

## **COMUNICAZIONI LIBERE**

## **Applicazione della gas-cromatografia alla diagnosi delle infezioni da germi anaerobi**

M.G. MENOZZI, M. TONI e G.C. SCHITO

*Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi di Parma*

Le infezioni da germi anaerobi sono assai comuni. Questi microorganismi sono stati ritenuti responsabili di processi infettivi soprattutto a livello toracico, intraddominale e pelvico e nel corso di infezioni conseguenti ad interventi sul grosso intestino [1-5].

Dal punto di vista batteriologico una diagnosi anche solo presuntiva della presenza di germi anaerobi in un materiale patologico richiede da un minimo di 48 ore a 7-10 giorni qualora si desideri perseguire una accurata identificazione dei germi [6]. Il tempo richiesto da queste analisi per essere compatibile con le esigenze cliniche e terapeutiche del curante deve essere drammaticamente ridotto.

Da tempo è noto che gli anaerobi associati ad infezioni quali *Bacteroides*, *Fusobatteri* e *Clostridi* producono dal metabolismo dei carboidrati e delle proteine, acidi grassi a corta catena di carbonio. Questi metaboliti sono così caratteristici da essere stati utilizzati a fini tassonomici nelle classificazioni degli anaerobi [6, 7].

Sulla scorta di queste considerazioni nel 1974 Gorbach e Coll. [8] hanno potuto dimostrare con l'uso della gas-liquido cromatografia diretta sul campione una buona correlazione tra presenza di acidi grassi a catena corta nei materiali patologici e reperto colturale di germi anaerobi e soprattutto di *B. fragilis*. Questi dati sono stati ripresi ed in parte confermati da Phillips [9].

Nell'Istituto di Microbiologia di Parma già da tempo esiste un settore che si dedica all'isolamento ed all'identificazione dei germi anaerobi. La possibilità offerta dalla gas-cromatografia di fornire una rapida diagnosi qualitativa di presenza o meno di questo tipo di flora è stata quindi immediatamente recepita ed utilizzata per le implicazioni di rapidità e di semplicità che comporta in aderenza con la necessità di fornire al medico curante nel più breve tempo possibile una diagnosi eziologica di infezione. In questo

studio vengono riferiti i risultati relativi all'analisi gas-cromatografica di 123 campioni di pus, per lo più di provenienza addominale. È stato valutato il grado di correlazione tra gas-cromatografia ed esame microscopico e colturale del campione ed è stata considerata la validità della gas-cromatografia in relazione alle indicazioni cliniche e terapeutiche che può suggerire.

#### MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 123 campioni di pus od essudato provenienti da diversi distretti dell'organismo e da svariati tipi di lesioni. I materiali erano utilizzati separatamente per l'analisi batteriologica e gas-cromatografica. I dati riguardanti l'idoneità del prelievo e la presenza in esso di antibiotici erano desunti dalle informazioni cliniche pervenute a cura dei medici dei reparti.

##### *Analisi batteriologica*

Per ogni campione è stato eseguito l'esame microscopico diretto, lo esame colturale per la ricerca dei germi aerobi ed anaerobi e l'UV-test (secondo Myers e Coll. [10]) per l'evidenziazione rapida di *B. melaninogenicus*.

I terreni utilizzati per le colture primarie sono stati Agar-sangue, Mc Conkey Agar e brodo tioglicollato per l'analisi degli aerobi e Agar-sangue-neomicina, incubato in assenza di ossigeno per l'isolamento degli anaerobi.

L'identificazione dei germi aerobi avveniva utilizzando prove biochimiche standard [11] e l'antibiogramma era effettuato col metodo Stokes modificato [12].

L'identificazione dei germi anaerobi era ottenuta utilizzando il micro-metodo in gallerie API 20A in accordo con le istruzioni della ditta produttrice.

##### *Analisi gas-cromatografica*

Veniva utilizzato un gas-cromatografo Varian mod. 3700, a doppia colonna, dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma. Le colonne erano in vetro pyrex, lunghe 150 cm e con diametro interno di 0,4 cm, impaccate con la sola fase solida costituita da Chromosorb 101. Il gas di trasporto era l'azoto puro (35 ml/min) mentre l'idrogeno puro (40 ml/min) e l'aria (300 ml/min) fornivano la fiamma. La temperatura del forno veniva fissata a 145 °C, mentre quella del rivelatore era 190 °C. La sensibilità del rivelatore era regolata su  $10 \times 10^{-11}$  amp/mV e, l'attenuazione era di 4 X.

Il risultato dell'analisi era trascritto sotto forma di grafico da un registratore a penna Varian mod. 9176, inserito in serie allo strumento (portata del registratore 1 mV fondo-scala, velocità della carta 0,25 cm/min).

Un  $\mu\text{l}$  di una soluzione acquosa standard di acidi grassi a catena corta veniva sottoposto a cromatografia per ottenere una curva di controllo dei tempi di ritenzione dei vari acidi grassi che consentiva l'identificazione dei metaboliti svelati dall'analisi dei materiali patologici [13].

La soluzione di controllo constava di 10 mEq/l di ciascuno dei seguenti acidi grassi volatili: acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerianico, valerianico, isocaproico, caproico. Conteneva inoltre 40 mEq/l di acido lattico e succinico, acidi grassi non volatili che vengono facilmente distrutti dalle alte temperature di lavoro [14]; quantità inferiori di questi composti possono essere rivelate solo previa metilazione.

Di ciascun materiale patologico veniva analogamente analizzato 1  $\mu\text{l}$  iniettato direttamente nello strumento senza alcun pretrattamento.

La durata normale di una analisi gas-cromatografica con questo metodo è 30 minuti.

La presente metodica ci è stata suggerita dal Prof. I. Phillips prima della sua pubblicazione.

#### *Valutazione della concentrazione minima inibente (C.M.I.) dei ceppi di B. fragilis*

I livelli di C.M.I. nei 30 ceppi isolati di *Bacteroides fragilis* sono stati determinati in piastre di Agar-sangue-lisato contenenti diluizioni scalari degli antibiotici e insemenate con la tecnica del « Multipoint-inoculator » (PBI).

Gli antibiotici saggiati sono stati penicillina, cloramfenicolo, clindamicina, tetraciclina, cefaloridina, lincomicina, rifampicina.

I risultati sono stati letti dopo 48 ore di incubazione in atmosfera anaerobica come precedentemente descritto.

#### RISULTATI

Nei primi 4 mesi del 1978 sono stati analizzati 123 campioni di pus provenienti da diversi reparti di degenza dell'Ospedale di Parma (in particolare da reparti chirurgici). Acidi grassi sono stati riscontrati in 84 campioni su 123, mentre germi anaerobi sono stati isolati in 37 casi.

