacilli presenta, a tutt'oggi, confusioni ed incertezze, perchè nessuno dei metodi adottati, tra i quali i sierologici, consente una netta e sicura distinzione tra le varie specie di lattobacilli e, in particolare, tra il *Lactobacillus acidophilus* e il *Lactobacillus casei* [BRIGGS (¹⁷); ORLAND (¹⁸); WILLIAMS (¹⁹)].

Infatti, sia nella classificazione sierologica di ORLAND (¹⁸) che in quelle più recenti della SHARPE (²⁰, ²¹), eseguite con l'impiego di sieri precipitanti, risulta che un gruppo sierologico può comprendere più di una specie.

Da questi lavori si rileva, altresì, che il *Lactobacillus acidophilus* non possiede caratteristiche sierologiche così specifiche da permetterne la differenziazione dal *Lactobacillus casei*.

Quale mezzo di identificazione di specie e di controllo di eventuali modificazioni antigeniche delle mutanti antibiotico-resistenti, abbiamo adottato la reazione di precipitazione. Questa reazione è stata preferita a quella di agglutinazione in quanto i risultati preliminari ottenuti con quest'ultima non sono stati idonei sia per i bassi titoli agglutinanti ottenuti, che per la mancanza di specie-specificità.

Le tecniche usate nel corso di queste ricerche sono state analoghe a quelle impiegate dalla SHARPE (²⁰), eccettuate alcune modificazioni, quali l'impiego di un diverso terreno colturale e la filtrazione per Seitz degli antigeni precipitanti.

L'uso del nostro terreno colturale ha evitato la comparsa di anticorpi aspecifici verso il terreno stesso, mentre la filtrazione degli antigeni ci ha permesso di ottenere reattivi limpidissimi che hanno notevolmente facilitato la lettura della reazione di precipitazione.

MATERIALI

Stipiti batterici: Lactobacillus acidophilus 220, *Lactobacillus casei* 22, *Streptococcus lactis* R 8043 e le loro mutanti a resistenza indotta alla penicillina, streptomina, neomicina, tetraciclina e cloranfenicolo; *Lactobacillus bulgaricus* 09 A.T.C.C. 10812, *Lactobacillus lactis* L 3, *Lactobacillus bifidus* N.C.I.B. 2797.

Il grado di resistenza agli antibiotici posseduto dagli stipiti antibi-
tico-resistenti era del seguente ordine:

penicillina	10 U/cm ³
streptomicina	1.000 γ /cm ³
neomicina	1.000 γ /cm ³
tetracicline	100 γ /cm ³
cloranfenicolo	100 γ /cm ³

Le mutanti antibiotico-resistenti sono state ottenute con tecnica ana-
loga a quella già applicata da uno di noi [VON LORCH (22)].

Terreno colturale: brodo carota-fegato pH 6,0.

Conservativo: tiomersalato di sodio (soluzione madre in acqua di-
stillata all'1‰).

Soluzione acida di estrazione: acido cloridrico 0,05 N in soluzione
fisiologica.

Animali per la preparazione dei sieri precipitanti: conigli dei due
sessi, del peso di circa kg. 1,5.

TECNICA

PREPARAZIONE DEI SIERI PRECIPITANTI.

Le sospensioni batteriche, da inoculare nei conigli, erano ottenute
da colture, in cm³ 100 di brodo carota-fegato, mantenute per 48 ore a
37°C. Tali colture venivano centrifugate e il sedimento, lavato per 3 volte
in soluzione fisiologica, era sospeso in cm³ 10 della medesima.

Le sospensioni batteriche così ottenute venivano scaldate in b. m.
a 60°C per 1 ora, indi diluite con soluzione fisiologica in modo da poter
essere comparate con l'opacimetro Browns tubo n. 3, corrispondente a
circa 6×10^6 cellule/cm³.

Come conservativo veniva aggiunto tiomersalato, in modo che la sua
concentrazione finale era di 1/10.000.

Dai conigli, da sottoporre all'inoculazione, veniva in precedenza pre-
levato un campione di sangue, per controllare l'eventuale presenza, nel
siero, di anticorpi precipitanti gli antigeni in esame.

