

55
AMBisc B.76/5

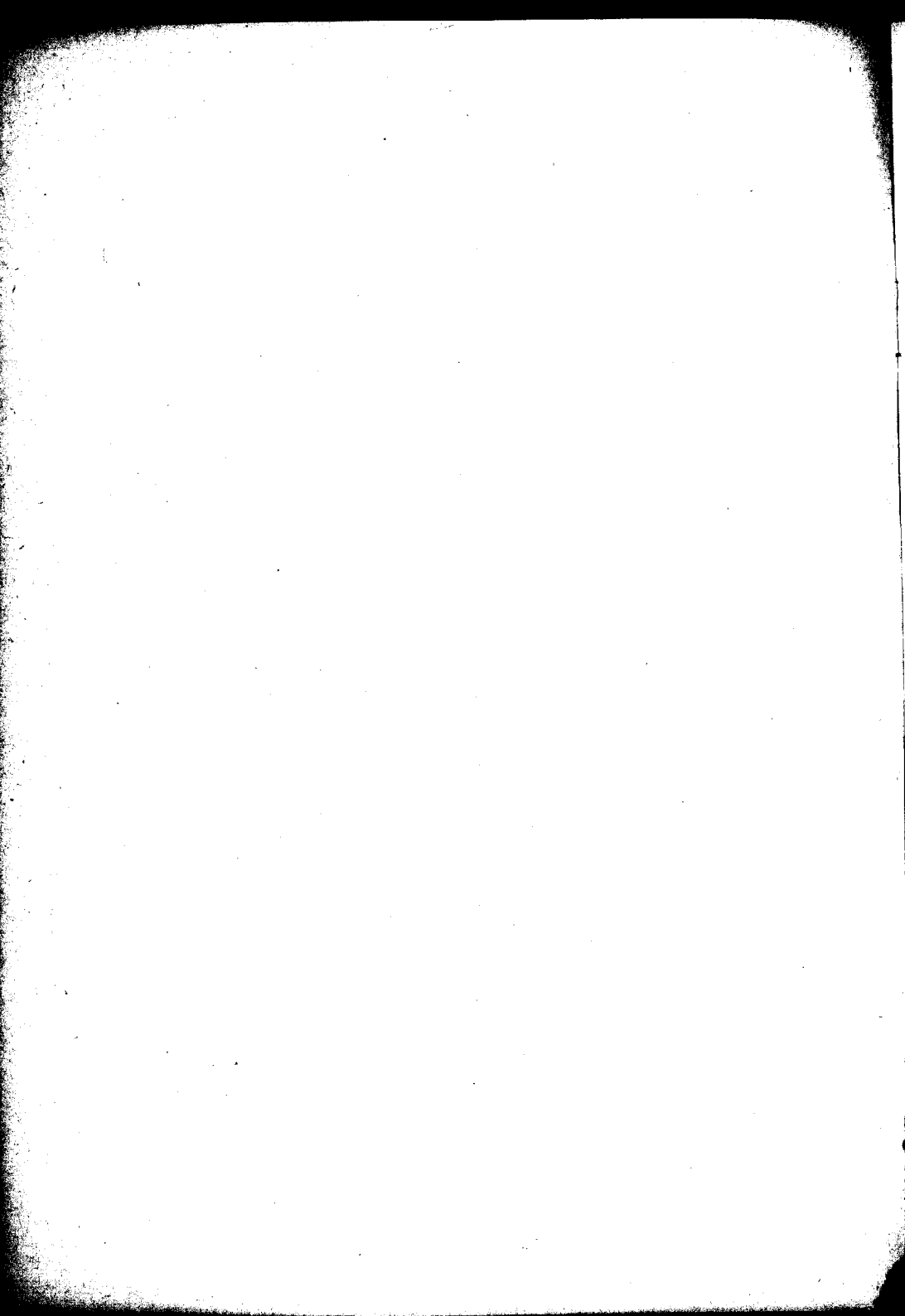
DOTT. PROF. PERICLE POZZILLI

LE FORME FILTRANTI DEI BATTERI VISIBILI

ESTRATTO DALLA RIVISTA BIMESTRALE
ANNALI DI MICROBIOLOGIA
FASCICOLO I - SETTEMBRE-OTTOBRE 1932 - X



GENOVA
TIPOGRAFIA FRATELLI PAGANO
1932



DOTT. PROF. PERICLE POZZILLI

LE FORME FILTRANTI DEI BATTERI VISIBILI

ESTRATTO DALLA RIVISTA BIMESTRALE
ANNALI DI MICROBIOLOGIA
FASCICOLO I - SETTEMBRE-OTTOBRE 1932 - X

GENOVA
TIPOGRAFIA FRATELLI PAGANO
1932



LE FORME FILTRANTI DEI BATTERI VISIBILI

PROF. DOTT. PERICLE POZZILLI
DOCENTE DI PATOLOGIA SPECIALE MEDICA
NELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA :: ::

La scienza procede divorando la via: quello che era vero ieri, oggi è dubbio, domani sarà un errore e posdomani ancora una certezza! Nulla è intangibile e statico nella scienza della vita (*Sanarelli*).

Queste parole bene si adattano ai profondi progressi che la microbiologia ha fatto in questi ultimi anni. La scoperta del *batteriofago*, quella delle *dissociazioni batteriche*, e quella delle *forme filtranti dei batteri visibili*, hanno modificato profondamente le nostre conoscenze sulla natura e sulla costituzione dei microbi, quali eravamo abituati a conoscere, e che dimostrano la complessità di questi esseri.

Difatti noi eravamo indotti, basandoci sulla fissità della specie, a non concepire i microbi se non sotto l'aspetto di esseri semplicissimi, visibili al microscopio, coltivabili su mezzi artificiali, inoculabili agli animali. Sappiamo invece oggi, alla luce delle nuove scoperte, che i batteri visibili, possono trasformarsi in elementi tanto minuti da rendersi invisibili ai più forti ingrandimenti sì da potere attraversare le candele da filtro, anche le meno porose e le membrane collodioniche. Questi elementi primordiali, mediante processi a noi del tutto sconosciuti, sarebbero poi in grado di ricostituire il batterio di dimensioni normali.