La Tab. 1 riassume i risultati ottenuti con la gas-cromatografia dei campioni. In assenza di acidi grassi non sono mai stati isolati germi anaerobi. In presenza di acido acetico da solo o con acido propionico non è mai stato isolato alcun anaerobio, ma talora il campione conteneva germi aerobi o anaerobi facoltativi. Anche in presenza di acido acetico e propionico più o meno associati ad altri acidi grassi, ma con l'esclusione di acido isobutirrico, butirrico e succinico non sono mai stati isolati germi anaerobi

TABELLA 1

## Correlazione tra metaboliti in gas-cromatografia e isolamento di anaerobi

METABOLITI (*) IN G.C.	Casi numero	Isolamento di anaerobi in coltura	Isolamento di <i>B. fragilis</i>
Assenti . . . . .	39	—	—
A . . . . .	7	—	—
A,P . . . . .	20	—	—
A,P e associazioni varie . . . . .	17	—	—
A,P,IB,B e associazioni varie . . . . .	21	19	—
A,P,IB,B,S, e associazioni varie . . . . .	17	16	15
A,P,V,C . . . . .	1	1	—
A,L,IC,C . . . . .	1	1	—

(\*) Acidi: A, acetico; P, propionico; IB, isobutirrico; B, butirrico; IV, isovalerianico; V, valerianico; L, lattico; IC, isocaproico; C, caproico; S, succinico.

stretti tranne due casi dove all'isolamento di due germi anaerobi Gram positivi non ha fatto riscontro un tracciato gas-cromatografico comprendente questi ultimi metaboliti. La contemporanea presenza di acido acetico, propionico, isobutirrico e butirrico, associati o no ad altri acidi grassi con l'esclusione di acido succinico ha dimostrato una ottima correlazione con l'isolamento di anaerobi escluso però il *B. fragilis* mentre erano presenti anche specie diverse di *Bacteroides*. La sola associazione di acido acetico propionico, isobutirrico, butirrico e succinico si è dimostrata nella nostra, casistica ottimo indice della presenza di *B. fragilis* anche con l'eventuale presenza di altri acidi grassi e di altri germi associati. Infine al riscontro gas-cromatografico di acido acetico, propionico, valerianico e caproico, ha corrisposto in un unico caso l'isolamento di *Peptostreptococcus*.

La Tab. 2 mette in evidenza la correlazione esistente tra i vari dati ottenuti nelle analisi dei 123 campioni di pus. In particolare vi è considerato l'aspetto alla colorazione di Gram in confronto con i referti gas-cromatografici e colturali.

Su 123 campioni 37 (30 % circa) hanno dato sviluppo di anaerobi con o senza flora aerobica associata.

Ogni qual volta la coltura ha portato all'isolamento di anaerobi, questa positività era stata anticipata di 48 ore dall'analisi gas-cromatografica che ha consentito al chirurgo di considerare gli anaerobi come parte del

TABELLA 2

Correlazione tra i dati ottenuti dall'analisi di 123 campioni di pus

REPERTO CULTURALE	Numero	Percentuale	G.C. POSITIVA		COLORAZIONE DI GRAM			TRATTAMENTO ANTIBIOTICO PRIMA DEL PUNZIEVO	
			I.R.S. ± altri metaboliti	Percentuale	Assenza batteri	Non signif- icativa per anaerobi	Significa- tiva per anaerobi	Si (79%)	No (21%)
Negativo . . . . .	26	21	1	4	12	12	2	20	6
Sviluppo di soli aerobi . . . . .	60	49	3	5	1	47	12	46	14
Sviluppo di soli anaerobi . . . . .	4	3	4	100	—	1	3	2	2
Sviluppo di aerobi e anaerobi . . . . .	33	27	33	100	—	2	31	29	4
TOTALE . . . . .	123	100	41	—	13	62	48	97	26

quadro clinico con grande anticipo. Solo in quattro casi (3,3 %) la gas-cromatografia ha indicato positività in assenza di riscontro colturale.

È pertanto possibile che la gas-cromatografia dia una falsa positività (in rarissimi casi, 3,3 %) mentre non sono mai state viste false negatività.

Valutando l'idoneità del campione si nota dalla Tab. 2 che il 79 % dei pazienti aveva ricevuto terapia antibiotica immediatamente prima del prelievo del campione di pus. Stupisce pertanto a questo punto l'alta correlazione di positività che si osserva tra gas-cromatografia e tecniche colturali (37/41). Ciò è probabilmente dovuto alla compartimentalizzazione delle raccolte ascessuali che non consente il raggiungimento di una concentrazione sufficiente dei farmaci usati nella sede dell'infezione. Nel 79,5 % dei casi colturalmente positivi erano presenti antibiotici (77/97).

La frequente non piena idoneità del campione è anche sottolineata dal fatto che in molti casi (11,3 %) forme batteriche osservate al microscopio non hanno dato luogo a sviluppo in coltura.

Benchè l'esame batterioscopico diretto eseguito con la colorazione di Gram non possa dare indicazioni precise sul tipo di flora presente, non di meno si dimostra un utile elemento informatore sia pure presuntivo che può fornire all'occhio esperto valide indicazioni anche se meno sicure di quelle della gas-cromatografia.

La Tab. 3 riporta le specie aerobiche ed anaerobiche isolate e con la loro identificazione definitiva. Poiché l'origine prevalente dei campioni di pus che formano l'oggetto del presente studio è addominale, la distribuzione dei ceppi è in buon accordo con studi analoghi condotti altrove [2, 15]. In particolare anche in questa statistica i *Bacteroides* rappresentano il 50 % di tutti i ceppi anaerobi isolati, mentre tra gli aerobi più rappresentati è evidente la prevalenza degli enterobatteri componenti la flora fecale normale.

Benchè il *B. fragilis* sia assai patogeno non è necessario eseguire l'antibiogramma su questi stipti in quanto il loro spettro di sensibilità, sia pure ristretto, è assai stabile e si modifica lentamente.

È invece necessario monitorare ambiente per ambiente quale sia il profilo di refrattarietà ai farmaci dei germi che vi si isolano. In assenza di dati precedenti riguardanti i *B. fragilis* isolati in Italia si è provveduto a valutare la concentrazione minima inibente degli antibiotici disponibili per l'uso clinico e che abbiano indicazione nelle infezioni sostenute da germi anaerobi.

La Tab. 4 mostra la percentuale cumulativa di sensibilità dei 30 ceppi clinici di *B. fragilis* valutata come M.I.C. nei confronti di penicillina, clo-ramfenicolo, clindamicina, tetraciclina, cefaloridina, lincomicina e rifampicina. Questi dati in particolare confermano la refrattarietà del *B. fragilis* alle penicilline ed alle cefalosporine, ma non evidenziano una particolare tendenza alla poliresistenza degli isolati nel nostro ambiente.

