

SUI FENOMENI DISSOCIATIVI E LE VARIANTI
CROMOGENE DI UNO STAFILOCOCCO
NON PATOGENO.

Ricerche sistematiche sui fenomeni dissociativi degli stafilococchi sono state compiute quasi esclusivamente su quelli patogeni ed iniziate dal Sabatucci (1931 e 1932) il quale, mediante l'applicazione della reazione aspecifica di agglutinazione alla tripaflavina, ha potuto mettere in evidenza, nelle culture di questo germe, la presenza di due varianti che, all'infuori dei caratteri morfologici perfettamente identici, potè considerare paragonabili in tutto alle varianti « S » ed « R », nel senso di Arkwright, già note per numerosi altri germi.

Secondo Sabatucci, infatti, la forma « S » dello stafilococco in genere proverrebbe da focolai infettivi di notevole gravità, mentre sperimentalmente essa sarebbe più virulenta, darebbe luogo a una maggiore produzione di anticorpi e sarebbe insensibile all'azione dei sieri normali e della tripaflavina; essa presenterebbe per di più caratteri distintivi, forse meno costanti, ma abbastanza netti nel comportamento biochimico e nella tolleranza verso l'anaerobiosi: sarebbe, dunque, la forma altamente specifica del germe.

La variante « R », invece, sarebbe — sempre secondo Sabatucci — meno patogena, darebbe origine ad una scarsa produzione di anticorpi e sarebbe facilmente agglutinabile dai sieri normali e dalla tripaflavina: essa potrebbe, quindi, venire considerata come uno stadio di trasformazione del microbo verso uno stato di adattamento ambientale ed una forma di vita meno attiva ed assai meno specifica.

Per di più, avendo Sabatucci constatato che nelle culture le colonie agglutinabili dalla tripaflavina — e quindi in fase « R » — sono le più comuni a rinvenirsi, e avendo inoltre osservato che le colonie « S » evolvono verso le forme « R », mentre queste sono irreversibili, egli considera la fase « R » come la variante normale degli stafilococchi.

Contemporaneamente al primo lavoro di Sabatucci, Gilbert (1931) rendeva noto che uno stafilococco aureo, isolato dal cuore di un individuo affetto da endocardite gonococcica, si presentava capsulato ed era molto patogeno per la cavia. Da vecchie culture di questo germe l'A. poté differenziare uno stafilococco le cui colonie erano identiche alle altre, ma i cui singoli elementi si presentavano non più capsulati ed erano avirulenti per la cavia. Il Gilbert considera questi stafilococchi in fase « R » e dice che nelle culture conservavano la loro caratteristica, mentre riacquistavano la virulenza e la capsula — ridivenendo, quindi, in fase « S » — per mezzo di successivi passaggi attraverso gli animali.

Per altra via Seppilli e Denes (1932) giungono a conclusioni parallele a quelle del Sabatucci. Saggiando con il metodo del Gram da loro modificato (colorazione con violetto di genziana per due minuti, trattamento con liquido Lugol per due minuti, decolorazione con alcool a 33° per 15 minuti, colorazione di contrasto con fucsina basica diluitissima) un ceppo di stafilococco aureo, di recente isolamento da un caso umano di piodermite, essi constatarono una fase avirulenta — che essi considerano come variante « S » — Gram negativa. I due AA. non parlano di modifiche morfologiche che le due colonie in presupposta fase « R » ed « S » avrebbero subito, ma nelle conclusioni scrivono che con il loro metodo di colorazione « è possibile accompagnare, anche per quei germi i quali non subiscono nelle variazioni di fase una modificazione rilevabile dei caratteri morfologici, le variazioni stesse ». Dal che si può dedurre che Seppilli e Denes, pur convinti di trovarsi di fronte a fenomeni dissociativi dello stafilococco in questione, non sono riusciti — ugualmente al Sabatucci — a dimostrarli morfologicamente.

Le ricerche di Sabatucci e di Seppilli e Denes furono in seguito confermate da Chiatellino e Ravasini (1934) e dal Pavan (1936).

Chiatellino e Ravasini comparando il metodo della agglutinazione alla tripaflavina con quello della resistenza al procedimento del Gram alquanto modificato, poterono accertare la comparsa di forme di variazione a carattere regressivo dei germi, corrispondenti ad una degradazione del loro potere patogeno se non a modifiche del loro aspetto morfologico e culturale.

