

# Un nuovo terreno per la determinazione simultanea della triptofano desaminasi, della beta-galattosidasi, della motilità e dell'indolo

ELIO ROMAGNOLI

Laboratorio di Igiene del Territorio, Istituto Superiore di Sanità

**Riassunto.** — L'autore descrive un terreno per la determinazione simultanea, in un unico tubo, della triptofano desaminasi, della beta-galattosidasi, della motilità e dell'indolo.

**Summary** (*A medium for a simultaneous assay of l-triptophane desaminase, beta-galactosidase, motility and indole production*). — The author describes a medium for a simultaneous assay, in a single test-tube, of l-triptophane desaminase, beta-galactosidase, motility and indole production.

Nella diagnostica degli Enterobatteri le ricerche della desaminasi e della beta-galattosidasi presentano un notevole interesse pratico come già hanno dimostrato numerosi AA. e vari sono i terreni ed i metodi proposti per la loro determinazione [1-10].

Il terreno che sembra più pratico è quello descritto da Giammanco e Carmeni [8], perché consente la ricerca simultanea della beta-galattosidasi, della motilità e, dopo aggiunta di una soluzione di cloruro ferrico, della fenilalanina desaminasi. Questo terreno è stato utilizzato nel lavoro di routine del laboratorio, preferendolo anche ad un altro, da noi preparato, che però non consentiva di mettere in evidenza la motilità dei germi.

Partendo dal terreno di Giammanco e Carmeni sono state apportate a questo alcune modifiche che permettessero di determinare la desaminasi senza l'aggiunta della soluzione di cloruro ferrico e che consentissero inoltre di mettere in evidenza la produzione di indolo.

Le modifiche consistono in:

1) aggiunta diretta nel terreno della fonte di ferro (citrato di ferro ed ammonio verde) per la determinazione della desaminasi, pratica già effettuata da Hansen e Coll. [9] in un terreno per la determinazione della fenilalanina desaminasi;

2) sostituzione della l-fenilalanina con l-triptofano: questo aminoacido consente di determinare non solo la desaminasi ma anche la produzione di indolo. Infatti, come noto, l'indolo è un prodotto del metabolismo del triptofano; il chetoacido risultante dalla desaminasi sarà, in questo caso, l'acido indolo-3-piruvico;

3) aggiunta di Tween 80; questo favorisce ed evidenzia la desaminasi con una più netta formazione di colore. Alla concentrazione usata non si evidenzia l'idrolisi del Tween da parte di alcuni batteri (es. *Serratia*, *Yersinia* enterocolitica).

A questo terreno è stato dato il nome TOMI agar (TDA, ONPG, Motilità, Indolo). Ricordiamo brevemente l'utilità dei tests verificabili col terreno proposto: il saggio della desaminasi consente di discriminare tutti i ceppi appartenenti ai generi *Proteus* e *Providencia*, quello della beta-galattosidasi tutti i ceppi fermentanti il lattosio, compreso i lento-fermentanti. Le determinazioni poi della motilità e dell'indolo costituiscono ulteriori importanti dati differenziali.

#### MATERIALI E METODI

##### Composizione del terreno base.

Estratto di lievito . . . . .	g 0,3
Trypticase BBL oppure tryptone Difco . . . . .	g 0,3
NaCl . . . . .	g 0,5
Citrato di ferro ed ammonio verde . . . . .	g 0,03
l-triptofano . . . . .	g 0,25
Agar . . . . .	g 0,35
Tween 80 . . . . .	ml 0,1
Acqua distillata . . . . .	ml 80-pH 7,2

##### Preparazione.

Sciogliere il triptofano a caldo (ca. 70 °C.), aggiungere gli altri componenti e sterilizzare a 120 °C per 15 minuti. A questo terreno base, sterilizzato e raffreddato a circa 60 °C aggiungere 20 ml della seguente soluzione sterilizzata per filtrazione (Seitz o Millipore):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	g 0,5
ONPG (*) . . . . .	g 1,5
H <sub>2</sub> O . . . . .	ml 100

(\*) O-Nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside. Koch Light Laboratories (cod. 4276-00).

Mescolare e distribuire in provettine sterili (ca. 80 x 13 mm) in ragione di ml 2,5-3 per provettina. Lasciare solidificare a cilindro.