Accertata l'assenza di proprietà precipitanti del siero, le sospensioni venivano inoculate secondo il seguente schema:

I giorno	=	cm ³ 0,5	sottocute
III »	=	» »	endovena
VII »	=	» »	»
XI »	=	» »	»
XV »	=	» »	»
XX »	=	» »	»

Dopo 8 giorni dall'ultima inoculazione si eseguiva, dalla safena, un prelievo di sangue onde accertarsi, mediante la reazione di precipitazione, della risposta immunitaria. Se questa risposta risultava negativa, l'animale veniva sottoposto ad ulteriori inoculazioni endovena. In presenza di anticorpi, l'animale veniva invece salassato in bianco, dalla carotide, e il siero era raccolto sterilmente, eliminando tutte le possibili cause di fenomeni di emolisi. Il siero aggiunto di tiomersalato (1/10.000) era infialato e conservato a 4°C.

PREPARAZIONE DEGLI ANTIGENI.

Gli stipiti batterici in esame venivano coltivati per 48 ore a 37°C in cm³ 100 di brodo carota-fegato. Tali colture erano centrifugate ed il loro sedimento veniva lavato per 3 volte in soluzione fisiologica. Il sedimento era quindi ripreso con cm³ 15 della soluzione acida di estrazione, indi portato in b. m. bollente per 30'.

Le sospensioni così trattate venivano neutralizzate con idrato di sodio allo 0,5%, addizionate di tiomersalato (1/10.000), filtrate per Seitz e conservate a 4°C.

REAZIONE DI PRECIPITAZIONE.

La reazione di precipitazione veniva eseguita in provette da sierologia. Si stratificavano cm³ 0,5 di antigene su cm³ 0,5 di siero; le provette venivano poste a t.a. controllando, ad intervalli di 5', la formazione di un anello biancastro nella zona di separazione dei due liquidi. La formazione di tale anello è indice dell'avvenuta reazione di precipitazione.

Le letture non venivano protratte oltre la seconda ora, poichè i risultati ottenuti dopo questo periodo non sono probativi.

I controlli erano eseguiti con siero normale di coniglio, raccolto e conservato con la stessa tecnica usata per i sieri precipitanti.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dalle ricerche eseguite risulta che il comportamento antigenico delle mutanti a resistenza indotta agli antibiotici (penicillina, streptomina, neomicina, tetraciline, cloranfenicolo) è risultato analogo a quello degli stipiti originari, non antibiotico-resistenti.

Infatti, gli estratti precipitanti delle mutanti antibiotico-resistenti, hanno reagito positivamente in presenza degli antisieri ottenuti con l'impiego degli stipiti originari; inoltre tali antigeni hanno reagito specificamente senza dar luogo a reazioni crociate (vedi tabella).

Le reazioni di controllo condotte in parallelo e con gli stessi sieri, ma in presenza di estratti precipitanti degli stipiti originari, hanno fornito risultati analoghi.

In ogni caso la reazione è stata nettamente evidente entro un breve periodo di tempo (5'-10').

Possiamo pertanto concludere che l'induzione di resistenza non ha modificato, negli stipiti presi in esame, il comportamento antigenico nei confronti degli antisieri precipitanti ottenuti con l'impiego degli stipiti originari.

Per quanto riguarda il *Lactobacillus acidophilus* e il *Lactobacillus casei*, la reazione di precipitazione non ha messo in evidenza interreazioni tra le due specie; infatti, i sieri precipitanti hanno reagito positivamente, non dando luogo a reazioni crociate, dimostrandosi così specie-specifici.

Inoltre, i sieri anti *Lactobacillus acidophilus* e anti *Lactobacillus casei* sono stati saggiati, onde accertare la loro specie-specificità, con antigeni ottenuti da altre specie di lattobacilli.

Dalla tabella si può rilevare che i sieri anti *Lactobacillus acidophilus* e anti *Lactobacillus casei* danno reazione positiva soltanto con gli antigeni precipitanti omologhi, mentre con tutti gli altri antigeni la reazione è risultata negativa.

L'assenza di comunanza antigenica permette di differenziare il *Lactobacillus acidophilus* ed il *Lactobacillus casei* dalle altre specie di lattobacilli.