TABELLA 3

## Flora batterica isolata dai 97 campioni positivi analizzati

ANAEROBI	Numero	TOTALE	AEROBI ED ANAEROBI FACOLTATIVI	Numero
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> . . . . .	9		<i>E. coli</i> . . . . .	46
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>thetaiotaomicron</i> . . . . .	4		<i>K. aerogenes</i> . . . . .	13
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>distasonis</i> . . . . .	2		<i>K. pneumoniae</i> . . . . .	5
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> . . . . .	11		<i>P. mirabilis</i> . . . . .	18
<i>Bacteroides corrodens</i> . . . . .	4		<i>M. morgani</i> . . . . .	4
<i>Bacteroides coagulans</i> . . . . .	2		<i>C. freundii</i> . . . . .	3
		32	<i>S. marcescens</i> . . . . .	8
<i>Fusobacterium</i> sp . . . . .	1		<i>S. liquefaciens</i> . . . . .	1
<i>Fusobacterium mortiferum</i> . . . . .	4		<i>E. cloacae</i> . . . . .	3
<i>Fusobacterium nucleatum</i> . . . . .	2		<i>E. aerogenes</i> . . . . .	2
		7	<i>P. aeruginosa</i> . . . . .	13
<i>Clostridium</i> sp . . . . .	1		<i>S. aureus</i> . . . . .	8
<i>Clostridium septicum</i> . . . . .	3		<i>S. epidermidis</i> . . . . .	13
<i>Clostridium hastiforme</i> . . . . .	1		<i>S. viridans</i> . . . . .	6
<i>Clostridium felsineum</i> . . . . .	2		<i>S. faecalis</i> . . . . .	5
<i>Clostridium sordelii</i> . . . . .	1		<i>S. <math>\beta</math>-emolitico</i> gr. C . . . . .	1
		8	Streptococchi microaerofili . . . . .	2
<i>Peptococcus prevotii</i> . . . . .	12			
<i>Peptococcus constellatus</i> . . . . .	1			
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> . . . . .	2			
<i>Peptococcus magnus</i> . . . . .	1			
		16		
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> . . . . .	1			

TABELLA 4

Attività di agenti antibatterici nei confronti di *B. fragilis*

	% Cumulativa di sensibilità (M.I.C. MG/L)												
	0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	64,0	128,0	256
Penicillina . . . .	—	—	—	—	7	10	30	57	77	90	100	—	—
Cloramfenicolo . .	—	—	—	—	—	—	7	37	70	100	—	—	—
Clindamicina . . .	23,5	50,5	74	84	94	—	97	—	—	—	—	100	—
Tetraciclina . . . .	7	10	—	—	—	—	23	50	70	80	87	100	—
Cefaloridina . . . .	—	—	—	—	—	4	—	—	44	91	94	97	100
Lincomicina . . . .	—	—	—	3	—	53	83	97	—	—	—	100	—
Rifampicina . . . .	40	70	73	83	90	93	—	—	—	—	—	—	100

## DISCUSSIONE

La nostra esperienza, anche se basata solo su cinque mesi di lavoro e quindi bisognosa di una più ampia casistica, consente di affermare che la gas-cromatografia eseguita direttamente sui campioni clinici è effettivamente in grado di apportare un significativo contributo all'efficienza della microbiologia medica.

Il tipo di analisi gas-cromatografica utilizzata nel presente studio è assai diverso dalle metodiche precedentemente descritte [8, 9]. Le colonne di separazione infatti non contengono nel nostro caso una fase liquida, ma solo una fase solida costituita da copolimeri aromatici microporosi di polistirene legati con legami crociati con divinil-benzene (Chromosorb 101) in accordo con quanto proposto da Ragosa e Love [13]. Questa modifica rende la presente tecnica assai più semplice e maneggevole in quanto permette di risolvere gli acidi grassi a catena corta inoculando direttamente 1  $\mu$ l di pus senza ulteriori manipolazioni dei campioni quali acidificazioni, estrazioni o metilazioni dei composti non volatili.

La metodica da noi utilizzata ci permette in sintesi di individuare alcune situazioni ben precise:

- assenza di metaboliti, A e P soli trovano un reperto culturale certamente negativo per gli anaerobi;
- acido succinico insieme a IB-B rivela chiaramente *B. fragilis*;
- IB-B insieme ad altri confermano la presenza degli anaerobi più spesso associati ad infezioni, quali Bacteroides, Fusobatteri e Clostridi.

È importante infine rilevare che essa risponde perfettamente alle esigenze del clinico che si possono ricondurre a due quesiti fondamentali: in questo campione di materiale prelevato in modo tale da poter essere significativo esistono germi anaerobi? Se esistono, tra essi si trova il *B. fragilis*?

In meno di un'ora dall'arrivo del campione noi siamo in grado di indirizzare il clinico prima alla diagnosi e poi se occorre alla scelta della terapia.

Da ultimo vogliamo precisare che in moltissimi casi l'esame non è risultato essenziale, limitandosi al completamento rapido di un buon servizio diagnostico, ma in alcuni casi, che non era possibile descrivere in questa sede, ha assunto un interesse vitale.

**Riassunto.** — La diagnosi di infezioni da anaerobi è resa difficoltosa dalla lentezza delle tecniche necessarie all'isolamento e all'identificazione di questi germi.

È pertanto auspicabile l'utilizzazione di metodi rapidi che consentano una diagnosi tempestiva. È noto che gli anaerobi producono acidi grassi a catena corta a partire da vari substrati. Il reperto di questi metaboliti nei materiali patologici può essere utile indice della presenza di tali batteri.

Mediante gas-cromatografia sono stati analizzati numerosi campioni di pus od essudati ed i risultati sono stati correlati con quelli dell'esame colturale, allestito parallelamente sia in aerobiosi che in anaerobiosi.

È stata trovata un'ottima correlazione tra la presenza in quantità significative di acido isobutirrico, butirrico e l'isolamento di flora anaerobica, ed inoltre il reperto di questi metaboliti unitamente ad acido succinico ha trovato costante riscontro nell'isolamento di *Bacteroides fragilis*.

La gas-cromatografia diretta sul materiale patologico è in grado pertanto di fornire, in meno di un'ora, una diagnosi rapida presuntiva di infezione da batteri anaerobi, permettendo così l'adozione immediata di una terapia antibatterica corretta.

**Summary** (*Gas-chromatography in the diagnosis of anaerobic infections*). — The isolation and identification of anaerobic bacteria by biochemical tests take long time, so it is very useful the gas-chromatography to detect the volatile fatty acids produced from their metabolism. This technique can give rapidly a presumptive diagnosis of anaerobic infection so that it is possible to start immediately a correct antibiotic therapy.