Pavan, operando su 66 ceppi di stafilococchi isolati dalle fauci umane, poté constatare come le due fasi « S » ed « R » degli stafilocchi di

primo isolamento fossero bene messe in evidenza dall'agglutinazione alla tripaflavina pur non differenziandosi molto fra loro morfologicamente; come le due fasi sembrassero in rapporto con il potere cromogeno delle tre varietà degli stafilococchi stessi, presentando il dorato maggior numero di forme « S » che non il giallo e meno ancora il bianco; come la fase « R » fosse più resistente della « S » di fronte al Gram; e come la varietà bianca fosse la più frequente e, perciò, presumibilmente la varietà saprofita.

Le prime osservazioni su modifiche morfologiche nelle colonie « S » ed « R » dello stafilococco furono osservate dall'Hoffstadt e Youmans (1932) i quali in un *Micrococcus pyogenes aureus*, isolato da un ascesso, e che dava colonie lisce, rotonde, umide, giallo-arancio ottennero, mediante l'azione del cloruro di litio e per mezzo di passaggi attraverso animali, colonie « R » — delle quali essi distinguono ben otto varietà — la cui caratteristica generale era quella di presentare i margini frastagliati e sinuosi, nonchè variazioni nel colore; infatti, mentre le colonie « S » erano gialle, le colonie « R » potevano essere gialle o bianche. Per di più essi notarono variazioni nel comportamento sugli zuccheri. Non variava, invece, la resistenza al Gram nè l'aspetto morfologico dei singoli germi. La fase « R » era priva di potere patogeno.

Accanto alle forme « S » ed « R », morfologicamente variate, gli AA. notarono una fase « G » nel senso di Hadley, Delves e Klimek (1931), vale a dire una fase filtrabile che presentava caratteristiche morfologiche e culturali proprie ed era priva di potere patogeno.

Pinner e Voldrich (1932) videro sorgere spontaneamente in culture di ceppi patogeni di stafilococco aureo colonie non patogene di stafilococco albo, citreo e roseo, ed ammisero che i rapporti intercorrenti tra il ceppo aureo e quello albo fossero essenzialmente simili a quelli tra le fasi « S » ed « R » degli altri microrganismi.

Con culture in terreni alla bile, Nicolosi (1934) sarebbe riuscito ad ottenere varianti dello stafilococco. Dal lavoro di questo A., però, non si capisce bene in che cosa consistano queste varianti, perchè vi è una certa confusione tra le osservazioni fatte sul coli e quelle sullo stafilococco. Un elemento, però, appare chiaro: che le colonie considerate dall'A. in fase « R » (senza averne però specificato le caratteristiche) si presentavano di colorito grigio-giallastro, mentre quelle in fase « S » erano piuttosto chiare.

Nello stesso anno (1934) Veronese è riuscito a determinare col calore e con l'azione del batteriofago antistafilococcico profonde modificazioni nella pigmentazione, nella disposizione e nel comportamento al Gram dei micrococchi piogeni e non piogeni, concludendo da ciò che gli stafilococchi piogeni sono riportabili tutti a una unica specie, e che le tre varietà sono trasformabili l'una nell'altra.

Come varianti « G » furono considerate dalla Swingle (1934) delle microcolonie di stafilococco aureo ottenute da vecchie culture o da culture in brodo al cloruro di litio, caratteristica di questa variante sarebbe soltanto la piccolezza delle colonie e la scarsa patogenicità. Tale variante fu in seguito riveduta dal Chinn (1936).

Recentemente, infine, Roचाix e Rivollier (1936) coltivando sei ceppi di stafilococco aureo in brodo T (Truche, Cramer e Cotoni) ottennero in capo ad alcuni passaggi culture costituite da piccoli grumi sospesi in un liquido più o meno chiaro. Una o due gocce di queste culture grumose insemensate, dopo diluizione in brodo ordinario, su agar normale, diedero, dopo 24 ore di termostato, origine a due tipi di colonie che gli AA. indicano come tipo A e tipo B.