Estratti precipitanti	Sieri precipitanti			Siero norm. di coniglio
	anti <i>L. acidophilus</i> 220	anti <i>L. casei</i> 22	anti <i>Streptococcus lactis</i> R 8043	Controllo
<i>L. acidophilus</i> 220	+	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> 220 RP	+	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> 220 RS	+	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> 220 RN	+	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> 220 RT	+	—	—	—
<i>L. acidophilus</i> 220 RC	+	—	—	—
<i>L. casei</i> 22	—	+	—	—
<i>L. casei</i> 22 RP	—	+	—	—
<i>L. casei</i> 22 RS	—	+	—	—
<i>L. casei</i> 22 RN	—	+	—	—
<i>L. casei</i> 22 RT	—	+	—	—
<i>L. casei</i> 22 RC	—	+	—	—
<i>Streptococcus lactis</i> R 8043	—	—	+	—
<i>Streptococcus lactis</i> R 8043 RP	—	—	+	—
<i>Streptococcus lactis</i> R 8043 RS	—	—	+	—
<i>Streptococcus lactis</i> R 8043 RN	—	—	+	—
<i>Streptococcus lactis</i> R 8043 RT	—	—	+	—
<i>Streptococcus lactis</i> R 8043 RC	—	—	+	—
<i>L. bulgaricus</i> 09 A.T.C.C. 10812	—	—	—	—
<i>L. lactis</i> L 3	—	—	—	—
<i>L. bifidus</i> N.C.I.B. 2797	—	—	—	—

Leggenda:

- RP = mutante a resistenza indotta alla penicillina (10 U/cm³)
 RS = mutante a resistenza indotta alla streptomina (1.000γ/cm³)
 RN = mutante a resistenza indotta alla neomicina (1.000γ/cm³)
 RT = mutante a resistenza indotta alle tetracicline (100γ/cm³)
 RC = mutante a resistenza indotta al cloranfenicolo (100γ/cm³)

Tale comportamento antigenico specie-specifico non viene, inoltre, alterato dall'induzione di resistenza agli antibiotici.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MC MURTRIE E., BERMAN D. T. - Bact. Proc., 47: (1953).
 - (²) MIKA L. A. e coll. - J. Bact., 68: 562 (1954).
 - (³) CASSATA F., FONTI E. - Riv. Ist. Sierot. Mil., 28: 336 (1953).
 - (⁴) ROSA A. e coll. - Nuovi Ann. Ig. Micr., 4: 277 (1953).
 - (⁵) PETERSON A., POPE H. - J. Bact., 64: 25 (1952).
 - (⁶) WYSS O., SCHAIBERGER G. E. - J. Bact., 66: 49 (1953).
 - (⁷) FLOREY H. W., JENNINGS M. A. - Brit. J. Surgery - Spec. Issue, 112 (1944).
 - (⁸) MILLER C. P., BONHOFF M. - Proc. Soc. Exp. Biol., 60: 354 (1945).
 - (⁹) MILLER C. P., BONHOFF M. - J.A.M.A., 130: 485 (1946).
 - (¹⁰) MILLER C. P., BONHOFF M. - J. Bact., 54: 8 (1947).
 - (¹¹) KLEIN KIMMELMAN L. J. - J. Bact., 52: 471 (1946).
 - (¹²) MURRAY R., KILHAN L., WILCOX C., FINLAND N. - Proc. Soc. Biol. Med., 63: 470 (1946).
 - (¹³) MIDDLEBROOK G., YEGIAN D. - Am. Rev. Tuberc., 54: 553 (1946).
 - (¹⁴) SCHNEIERSON S. S. - J. Bact., 53: 393 (1948).
 - (¹⁵) VON LORCH L., DE FELIP G., EL ZOFRI M. - Rend. Ist. Sup. Sanità (in corso di stampa).
 - (¹⁶) PRINCIVALLE M., VON LORCH L. - Rend. Ist. Sup. Sanità (in corso di stampa).
 - (¹⁷) BRIGGS M. - J. Gen. Microb., 9: 234 (1953).
 - (¹⁸) ORLAND F. J. - J. Infec. Dis., 86: 63 (1950).
 - (¹⁹) WILLIAMS N. B. - J. Am. Dent. Ass., 37: 403 (1948).
 - (²⁰) SHARPE M. E. - J. Gen. Microb., 12: 107 (1953).
 - (²¹) SHARPE M. E., WHEATER D. M. - The National Institute for Research in Dairying University of Reading (in corso di stampa).
 - (²²) VON LORCH L. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 19: 598 (1956).
-