In this study we have examined many samples of pus and exudate, and the results have been compared with those obtained from the culture. We have found a good correlation between the detection by gas-cromatography of isobutyric and butyric acids and the isolation in the culture of anaerobic flora, and particularly of *Bacteroides fragilis* when the gas-chromatography detected isobutyric, butyric and succinic acids.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BALOWS, A., DE HAAN, R.M., DOWELL, V.R. Jr. & GUZE (Eds.) 1974. *Anaerobic Bacteria: Role in Diseases*, Thomas, Springfield, Illinois.
2. PHILLIPS, I., & SUBSMAN, M. 1974. *Infection with Non Sporing Anaerobic Bacteria*. Churchill Livingstone, Edimburgh.
3. STUDY GROUP. 1974. Metronidazole in the prevention and treatment of *Bacteroides* infections in gynecological patients. *Lancet*. ii: 1540-1543.
4. STUDY GROUP. 1975. An evaluation of metronidazole in the prophylaxis and treatment of anaerobic infections in surgical patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 1: 393-401.
5. STUDY GROUP. 1976. Metronidazole, in the prevention and treatment of *Bacteroides* infections following appendectomy. *Brit. Med. J.* 1: 318-321.
6. HOLDEMAN, L.V. & MOORE W.E. 1975. *Anaerobe Laboratory Manual*, 3rd ed. V.P.I., Anaerobe Lab. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA.

7. MOORE, W.E.C. 1970. Relationships of metabolic products to taxonomy of anaerobic bacteria. *Int. J. System. Bacteriol.* **20**: 535-538.
8. GORBACH, S.L., MAYHEW, J.W., BERTLETT, J.G., THEADEPALLI, H. & ONDERDONK, A.B. 1974. Rapid diagnosis of *Bacteroides fragilis* infections by direct gas liquid chromatography.
9. PHILLIPS, K.D., TEARLE, P.V. & WILLES, A.T. 1976. Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography of clinical material. *J. Clin. Pathol.* **29**: 428-432.
10. MYERS, B.M., CHERRY G., BORNSIDE, B.B. & BORNSIDE G.H. 1969. Ultraviolet red fluorescence of *Bacteroides melaninogenicus*. *Appl. Microbiol.* **17**: 760-762.
11. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. 1974. *Manual for Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press.
12. TONI, M., MENOZZI, M.G., SCHITO, G.C. 1977. Metodo semplificato di analisi batteriologica delle urine. Vantaggi e limiti dell'antibiogramma diretto eseguito sulle urine. *Ann. Sclavo.* **19**: 1177-1196.
13. ROGOSA, M. & LOVE, L.L. 1968. Direct quantitative gas-chromatographic separation of C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> fatty acids, methanol and ethyl alcohol in aqueous microbial fermentation media. *Appl. Microbiol.* **16**: 283-290.
14. SUTTER, V.L., VARCO, V.L. & FINEGOLD, S.M. 1975. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, 2nd Ed. Ext. Div. University of California, Los Angeles U.S.A.
15. FINEGOLD, S.M. 1977. *Anaerobic Bacteria in Human Diseases*, Academic Press. Inc. N.Y. U.S.A.

## **7 $\alpha$ -Deossidrilazione *in vitro* degli acidi biliari da parte di microrganismi intestinali anaerobi O<sub>2</sub> non tolleranti (\*)**

N. PACINI, A. FERRARI e E. CANZI

*Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Milano*

Il progresso delle ricerche porta oggi a considerare diversi aspetti della funzione degli acidi biliari nell'organismo umano. Il metabolismo degli acidi biliari può essere ritenuto il risultato di un sistema ecologico bilanciato fra ospite, microflora intestinale e dieta. Lo sbilanciamento di tale rapporto nell'uomo può dare quindi luogo a condizioni patologiche varie come ad esempio steatorrea, malassorbimento, formazione di calcoli colesterolici e aterosclerosi; di grande interesse sono inoltre le relazioni tra prodotti di trasformazioni microbiche degli acidi biliari, dieta ed insorgenza del cancro del colon [1-4].

Lo studio delle trasformazioni operate *in vitro* dai microrganismi intestinali sugli acidi biliari, mettendo in luce i rapporti tra composizione della microflora e attività biochimiche, rappresenta una ricerca basilare per poter approfondire le conoscenze *in vivo* sulla fisiopatologia e sulla nutrizione animale.

Una delle principali trasformazioni è la 7 $\alpha$ -deossidrilazione degli acidi biliari primari che porta alla formazione degli acidi desossicolico e litocolico rispettivamente dagli acidi colico e chenodesossicolico.

In questa comunicazione vengono riferiti i dati relativi a ricerche sulla capacità 7 $\alpha$ -deossidrilante di microrganismi anaerobi intestinali in condizioni di stretta anaerobiosi, tali da consentire lo sviluppo di microrganismi O<sub>2</sub> non tolleranti, normalmente presenti in gran numero nell'intestino dei mammiferi.

I nostri esperimenti sono stati condotti sulla microflora del contenuto cecale di topo, utilizzando una cabina per anaerobiosi messa a punto nel-

---

(\*) Ricerca effettuata con il contributo del C.N.R.

L'Istituto di Microbiologia Veterinaria di Milano [5], che ci ha permesso di attuare una vera e propria catena anaerobica dal prelievo dei campioni sino alla incubazione.

Sono stati usati topi albinici (ceppo Swiss Webster) alimenti *ad libitum* con acqua e mangime a composizione standardizzata. I topi venivano sacrificati e posti estemporaneamente nella cabina per anaerobiosi in atmosfera di  $N_2$ :  $H_2$ :  $CO_2$  (85:10:5, v/v) sterilizzati mediante filtrazione (FHL P 02500 Millipore).

In ogni prova i prelievi sono stati effettuati su tre soggetti in modo da costituire un « pool » omogeneo di materiale cecale; circa 1 g di tale materiale veniva sospeso in 9 ml di soluzione fisiologica e da questa sospensione iniziale venivano allestite immediatamente, mediante siringhe, in terreno apposito (Marcus Talalay) [6] aggiunto di colato e di chenodesossicolato di sodio (0,01 %), diluizioni successive a base 10 in triplo. Si è operato in due diverse condizioni sperimentali: nella prima tutte le operazioni (apertura degli animali, prelievo, diluizioni del contenuto intestinale e chiusura delle provette in contenitori Gas Pak (BBL) per l'incubazione) sono state effettuate in cabina; nella seconda solo il prelievo è stato effettuato in cabina, mentre le operazioni successive, compresa la chiusura delle provette nel Gas Pak, sono state condotte in presenza di aria.