Conservare a + 4 °C al buio dove si mantiene utilizzabile per circa sei settimane. Il terreno è instabile alla luce; se esposto alla luce diretta dopo 24-48 ore compare una lieve colorazione verde che si accentua nei giorni successivi.

### *Semina e lettura.*

Seminare per infissione ed incubare a 37 °C per 24 ore.

**Lettura:**

- presenza beta-galattosidasi (ONPG): formazione colorazione gialla;
- presenza desaminasi (TDA): formazione colorazione nero-bruna o nero-verde alla superficie del terreno;
- motilità: diffusione del germe dal canale di semina;
- produzione di indolo: aggiungere ml 0,3 del reattivo di Kovacs, ro-teare leggermente il tubo; in caso di presenza di indolo si sviluppa un colore rosso nel reattivo.

Nei ceppi TDA+ si hanno varie sfumature di colore: in genere, *Proteus mirabilis* e *rettgeri* danno una colorazione nero-verde, *Proteus vulgaris* bruno e *Proteus morgani* bruno tenue.

Anche nei ceppi ONPG+ si hanno sfumature del colore giallo: le *Shi-gellae* danno un colore giallo canarino, il genere *Escherichia* e la tribù *Kleb-sielleae* un colore giallo carico.

### *Risultati.*

È stata controllata l'efficacia del terreno TOMI usandolo in parallelo con i seguenti terreni:

1) terreno di Giammanco e Carmeni per il confronto della desaminasi, della beta-galattosidasi e della motilità;

2) terreno Phenylalanine agar (Ewing, Davis e Reavis) per il confronto della desaminasi;

3) terreno SIM agar per il confronto della motilità e della produzione di indolo;

4) metodo di Ben Hamida e Le Minor [4] per il confronto della beta-galattosidasi.

Comportamento degli Enterobatteri sui terreni TOMI agar  
e Kligler Iron Agar

	T O M I				K I A		
	ONPG	TDA	motilità	indolo	cilindro	becco	H <sub>2</sub> S
<i>E. coli</i> (a) . . . . .	+	—	+	+	AG	A	—
<i>Citrobacter diversus</i> . . . . .	+	—	+	+	AG	A/x	—
<i>Citrobacter freundii</i> . . . . .	+	—	+	—	AG	A/x	+
<i>Enterobacter</i> (genere) (b) . . . . .	+	—	+	(—)	AG	A	—
<i>Arizona</i> . . . . .	(+)	—	+	—	AG	Alk	+
<i>Klebsiella</i> (genere) . . . . .	+	—	—	—	AG	A	—
<i>Shigella sonnei</i> (c, d) . . . . .	+	—	—	—	A	Alk	—
<i>Shigella flexneri</i> (e) . . . . .	—	—	—	v	A	Alk	—
<i>Salmonella</i> . . . . .	—	—	(+)	—	AG/A	Alk	(+)
<i>Edwardsiella</i> . . . . .	—	—	+	+	AG	Alk	+
<i>Proteus vulgaris</i> . . . . .	—	+	+	+	AG	Alk	+
<i>Proteus mirabilis</i> . . . . .	—	+	+	—	AG	Alk	+
<i>Proteus morgani</i> . . . . .	—	+	+	+	AG/A	Alk	—
<i>Proteus rettgeri</i> . . . . .	—	+	+	+	A	Alk	—
<i>Providencia</i> . . . . .	—	+	+	+	A/AG	Alk	—

v = comportamento variabile;

( ) = comportamento nella maggior parte dei casi;

A = acidificazione del terreno, viraggio al giallo;

AG = acidificazione del terreno con produzione di gas;

Alk = alcalinizzazione del terreno, colore rosso invariato;

H<sub>2</sub>S ± = annerimento, più o meno diffuso, del cilindro;

x = lenta fermentazione.

(a) Nella tabella non è riportato il gruppo *Alkalescens-Dispar*, comprendente ceppi considerati come *E. coli* immobili, agasogeni, ONPG positivi o negativi.

(b) La *Serratia* ha sul terreno TOMI comportamento analogo agli altri batteri della tribù *Klebsiellaceae*; sul terreno KIA, nella maggior parte dei casi, non fermenta il lattosio e la produzione di gas in destrinosio è variabile.