Le colonie del tipo A erano piccole, opache e presentavano un pigmento giallo più o meno scuro o dorato; in brodo davano dei fiocchi che precipitavano in fondo al tubo lasciando il brodo limpido; il loro grado di patogenicità era elevato, il loro potere antigene forte. Quelle del tipo B erano più grandi, molto bianche e quasi porcellanee; in brodo davano culture omogenee, un leggero velo in superficie e piccolo deposito bianco in fondo al tubo; il loro grado di patogenicità basso, il loro potere antigene scarso.

Nè le colonie del tipo A nè quelle del tipo B, reversibili tra loro, venivano agglutinate dalla tripaflavina, mentre dei sei ceppi originali di stafilococco impiegati per questo studio tre venivano agglutinati e tre no, per cui gli AA. concludono che la dissociazione da loro ottenuta è di un'altra natura rispetto a quella osservata dal Sabatucci.

Da una fiala di vaccino, di cui contrallavo la sterilità, ottenni, mediante culture in brodo, un germe che al primo esame morfologico mi si rivelò per un cocco Gram positivo disponentesi a grappolo. In ogni modo,

allo scopo di meglio studiare il germe coltivato e di vedere se si trattasse di una sola o di più specie, allestii varie piastre in agar.

Potei, così, convincermi che si trattava realmente di una unica specie di germi che davano piccole colonie perfettamente circolari, leggermente convesse, bianche lucenti, porcellanacee, costituite tutte da cocchi Gram positivi.

L'osservazione sarebbe finita lì se non avessi in seguito — essendo rimaste le capsule per 48 ore sul mio tavolo — notato che numerose colonie avevano cambiato aspetto: i margini non erano più perfettamente

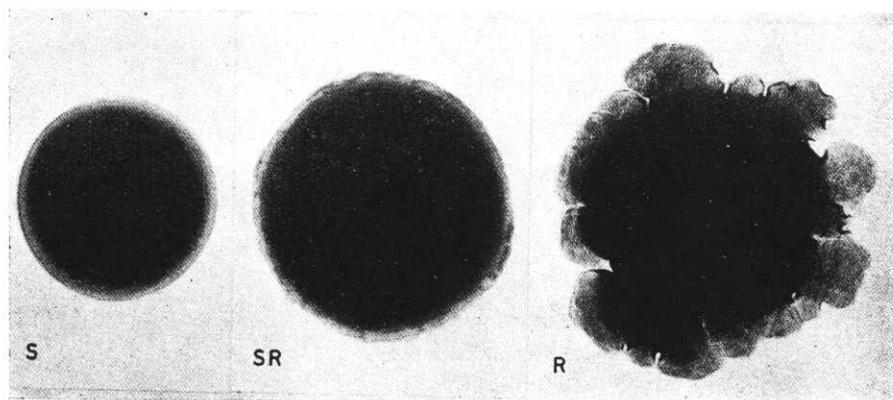


FIG. 1.

regolari e lisci, ma erano divenuti irregolari e leggermente frastagliati. Anche il colore di queste colonie era mutato: non erano più bianche porcellanacee, ma bianco-avorio e meno lucenti.

Interpretando queste modifiche come variazioni nel senso di Arkwright ho proceduto ad allestire su piastre subculture delle colonie a margini lisci e di quelle a margini irregolari, allo scopo di vedere se mi fosse stato possibile isolare colonie sicuramente in fase « S » e colonie in fase « R ».

Dopo alcuni passaggi, infatti, ottenni piastre in cui si sviluppavano tutte colonie (fig. 1 S) rotondeggianti, non molto grandi, a margini regolari a superficie liscia, di colore bianco porcellanaceo; e piastre in cui le colonie, sin dal loro primo apparire, presentavano i margini irregolari, dapprima semplicemente frastagliati (fig. 1 SR), poi dentellati (figura 1 R), con sinuosità marcate e propagini a tipica forma di foglia di

rovere. La grandezza di queste ultime colonie era maggiore della precedente; il loro colore era sul principio bianco-avorio, bianco-giallastro per volgere sempre più verso il giallo man mano che i caratteri morfologici delle colonie acquistavano più spiccatamente quelli delle forme « R ».