Come nella fisica si è imposto il problema dell'infinitamente piccolo per spiegare l'intima costituzione della materia, così in microbiologia la scoperta degli *infravisibili* ci permetterà sicuramente di risolvere molte delle incognite che esistono ancora nella epidemiologia e nella patogenesi delle malattie infettive.

Non si creda però che le opinioni degli autori siano tutte concordi nell'ammettere l'esistenza di una fase filtrabile dei batteri visibili. Al contrario: di fronte a coloro che sono convinti assertori di una fase infravisibile dei microbi, ve ne sono altri che la negano nel modo più reciso. Tra queste due opposte correnti v'è un gruppo, diremo così, intermedio di studiosi, che non si sentono autorizzati a concludere per una fase filtrabile, pur avendo avuto nelle loro esperienze qualche risultato positivo.

Sta di fatto che i sostenitori della filtrabilità sono quasi tre volte più numerosi di quelli che la negano, e quasi ogni giorno viene appor-
tato un contributo nuovo a conferma della possibilità da parte dei batteri visibili di dare origine a forme ultravisibili o infravisibili.

Del resto non dobbiamo meravigliarci se, prima di essere di pubblico dominio, tali nuove vedute siano aspramente combattute.

Ma quello che ci rende maggiormente inclini ad orientarci verso l'ipotesi della filtrabilità dei batteri visibili, è la constatazione cui son giunti vari autori, i quali studiando tre differenti ordini di fenomeni — *batteriofagia*, *dissociazione batterica*, *ultravirus* — hanno dimostrato la esistenza delle forme filtranti dei batteri visibili.

Ci sembra interessante descrivere in quale maniera dallo studio di questi tre ordini di fatti si sia pervenuti alla medesima conclusione.

* * *

Per ciò che si riferisce al *batteriofago*, ricorderemo che D' Hérelle per il primo, e successivamente Tomaselli, Hauduroy ed altri, hanno potuto dimostrare la comparsa di forme filtranti nelle colture di numerosi batteri (bacilli dissenterici, bacilli del gruppo tifico, bacillo difterico, ecc.), per azione del *principio litico*.