(c) Non è possibile includere nello schema *Shigella dysenteriae* e *boydii* poiché queste hanno — per quanto riguarda la produzione di indolo e la presenza della beta-galattosidasi — un comportamento che varia nei diversi tipi dei due gruppi.

(d) La *Shigella sonnei* è ONPG nel 95 % dei casi (biotipo A).

(e) Il Sierotipo 6 può essere talvolta ONPG +.

Sono stati saggiati 220 stipiti di Enterobatteri precedentemente identificati, di cui 30 *Salmonella*, 40 *Proteus mirabilis*, 30 *Proteus vulgaris*, 18 *Proteus rettgeri*, 10 *Proteus morganii*, 25 *E. coli*, 12 *Klebsiella pn.*, 12 *Enterobacter cloacae*, 12 *Enterobacter aerogenes*, 7 *Citrobacter freundii*, 6 *Enterobacter hafniae*, 1 *Serratia*, 13 *Shigella sonnei*, 8 *Shigella flexneri*. Il terreno TOMI ha dato risposte eguali a quelle ottenute con i terreni e la reazione di confronto. È interessante rilevare che risultati simili si sono avuti anche con stipiti dai caratteri anomali: ad esempio 2 stipiti di *Proteus morganii* davano debole reazione TDA +; lo stesso risultato si aveva con gli altri due terreni. Egualmente ceppi poco mobili (alcuni stipiti di *Proteus rettgeri* e di *S. typhi*) e ceppi con scarsa produzione di indolo (4 stipiti di *Proteus vulgaris*) davano risultati del tutto simili ai terreni di confronto.

L'uso di questo terreno dovrebbe essere molto utile nella normale pratica di laboratorio, ovviamente associandolo ad altri terreni differenziali come ad esempio il Kligler-Iron agar (KIA) oppure il Lysine Iron agar (LIA). Ciò consentirebbe di giungere, nella maggior parte dei casi, ad una diagnosi; infatti, secondo la nostra esperienza, solo in pochi casi di deve ricorrere all'ausilio di altre prove come la fermentazione dei carboidrati o la ricerca delle decarbossilasi [Tab. 1].

Ricevuto il 15 novembre 1978.

Accettato il 24 novembre 1978.

#### BIBLIOGRAFIA

1. HENRIKSEN, S. D. 1950. A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organisms. *J. Bacteriol.* **60**: 225-231.
2. HENRIKSEN S. D. & CLOSS, K. 1938. The production of phenylpyruvic acid by bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **15**: 101-113.
3. EWING W. H., DAVIS R. B. & REAVIS R. W. 1957. Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. *Public Health Lab.* **15**: 153-160.
4. BEN HAMIDA F. & LE MINOR L. 1956. Une méthode rapide de recherche de la transformation de la l-phenyl-alanine en acide phenyl-pyruvic. *Ann. Inst. Pasteur.* **90**: 671-673.
5. LE MINOR, L. & BEN HAMIDA F. 1962. Avantages de la recherche de la  $\beta$  galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des Enterobacteriaceae. *Ann. Inst. Pasteur.* **102**: 267-271.
6. BULLOW, P. 1964. The ONPG test in diagnostic. II. Comparison of the ONPG test and conventional lactose-fermentation test. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **60**: 387-391.

7. GIAMMANCO, G. 1963. La ricerca della  $\beta$ -galattosidasi negli Enterobatteri a mezzo di semina su agar-lattosio-ONPG. *Boll. Ist. Sieroter. Milanese*, **42**: 396-400.
8. GIAMMANCO, G. & CARMENI A. 1968. Un nuovo terreno per la ricerca della fenilalanina desaminasi, della  $\beta$ -galattosidasi e della motilità negli Enterobatteri. *Ig. Mod.* **61**: 424-431.
9. HANSEN, W., SCOUTENS, E. & YOURASSOWSKY, E. 1973. Description d'un nouveau milieu pour la recherche de la phénylalanine désaminase et comparaison de diverses méthodes. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, **124b**: 73-79.
10. BUTTIAUX, R., OSTEUX, R., FRESNOY, R.; & MORIAEZ, J. 1954. Les propriétés biochimiques caractéristiques du genre *Proteus*. Inclusion souhaitable des *Providencia* dans celui-ci. *Ann. Inst. Pasteur*, **87**: 375-386.