Dalle colonie in fase « S » e da quelle in fase « R » allestii, per striscio, culture su agar a becco di clarino ottenendo patine rigogliose per ambedue le forme, ma con una prevalenza di rigogliosità per la forma « R ». Le due patine, poi, si differenziavano fra loro (fig. 2) per l'aspetto dei margini — lineari e quasi paralleli fra loro nella forma « S »; irregolari, dentellati, con propagini a foglia di rovere nella forma « R » —, per quello della superficie — liscia nella forma « S », rugosa nella forma « R » —, per il colorito — bianco porcellanaceo nella forma « S » giallo nella forma « R » —.

Ho potuto poi constatare che era possibile passare da un tipo all'altro, vale a dire che le due forme erano reversibili tra loro. Ma mentre il passaggio dalla forma « S » alla forma « R » si avverava con facilità, lasciando invecchiare le culture a temperatura ambiente, il passaggio dalla forma « R » a quella « S » era ottenibile soltanto attraverso subculture ripetute ogni 24 ore.

Per questa tendenza delle colonie a trasformarsi spontaneamente e a permanere in fase « R » è da pensare che per il cocco da me isolato la fase « R » sia da considerarsi come la fase normale.

Nel corso delle mie ricerche ho studiato il comportamento delle due forme nelle culture in brodo constatando come ambedue l'intorbidassero omogeneamente con tendenza alla formazione di un deposito più abbon-

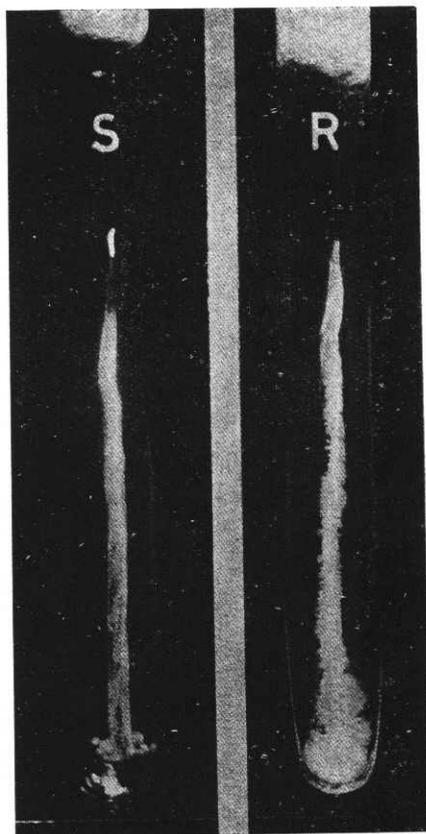


FIG. 2.

dante nella forma « R » la quale dava spesso origine a grumi che aderivano alle pareti delle provette.

Nessuna differenza fra le due forme rispetto all'attività proteolitica (discreta) verso la gelatina; emolitica, negativa; fermentativa verso gli zuccheri (ambedue le forme acidificano il glucosio, il levulosio, il saccarosio e il maltosio e non attaccano la dulcite, la mannite, l'inulina e il lattosio); coagulante il latte (positiva).

Il pH del mezzo non influisce sul sorgere dell'una forma o dell'altra. Il germe cresce tra un pH di 5,6 e uno di 8,2 con un *optimum* tra 7,2 e 7,6. I terreni con un pH di 6,6 danno scarse colonie ma tutte del diametro maggiore di quelle che si ottengono con pH superiori e ciò sia per le forme in fase « S » che per quelle in fase « R ».

Le colonie lisce si stemperano facilmente e rapidamente sia in brodo che in soluzione fisiologica; quelle ruvide, invece, si stemperano con difficoltà, ma quando sono stemperate non si agglutinano spontaneamente anche se il mestruo di diluizione è la soluzione fisiologica e se vengono poste in termostato a 37°.

Le colonie in fase « R » sono agglutinate rapidamente dalla tripafavina all'1 per mille — dopo 60 o 90 minuti di termostato a 37° —; quelle in fase « S » non sono agglutinate subito, ma se conservate per 2 ore in termostato e 4 o 5 ore a temperatura ambiente finiscono per agglutinarsi pur formando grumi meno grossi, meno compatti e meno aderenti alla provetta di quelli formati dai germi in fase « R ».