Un'esperienza molto suggestiva al riguardo è la seguente:

Se 100 cc. di brodo ordinario si seminano con bacillo di Shiga, in modo da aversi un leggero intorbidamento, alla brodo-coltura si aggiunge del batteriofago anti-Shiga e si pone il palloncino di brodo in termostato a 37°, si nota che dopo 8-10 ore il batteriofago ha lisato il bacillo e il brodo è perfettamente limpido. Allora

si filtra per candela Chamberland L₃, il lisato batteriofagico, prendendo tutte le precauzioni necessarie perchè la filtrazione avvenga nelle migliori condizioni possibili.

Il filtrato, perfettamente limpido, si raccoglie in un matraccio, e si lascia a temperatura ambiente. Dopo 6-8-10 giorni, si nota di sovente che il filtrato presenta un leggerissimo intorbidamento del tutto particolare, non ad onde leggere come si può vedere nelle giovani colture, bensì sotto l'aspetto di flocculazione tipo quella che si otterrebbe con chiara d'uovo nell'acqua.

A poco a poco l'intorbidamento si accentua: scuotendo il matraccio si nota la presenza di onde, e, verso il 12°-13° giorno, con sorpresa, si constata in seno al filtrato lo sviluppo del bacillo di Shiga.

E' questo un fenomeno che si verifica con una certa frequenza allorché un batterio si pone a contatto col rispettivo batteriofago.

Come spiegarlo?

Si potrebbe pensare ad una contaminazione, dovuta a cattiva filtrazione; ma tale incidente si verifica troppo spesso per riferirlo ad un errore di tecnica. D'altro canto questo fenomeno è stato osservato e confermato da numerosi ricercatori, e non si può ritenere che tutti siano caduti nel medesimo errore.

L'ipotesi più attendibile è la seguente: sotto l'azione del batteriofago, i microbi subiscono una profonda modificazione nella loro forma e si trasformano in granuli minutissimi, non visibili coi comuni mezzi ottici e neanche all'ultramicroscopio, e che hanno la proprietà di attraversare le candele da filtro, anche a pori molto stretti.

In altre parole il microbio passa dalla forma visibile a quella invisibile e successivamente riprende la sua forma normale per un processo sconosciuto.

* * *

Anche lo studio dei *fenomeni dissociativi*, che si riscontrano in seno alle colture microbiche, ci permette di pensare che esista una variante diversa da quelle finora note, e che essa rappresenti appunto lo stadio filtrabile.

Se la coltura di un dato stipite microbico, ad esempio bacillo di Shiga o bacillo tifico, contiene una certa percentuale di questa variante, gli esperimenti di filtrazione saranno positivi; se non ne contiene, essi

saranno negativi. Ma non è detto però che lo stesso stipite, saggiato in tempi e in condizioni differenti, e che in esperienze precedenti non aveva dato luogo a varianti filtrabili, non ne dia successivamente.

Le recenti ricerche di Hadley e collaboratori, cui dobbiamo uno studio fondamentale sulla *dissociazione batterica*, hanno permesso di dimostrare che, assoggettando a particolari stimoli — il più semplice dei quali è il passaggio in serie in brodi alcalini — le colture microbiche, si favorisce e si incita la dissociazione di esse. In molti casi, Hadley e collaboratori hanno osservato che nelle piastre, sistematicamente insemenate colle brodo-colture dei microbi stimolati alla dissociazione, compaiono oltre le colonie comuni *liscie* «S» (*Smooth*) e *ruvide* «R» (*Rough*), delle colonie minutissime ben diverse dalle prime, aventi un massimo di 0,2 mm. di diametro, appena visibili con l'obiettivo 7'. Queste microcolonie sono state chiamate da Hadley «G». Trapiantate su agar, generalmente non attecchiscono; in brodo invece si sviluppano, e dalle brodo-colture si possono far passaggi su agar.

Orbene filtrando per candela molto porosa una brodo-cultura di questa variante «G» e seminando il filtrato in piastre, si ha generalmente sviluppo di colonie «G»; se invece si usano candele poco porose, le piastre seminate col filtrato appaiono sterili; se però si lavano e col brodo di lavaggio si seminano altre piastre e si continuano questi passaggi in serie da piastre apparentemente sterili, alla V o VI piastra appare lo sviluppo di colonie «G».