Dopo 7 giorni di incubazione, le colture venivano estratte con cloruro di metilene-acetato di etile (1:1, v/v) e cromatografate su strato sottile; l'attività deossidrilante era evidenziata dalla presenza di macchie con Rf 0,63 e Rf 0,78 riferibili rispettivamente agli acidi desossicolico e litocolico.

Il quadro cromatografico mette in evidenza l'accumulo dei prodotti della  $7\alpha$ -deossidrilazione, accompagnato di solito dalla scomparsa degli acidi primari; sono rilevabili inoltre macchie riferibili ad altri metaboliti. Mediante densitometro Vitatron TLD 100 si è constatato che l'accumulo degli acidi desossicolico e litocolico risulta generalmente della stessa entità nelle diverse diluizioni attive.

I dati relativi alle diluizioni in cui si è ottenuta deossidrilazione in  $7\alpha$ , elaborati applicando il metodo M.P.N., esposti come istogrammi nella Fig. 1, consentono di osservare come tale reazione si verifichi, sia per quanto riguarda l'acido colico che l'acido chenodesossicolico a diluizioni più elevate quando si operi in continua assenza di ossigeno.

Si è constatato come il numero dei microorganismi responsabili della trasformazione sia nella seconda serie di 4-5 ordini di grandezza inferiore rispetto a quello della serie allestita in condizioni di « continua » anaerobiosi. In queste ultime colture è stato possibile accertare la presenza di microrganismi  $O_2$  non tolleranti; infatti molte delle colonie ottenute su terreno E.T.S.A. [7], trapiantate dopo esposizione all'aria per 30 min, non hanno più dato luogo a sviluppo di microrganismi. Dall'elaborazione dei

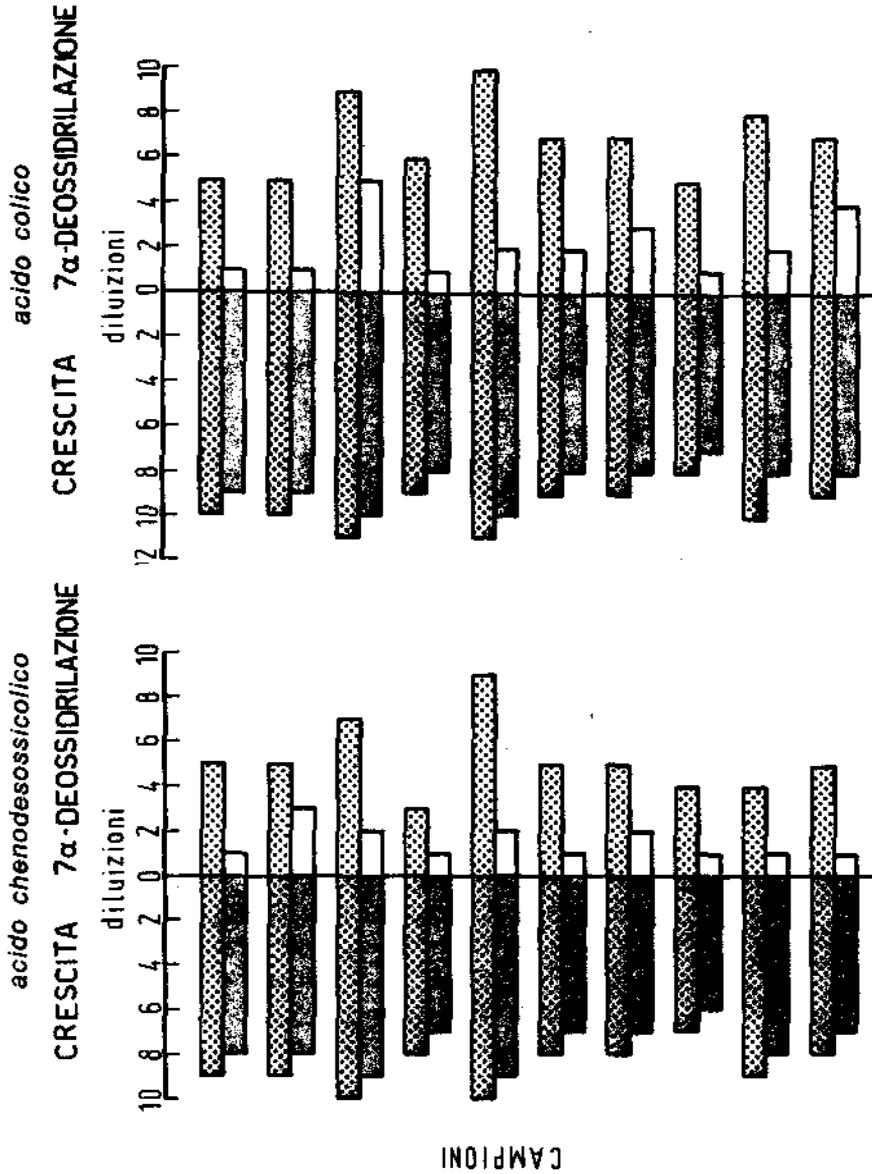


Fig. 1. — Cariche batteriche totali e numero dei microrganismi di contenuto cecale attivi nella 7 $\alpha$ -deossidrilazione degli acidi colico e cheno-desossicolico. [Condizioni di anaerobiosi « continua » (.....) e non ( )].

dati riferibili alla crescita microbica è rilevabile come la carica totale nella seconda serie di diluizioni risulti solo di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella della prima serie (Fig. 1).

È anche evidente come generalmente nelle condizioni sperimentali adottate, a parità di concentrazione (0,01 % sale sodico), la 7 $\alpha$ -deossidrilazione dell'acido colico si ottenga a diluizioni più elevate rispetto a quella dell'acido chenodesossicolico.

Per saggiare ulteriormente l'influenza dell'ossigeno sulla microflora, si è ripetuta la prova confrontando l'attività 7 $\alpha$ -deossidrilante della sospensione iniziale subito dopo il prelievo e dopo esposizione all'aria per 15 min in ambiente sterile.

I risultati relativi a queste ultime due serie di diluizioni non mostrano significative differenza tra di loro e rispetto alla serie effettuata in aerobiosi immediatamente dopo il prelievo (Fig. 2).

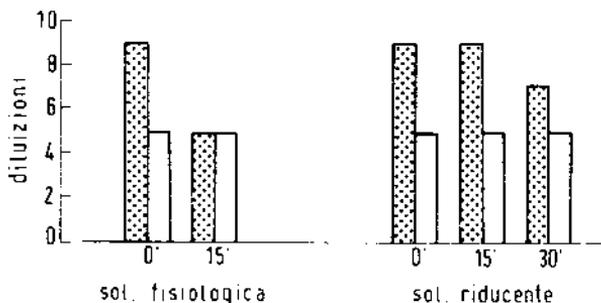


Fig. 2. — Numero dei microrganismi di contenuto cecale attivi nella 7 $\alpha$ -deossidrilazione dell'acido colico ottenuti in sospensione iniziale in soluzione fisiologica e in soluzione riducente prima e dopo esposizione all'aria [Condizioni di anaerobiosi « continua » (▤) e non (▥)].