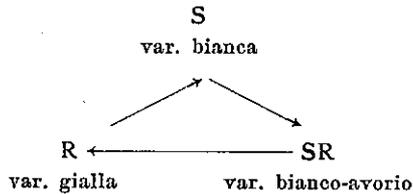
Morfologicamente, i singoli cocchi sono perfettamente identici fra loro e ugualmente reagiscono di fronte alle varie tecniche tintoriali.

Usando, però, la colorazione del Gram modificata da Seppilli e Denes, e di cui si è detto più sopra, i cocchi provenienti dalle colonie in fase « R » conservano la resistenza, mentre quelli delle colonie in fase « S » la perdono.

Rispetto al potere patogeno delle due varianti, non si sono potute fare ricerche, giacché il germe isolato si è mostrato innocuo per il topolino, il ratto, la cavia e il coniglio inoculati tutti sia sottocute che nel peritoneo, il coniglio anche endovena.

Da quanto esposto risulta, quindi, che il germe isolato è uno stafilococco saprofito il quale, in conseguenza dell'invecchiamento e della temperatura, è capace di differenziarsi in due varianti « S » bianca ed « R »

gialla con una forma di passaggio « SR » bianco-avorio. Essendo le forme « S » ed « R » reversibili tra loro e non avendo potuto osservare una forma « RS », presumibilmente le variazioni si compiono secondo il seguente schema.



RIASSUNTO

L'A. descrive le mutazioni di uno stafilococco non patogeno isolato da una fiala di vaccino inquinato, mutazioni caratterizzate da variazioni morfologiche, cromogene, agglutinanti e tintoriali.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Lab. di Batteriologia. Novembre 1937-XVI.

BIBLIOGRAFIA

1. CHIATELLINO A. e RAVASINI G. - « Ricerche sulla dissociazione negli stafilococchi - Agglutinazione e Gramresistenza degli stafilococchi nei focolai suppurativi » - Boll. Ist. Sier. Mil., 12, 815 (1934).
2. CHINN B. D. - « Characteristics of small colonies variants of *Shigella paradysenteriae* and *Staphylococcus aureus* » - Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 31, 891 (1934).
3. GILBERT O. - « Dissociation in an encapsulated staphylococcus » - Journ. of. Bact. 21, 157 (1931).
4. HADLEY PH., DELVES E. e KLIMER J. - « The filtrable forms of Bacteria: A filtrable stage in the life history of the Shiga dysentery bacillus » - Journ. of Infect. Dis., 48, 1 (1931).
5. HOFFSTADT R. E. e YOUNG G. P. « *Staphylococcus aureus*. Dissociation and its relation to infection and to immunity » - Journ. of Infect. Dis., 51, 216 (1932).
6. NICOLOSI G. - « Fenomeni dissociativi del *B. coli* e dello Stafilococco coltivati in vivo ed in vitro nella bile » - Pathologica, 26, 460 (1934).
7. PAVAN G. - « Alcune ricerche sui fenomeni dissociativi degli stafilococchi isolati dalla gola dell'uomo » - Boll. Ist. Sier. Mil., 15, 692 (1936).
8. PINNER M. e VOLDRICH M. - « Derivation of *Staphylococcus albus*, *citreus* and *roseus* from *Staphylococcus aureus* » - Journ. of Infect. Dis., 50, 185 (1932).

9. ROCHAIX A. e RIVOLLIER P. - « Sur une dissociation du staphylocoque » - C. R. Ac. d. Sc., 203, 213 (1936).
 10. SABATUCCI M. - « Phenomènes de dissociation microbienne dans les staphylocoques, révélables par la Tripafflavine » - Soc. Int. di Microb. Boll. d. Sez. Ital., 3, 175 (1931).
 11. SABATUCCI M. - « La dissociazione del *Micrococcus pyogenes* » - Ann. d'Ig. 42, 551 (1932).
 12. SEPELLI A. e DENES G. - « Diversa resistenza al Gram delle fasi « R » ed « S » di alcuni schizomiceti » - Diagn. e Tecn. di Lab., 3, 128 (1932).
 13. SWINGLE E. L. - « Studies on small colony variants of *Staphylococcus aureus* » - Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 31, 891 (1934).
 14. VERONESE I. - « Sulla variabilità della funzione cromogena negli stafilococchi » - Tesi della Scuola di Perfezionamento in Igiene della R. Univ. di Padova (1934).
-
-
-