Le colonie «G» lasciate a sè per qualche tempo o in successivi passaggi danno di nuovo origine alle colonie «S» o «R» di quel dato microbio che era stato assoggettato alla dissociazione.

Tale reversione della variante «G» in una coltura comune, ad esempio di bacillo di Shiga, è la miglior prova che le colonie «G» non siano inquinamenti, bensì delle varianti del bacillo medesimo. La variante «G» rappresenterebbe dunque lo stadio intermedio tra la forma batterica adulta, a tutti nota, e la *fase filtrabile*. Anche le ricerche di Hadley e collaboratori, alla stessa guisa di quelle eseguite da D'Hérelle e da altri, dimostrano che in seno alle colture microbiche, sotto l'azione di

particolari stimoli, possono formarsi degli elementi minutissimi capaci di attraversare le candele porose di porcellana, e persino le membrane collodioniche.

* * *

Un importante contributo alla questione della esistenza o meno di elementi filtrabili dei batteri visibili è stato del tutto recentemente portato dalle ricerche di Sanarelli e Alessandrini, sull'*ultravirus* tubercolare e sugli elementi filtrabili del gruppo batterico tifo-paratifico.

Non ci soffermeremo a ricordare gli studi sul problema dell'*ultravirus* tubercolare, ormai ben noti a tutti, essendo questo un argomento all'ordine del giorno. Le prime ricerche, dalle quali scaturì il concetto di una possibile esistenza - oltre alla usuale forma del bacillo di Koch - di un virus tubercolare filtrabile, risalgono alla classica osservazione di Fontés (1910), cui seguirono i lavori di Philibert (1912), Vaudremer (1922), Calmette e Valtis, Hauduroy, Nègre e Bouquet, Arloing e Dufourt, ecc.

Per chi volesse approfondire le proprie conoscenze sull'argomento, rimandiamo alla bellissima rassegna critica di Sanarelli e alla ben documentata comunicazione di Puntoni al III Congresso Nazionale di Microbiologia.

Ciò che preme è conoscere come Sanarelli e Alessandrini sono pervenuti alla dimostrazione, che potrebbe dirsi *cruciale*, della esistenza di una fase filtrabile del virus tubercolare.

Per risolvere la controversa questione, questi Autori, anzichè fare uso delle candele filtranti, hanno utilizzato i sacchetti di collodio, ideati e introdotti per la prima volta in microbiologia da Sanarelli nel 1891.

Tali sacchetti, con membrana avente valore di ultrafiltro, furono riempiti a metà con un'emulsione in liquido di Sauton di bacilli tubercolari bovini tipo Vallée, molto virulenti, e introdotti nel peritoneo delle cavie. Negli animali, venuti a morte dopo un vario lasso di tempo, Sanarelli e Alessandrini hanno ritrovati i sacchetti perfettamente integri e

ripieni di liquido, ed hanno constatato che un *quid* aveva attraversato le pareti dei sacchetti, uccidendo le cavie dopo aver causato alterazioni caratteristiche di natura puramente flogistica, interessanti soprattutto le sierose e l'apparato linfatico, senza che si fosse manifestato il granuloma iniziale tubercolare.

In altre parole, all'autopsia di questi animali si osservano ordinariamente le lesioni anatomiche che si ottengono con i filtrati di colture o di prodotti tubercolari, e che sono conosciute con la denominazione di tubercolosi tipo Calmette-Valtis; cioè poliadenite più o meno accentuata, leggero aumento del volume della milza, in qualche caso presenza di rarissimi elementi acido-resistenti, ma assenza di tubercoli. Si tratta evidentemente di lesioni da *ultravirus*.

Eseguendo dei passaggi in serie, però, i tubercoli e le alterazioni caratteristiche della tubercolosi già cominciano a manifestarsi nell'organismo animale a partire dal 2° passaggio: il quadro della tubercolosi classica si dichiara in tutta la sua imponenza al 3° passaggio e nei successivi. Insomma i passaggi in serie da cavia a cavia permettono di rilevare, con l'apparizione di bacilli acido-resistenti e di tubercoli, la natura specifica del processo morboso dovuto all'*ultravirus* che aveva causato la morte delle cavie di 1° passaggio.