Successivamente si è proceduto come nell'esperimento precedente utilizzando per la sospensione del materiale cecale, in sostituzione della soluzione fisiologica, una apposita soluzione tampone riducente protettiva [8]. Non si è avuta variazione significativa tra le serie allestite in anaerobiosi « continua » prima e dopo 15 min di esposizione all'aria, mentre si è notato un minor numero di microrganismi quando l'esposizione si è prolungata per 30 min.

Pertanto il liquido riducente si è mostrato in grado di proteggere dallo ossigeno i microrganismi della sospensione cecale. Le serie allestite in aerobiosi, hanno dato, invece, uguali risultati, sia sospendendo il materiale cecale in soluzione fisiologica che in liquido riducente.

Sembrirebbe quindi che il contatto con l'ossigeno, che si verifica con l'esposizione all'aria della sospensione iniziale in soluzione fisiologica, risulti dannoso per i microrganismi  $O_2$  non tolleranti quanto l'inevitabile esposizione all'ossigeno delle diluizioni allestite in aerobiosi.

Si è effettuata inoltre una prova saggiando, nelle condizioni precedenti, una sospensione di *Clostridium bifermentans*,  $O_2$  tollerante, in grado di operare questa trasformazione, come da noi precedentemente riscontrato [9]. Dai risultati riportati in Fig. 3 risulta che questo microrganismo effettua la  $7\alpha$ -deossidrilazione allo stesso modo in ambedue le condizioni sperimentate.

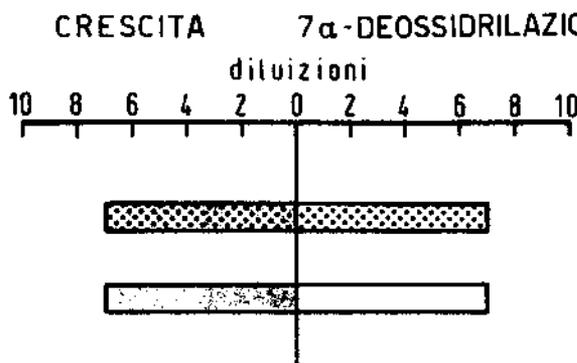


Fig. 3. — Numero di cellule di *Clostridium bifermentans* SD 10 attive nella  $7\alpha$ -deossidrilazione dell'acido colico. [Condizioni di anaerobiosi « continua » (▨) e non (□)].

L'insieme dei dati rende verosimile l'ipotesi che i microrganismi anaerobi  $O_2$  non tolleranti, presenti in numero maggiore di quelli  $O_2$  tolleranti, siano da considerarsi i maggiori responsabili della trasformazione degli acidi colico e chenodesossicolico nella microflora di ceco di topo; questa trasformazione tuttavia si verifica anche per altri microrganismi in condizioni di anaerobiosi non stretta.

È del resto probabile che le difficoltà richieste per l'isolamento e lo sviluppo dei microrganismi anaerobi  $O_2$  non tolleranti non abbia permesso sinora l'evidenziazione della loro attività sugli acidi biliari.

È nostro intento proseguire le ricerche nel tentativo di isolare ceppi di microrganismi  $O_2$  non tolleranti in grado di operare questa trasformazione in coltura pura.

**Riassunto.** — È stata studiata la capacità della microflora intestinale di topo di deossidrilare in  $7\alpha$  gli acidi colico e chenodesossicolico. Adottando tecniche che implicano l'attuazione di una catena anaerobica dal prelievo

del contenuto cecale fino all'incubazione delle colture, si è constatato come i microrganismi anaerobi  $O_2$  non tolleranti siano da considerarsi i maggiori responsabili di tale trasformazione.

**Summary** (*7- $\alpha$  Dehydroxylation of bile acids by anaerobic intestinal microorganisms*). — The 7 $\alpha$ -dehydroxylation of cholic and chenodeoxycholic acids by mice intestinal microorganisms was studied.

When all techniques, from autopsy of the animals to final incubation, are performed in oxygen-free environment, it has been found that anaerobic  $O_2$  non tolerant microorganisms might be considered the main responsible for these transformations.

Gli autori ringraziano il sig. Filippo Bruno per la valida assistenza tecnica prestata nel corso delle ricerche sperimentali.

#### BIBLIOGRAFIA

1. NAIR, P. & KRITCHEVSKY, D. 1973. *The bile acids*. Vol. II. Plenum Press, New York-London.
2. BARBARA, L., CORINALDESI, R., RODA, E., LAMI, F., & LIGLIOLI, M. 1974. Problemi di diagnostica nella sindrome da colonizzazione del tenue. In: *Seminario Internazionale - Il Ruolo Terapeutico e Nutrizionale dei Lattobacilli*. Roma, 8-10 maggio, pp. 43-48.
3. DRASAR, S. & HILL, M.J., 1974. *Human Intestinal Flora*. Academic Press, London - New York - San Francisco.
4. GENTILINI, P. 1977. Fisiopatologia delle secrezioni biliari. *Recenti Progressi in Medicina*. **63**: 113-136.
5. FESCE, A., CECCARELLI, A., POLI, G., BALSARI, A. & GIOVANNINI, R. 1977. Metodo per l'isolamento e lo studio di batteri anaerobi ossigeno-intolleranti. *Arch. Vet. Ital.* **28**: 1-9.
6. MARCUS, P., & TALALAY, P. 1956. Induction and purification of  $\alpha$ -and  $\beta$ -hydroxy-steroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **218**: 661-674.
7. ARANKI, A., SYED, S.A., KENNEY E.B. & FRETER R. 1969. Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure. *Appl. Microbiol.* **17**: 568-576.
8. FERRARI, A., PACINI N. & CECCARELLI, A. 1975. Attività dei microrganismi cecali ossigeno non tolleranti nella 7 $\alpha$ -deossidrilazione *in vitro* dell'acido colico. *Ann. Microbiol.* **25**: 57-61.
9. FERRARI, A. & BERETTA L. 1977. Activity on bile acids of a *Clostridium bifermentans* cell-free extract. *Feds Letters*. **75**: 163-165.

## L'aderenza degli anaerobi nella colonizzazione della mucosa vaginale

M.A. TUFANO, P. CATALANOTTI e F. GALDIERO

*Istituto di Microbiologia della I Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Napoli*

Numerosi studi condotti sia su microorganismi saprofiti [1, 2] che patogeni hanno messo in rilievo il ruolo dell'aderenza batterica come fattore determinante nella colonizzazione delle mucose esposte.

Le cellule epiteliali delle mucose posseggono recettori per macromolecole complementari, presenti sulla superficie delle cellule batteriche. È stato posto in evidenza che i germi patogeni generalmente posseggono maggiore capacità di aderenza dei saprofiti [3]. Fenomeni di aderenza e meccanismi di selezione interreagiscono dinamicamente nel mantenimento dell'equilibrio dell'ecosistema.

Per quanto riguarda la mucosa vaginale nella regolazione di tale equilibrio, notevole importanza rivestono di certo stimoli ormonali diversi, che, attraverso modificazioni sia del pH delle secrezioni che del numero di siti leganti presenti sulle cellule epiteliali, contribuiscono alla selezione della flora presente e influenzano l'aderenza dei batteri alle cellule.

Precedenti nostre ricerche sulla aderenza batterica alle cellule vaginali nelle varie fasi del ciclo mestruale, hanno dimostrato modificazioni dell'aderenza in rapporto a condizioni ambientali differenti, causate probabilmente da stimoli ormonali diversi.

Un problema di rilevante interesse è quello che riguarda il ruolo svolto dalla flora anaerobica nella colonizzazione delle mucose esposte. Recenti osservazioni, infatti, tendono ad attribuire un ruolo importante agli anaerobi nella patogenesi delle vaginiti.

Nell'intento di contribuire alle ricerche riguardanti i fattori che influenzano la colonizzazione della mucosa vaginale, abbiamo studiato *in vitro* l'aderenza della flora anaerobia alle cellule epiteliali vaginali nelle diverse fasi del ciclo mestruale.

Le cellule della mucosa vaginale, ottenute da donne clinicamente normali, di età compresa tra i 20 e 30 anni, venivano prelevate in fasi diverse del ciclo mestruale, favorendo la desquamazione mediante tampone. Le cel-

lule venivano immediatamente poste in soluzione salina tamponata (HBSS) con pH corrispondente a quello della secrezione prelevata. I ceppi batterici venivano isolati da donne con o senza infezioni in atto. Le colture venivano eseguite secondo le tecniche convenzionali.

Sono stati isolati e identificati i seguenti ceppi batterici: Sarcine, Veillonelle, Peptostreptococchi, Leptotrix, bacilli sporigeni Gram positivi.

Sospensioni batteriche da colture in fase di crescita esponenziale, venivano usate per i tests di aderenza eseguiti con la metodica descritta in precedenti ricerche [3]. Per ciascun esperimento venivano valutate 50 cellule epiteliali e si procedeva al conteggio dei batteri aderenti.

Sono state inoltre eseguite prove di competizione per i siti leganti delle cellule vaginali, mescolando cellule vaginali con le varie specie batteriche nelle stesse percentuali ed in percentuali differenti (75 % di forme bacillari e 25 % di forme coccoidi).

La Tab. I mostra il numero dei batteri aderenti alle cellule epiteliali vaginali nelle diverse fasi del ciclo mestruale.

TABELLA I

**Numero di batteri aderenti alle cellule epiteliali vaginali durante il ciclo mestruale**

*Batteri per cellula*

	5 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> giornata (pH 4,9 ± 0,2)	14 <sup>a</sup> -16 <sup>a</sup> giornata (pH 4,5 ± 0,2)	22 <sup>a</sup> -24 <sup>a</sup> giornata (pH 5,4 ± 0,2)
Bacilli sporigeni . . . . .	10 ± 3	15 ± 4	8 ± 3
Leptotrix . . . . .	7 ± 2	8 ± 3	5 ± 2
Peptostreptococchi . . . . .	30 ± 5	60 ± 7	20 ± 4
Sarcine . . . . .	35 ± 6	40 ± 6	22 ± 4
Veillonelle . . . . .	40 ± 6	58 ± 7	25 ± 5

I risultati rappresentano la media di 10 esperimenti, ciascuno eseguito in doppio.

La maggiore capacità di aderenza si osserva a metà del ciclo mestruale (14<sup>a</sup>-16<sup>a</sup> giornata). Si nota una scarsissima aderenza di batteri appartenenti al genere *Leptotrix* che sostanzialmente non si modifica nei diversi periodi del ciclo. Scarsa aderenza dimostrano anche gli sporigeni, mentre le forme coccoidi aderiscono in numero maggiore, soprattutto verso la metà del ciclo. In coincidenza con i valori più bassi di pH si osserva un incremento dell'aderenza della flora anaerobia. Nell'ultima fase del ciclo, a valori di pH più elevato, si ha una riduzione dell'aderenza.

Nella Tab. 2 sono riportati i risultati ottenuti con le prove di competizione tra le diverse specie batteriche nell'aderenza alle cellule epiteliali vaginali.

TABELLA 2

**Prove di competizione dell'aderenza alle cellule epiteliali vaginali**

*Batteri per cellula*

SOSPENSIONI BATTERICHE	%	5 <sup>a</sup> -8 <sup>a</sup> giornata	14 <sup>a</sup> -16 <sup>a</sup> giornata	22 <sup>a</sup> -24 <sup>a</sup> giornata
Bacilli sporigeni . . . . .	25	10 ± 3	12 ± 3	7 ± 2
Leptotrix . . . . .	25	5 ± 2	7 ± 2	5 ± 2
Sarcine . . . . .	25	30 ± 5	10 ± 6	20 ± 4
Veillonelle . . . . .	25	35 ± 6	50 ± 7	25 ± 5
Bacilli sporigeni . . . . .	37,50	8 ± 3	10 ± 3	7 ± 2
Leptotrix . . . . .	37,50	5 ± 2	6 ± 2	5 ± 2
Sarcine . . . . .	12,50	32 ± 5	12 ± 6	20 ± 4
Veillonelle . . . . .	12,50	30 ± 5	48 ± 7	22 ± 4

I risultati rappresentano la media di 10 esperimenti, ciascuno eseguito in doppio.

Utilizzando i diversi ceppi nelle stesse proporzioni, si osserva una maggiore aderenza delle forme coccoidi rispetto alle forme bacillari. Adoperando sospensioni contenenti il 25 % di forme coccoidi e il 75 % di forme bacillari, si osserva ugualmente una aderenza maggiore delle forme coccoidi alle cellule vaginali.

Risulta abbastanza chiaro, quindi, che esiste una aderenza specifica legata a siti recettoriali specifici la cui numerosità ed esposizione dipende da vari fattori di diversa natura ed esiste poi una aderenza aspecifica nella quale vengono preferite le forme coccoidi a quelle bacillari probabilmente per ragioni geometriche.