Continuando nelle loro ricerche, Sanarelli ed Alessandrini, sono riusciti poi a stabilire che l'*ultravirus*, oltre che *in vivo* è capace di attraversare le pareti dei sacchetti collodionici anche *in vitro* e *spontaneamente*. A tale scopo hanno immerso in un certo numero di tubi da coltura, riempiti di liquido di Sauton, sacchetti di collodio contenenti bacilli tubercolari, e dopo una prolungata permanenza dei tubi in termostato, hanno iniettato il liquido di Sauton, rimasto di una limpidezza perfetta, nel peritoneo delle cavie. Orbene queste sono morte, presentando il tipico quadro della tubercolosi da *ultravirus* di 1° passaggio.

Infine Sanarelli e Alessandrini, mediante una particolare disposizione data ai sacchetti di collodio non solo sono riusciti ad osservare lo sviluppo dell'*ultravirus* e la formazione degli elementi primordiali da esso germogliati, ma anche ad ottenere da questi elementi primor-

diali colture trasportabili in serie, che presentano tutte le caratteristiche delle colture tipiche del bacillo tubercolare.

Alle stesse conclusioni e con i medesimi procedimenti di tecnica, Sanarelli ed Alessandrini sono pervenuti, sperimentando col virus tifico e col virus paratifico (B. itteroide).

A guisa del *virus* tubercolare, anche questi producono, sia *in vivo* che *in vitro*, un rispettivo *ultravirus*, il quale è capace di attraversare facilmente le pareti dei sacchetti di collodio. Dalle loro ricerche gli Autori hanno potuto dimostrare che l'*ultravirus* tifo-paratifico rappresenta una fase biologicamente attenuata, non sempre coltivabile *in vitro*, del ceppo bacillare da cui esso ha tratto origine. Sono però sufficienti alcuni passaggi *in vitro* o *in vivo* delle forme batteriche primordiali derivate dagli elementi invisibili, per far recuperare ad esse le rispettive proprietà antigene e patogene originali.

Le ricerche di Sanarelli ed Alessandrini con i loro brillanti risultati, ci hanno dato la dimostrazione, forse più di ogni altra resistente alla critica, della reale esistenza della fase filtrante dei batteri visibili, portando nuova luce al complesso ed intricato problema.

* * *

Dagli studi interessantissimi che abbiamo riassunto, ci appare chiarita una circostanza di fatto che va sottolineata e cioè: che i tre ordini di fenomeni sui quali ci siamo soffermati, han portato al medesimo risultato, compenetrandosi intimamente l'uno con l'altro. La batteriofagia, la dottrina della dissociazione microbica e quella degli *ultravirus*, problemi nettamente differenti all'origine, ci permettono di pensare, coi loro punti di arrivo, alla possibilità della esistenza di uno stadio filtrabile dei batteri visibili. Nulla di preciso sappiamo sulla natura di questi *ultravirus*: soltanto si può affermare che essi si comportano come delle unità di materia vivente, capaci di moltiplicarsi all'infinito.

RIASSUNTO:

L' A., basandosi sulle nozioni che a tutt'oggi si posseggono sul fenomeno della batteriofagia, su quello della dissociazione microbica e sulle recentissime ricerche sperimentali di Sanarelli e Alessandrini sull'ultravirus tubercolare, viene alla conclusione che si debba ammettere l'esistenza della fase filtrante per la maggior parte dei batteri visibili.

NOTE BIBLIOGRAFICHE

- D' HÉRÉLLE — *Le Bacteriophage* - Masson Edit., Paris, 1926.
HAUDUROY — *Le Bacteriophage de D' Hérèlle* - Le Francois, Librairie, Paris, 1925.
HADLEY — *Jl. of Inf. Dis.* 1931 - Vol. 48.
SANARELLI — *Annali d' Igiene* - Gennaio, 1932.
SANARELLI e ALESSANDRINI — *Annales Pasteur* - Febbraio, 1932.
SANARELLI e ALESSANDRINI — *Annali d' Igiene* - Febbraio, 1932.
PUNTONI — *Atti del III Congresso Nazionale di Microbiologia* - Milano, 1931.
-