**Riassunto.** — L'aderenza batterica svolge un ruolo predominante nella colonizzazione delle mucose esposte.

Precedenti nostre ricerche sull'aderenza batterica alle cellule vaginali nelle varie fasi del ciclo mestruale hanno dimostrato modificazioni della aderenza in rapporto a condizioni ambientali differenti. Ci è sembrato quindi interessante estendere le nostre ricerche alla flora anaerobia in considera-

zione di recenti osservazioni che tendono ad attribuire un ruolo rilevante alla flora anaerobia nella patogenesi delle vaginiti.

I risultati ottenuti dimostrano che la maggiore capacità di aderenza si osserva a metà del ciclo mestruale.

Si nota una scarsissima aderenza di batteri appartenenti al genere *Leptotrix* che sostanzialmente non si modifica nei diversi periodi del ciclo. Scarsa aderenza dimostrano anche gli sporigeni mentre le forme coccoidi aderiscono in numero maggiore, soprattutto verso la metà del ciclo.

In coincidenza con i valori più bassi di pH si osserva un incremento dell'aderenza della flora anaerobia. Nell'ultima fase del ciclo, a valori di pH più elevati, si ha una riduzione dell'aderenza.

Con le prove di competizione si osserva una maggiore aderenza delle forme coccoidi rispetto alle forme bacillari.

**Summary** (*Bacterial adhesion plays a predominant role in colonising the exposed mucosae*). — Some of our previous research works on bacterial adhesion to vaginal cells in the different phases of the menstruum showed that adhesion changes depending on changing environmental conditions. We therefore considered interesting to extend our investigations to anaerobic flora, in the light of recent observations intended to attribute an important role to anaerobic flora in the pathogenesis of vaginitis.

The results obtained so far indicate that the maximum adhesion capability is found in the middle of the menstruum.

The very low adhesion of bacteria belonging to the *Leptothrix* genus remains substantially unaltered throughout the menstruum.

Low adhesion is also found in sporogenic bacteria, whereas the coccoid ones have a stronger adhesion, particularly about the middle of the menstruum.

With lower pH values adhesion of the anaerobic flora is enhanced, whereas in the final phase of the menstruum, with higher pH values, adhesion is reduced.

Competition tests evidence a stronger adhesion of coccoid as compared to bacillar types.

#### BIBLIOGRAFIA

1. GIBBONS, R.J. & VAN HOUTE J. 1971. Selective bacterial adherence to oral epithelial surface and its role as an ecological determinant. *Inf. Immun.* **3**: 567-573.
2. MARDH, P.A. & WESTROM L. 1976. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells. *Inf. Immun.* **13**: 661-666.
3. GALDIERO, F., TUFANO, M.A., ROSSANO, F. & ROMANO, C. 1977. Modificazioni dell'ecosistema flora batterica-mucosa vaginale durante il ciclo mestruale della donna. *Boll. Ist. Sieroter. Milanese.* **56**: 429-431.

## Conclusione

G. GIUNCHI

*Clinica Medica Generale e Terapia Medica III, Università di Roma*

Al momento della chiusura di questo Convegno desidero rivolgere un vivo ringraziamento all'Istituto Superiore di Sanità e al Prof. Archetti, che ci hanno ospitato. Un ringraziamento particolare debbo ai colleghi inglesi, i quali hanno svolto una preziosa opera di addestramento di giovani studiosi italiani, che non deluderanno i loro Maestri. In Italia si è avviata una promettente attività di ricerca sugli anaerobi, che darà buoni risultati, perché l'entusiasmo è notevole, anche se la partecipazione a questo Convegno è stata limitata.

In apertura del Simposio, il Prof. Archetti ha sottolineato la importanza della flora microbica intestinale, e in particolare della flora anaerobia. Bisogna richiamare l'attenzione sulla pericolosità di tutti gli interventi disennati che in varia misura con dietetici, additivi, terapie e profilassi antibiotiche, noi facciamo su questa flora essenziale. Il problema delle infezioni da anaerobi non interessa soltanto il campo della patologia ma anche quello della fisiologia digestiva. In particolare sarebbe interessante conoscere qualche cosa di più di questo problema in campo pediatrico.

Da queste due intense giornate di lavoro possiamo trarre alcuni insegnamenti, che tenterò di sintetizzare:

1) La importanza del tema delle infezioni anaerobiche è fuori discussione. Non si tratta di un tema per specialisti, ma di un problema di medicina pratica che tutti i medici e chirurghi dovranno tenere in debito conto. Appare di primaria importanza l'aiuto degli specialisti microbiologi, e in modo particolare la opportuna utilizzazione dei laboratori di microbiologia, che dovranno per altro disporre delle tecniche aggiornate per lo studio degli anaerobi.

2) Il secondo punto emerso con molta chiarezza è la tendenza a realizzare semplificazioni nell'ambito microbiologico. Più che le fini distin-

zioni tassonomiche certamente quello che interessa il microbiologo medico è il poter dare risposte sufficientemente rapide e sicure di isolamenti relativi a determinati generi di microrganismi anaerobi.

3) Un terzo punto è la correlazione tra i microrganismi anaerobi isolati e i quadri di malattia osservati. Su questo punto io credo che vi sia ancora parecchio da fare, perché non basta constatare la coincidenza di un isolamento con la presenza di un quadro morboso, per trarne dirette conseguenze di carattere eziologico. È probabile che alcune di queste infezioni abbiano il carattere di infezioni opportunistiche ed è importante precisare il ruolo rispettivo, nelle associazioni degli aerobi e degli anaerobi. Potrebbe anche darsi che gli aerobi facciano da introduttori in patologia nei confronti degli anaerobi. Qualche evidenza sperimentale in questo senso è stata portata soprattutto in rapporto alla peritonite sperimentale da feci incapsulate.

4) Una quarta conclusione di questo convegno è che questa patologia non è rara, perché la casistica così abbondante che i colleghi inglesi hanno portato e le osservazioni cliniche che anche noi stiamo facendo ci danno la sensazione che si tratti di una patologia estesa ed in incremento.

5) Infine vi è il problema della profilassi e della terapia, problema che è stato dibattuto in quest'ultima seduta e per il quale mi sembra che vi siano ancora molti punti interrogativi. Essi riguardano l'opportunità di scelta di determinate profilassi o addirittura la opportunità stessa di eseguire un determinato tipo di profilassi. Le opinioni sono diverse anche per l'impiego dei singoli farmaci e per il risultato ottenibile in alcune particolari localizzazioni, per esempio nell'ascesso cerebrale. Mi sembra che non vi sia uniformità di vedute in questo campo e del resto ciò non meraviglia perché la terapia è la sintesi della medicina, e presenta le maggiori difficoltà di giudizio. È necessaria una lunga serie di esperienze con osservazioni ben condotte e controllate in molteplici direzioni e cioè con il controllo costante microbiologico, con il controllo del decorso e con serie parallele di malati trattati in doppio cieco.