

BRENNO BABUDIERI

61. STUDIO DI UN MYCOBACTERIO CROMOGENO VIOLACEO.

E' ben nota la frequenza con cui tra i Mycobacteri si trovano germi cromogeni. Anche tra i ceppi del bacillo tubercolare non sono rari quelli debolmente pigmentati in giallo e la pigmentazione costituisce pressochè la regola tra i Mycobacteri non patogeni — i così detti germi paratubercolari —. Il pigmento abbraccia tutta una gamma di colori che vanno dal giallo chiaro al rosso intenso. Non mi consta però che sia mai stato descritto un Mycobacterio produttore di un pigmento di colore diverso da questi, ed è del resto noto che anche all'infuori di questo gruppo i germi cromogeni verdi, bleu, violetti sono piuttosto rari.

Perciò e per altre sue peculiarità che esporrò in seguito, m'è parso interessante studiare le caratteristiche di un germe acido-resistente produttore di un pigmento grigio-violetto.

Tale germe, contrassegnato col nome « Saenz », m'è stato inviato insieme ad altri ceppi acido-resistenti, nel giugno 1938, dall'Istituto Pasteur di Parigi. Secondo quanto m'ha gentilmente comunicato il Professore Boquet, tale ceppo è stato isolato da una conduttura d'acqua della città di Parigi, e non è stato oggetto di particolari studi.

Il ceppo « Saenz » m'è stato inviato su terreno di Petragnani, sul quale era cresciuto rigogliosamente formando una patina umida, bernoccoluta, perfettamente bianca. Trapiantai il germe su terreno di Petragnani e lo collocai assieme agli altri della mia collezione di Mycobacteri, in una grande scarabattola posata su di uno scaffale fissato in un angolo della mia stanza di lavoro, in penombra. Più volte eseguii trapianti di tale ceppo, sempre su terreno di Petragnani o su patata glicerinata, senza mai notare una qualche modificazione delle sue caratteristiche. Un anno più tardi, nel sistemare diversamente il laboratorio, collocai le scarabattole contenenti la collezione di germi acido-resistenti, in un armadio chiuso da vetri grigio-azzurri, situato piuttosto vicino alla finestra. I germi erano stati trapiantati poco prima su terreno di Petragnani.

Pochi giorni dopo, riaprendo l'armadio, constatai con meraviglia che la patina del ceppo Saenz era uniformemente colorata in grigio chiaro. Nei giorni seguenti la colorazione si accentuò sì da raggiungere e superare l'intensità e la tonalità delle lastre di vetro dell'armadio. Le culture precedenti l'ultimo trapianto, conservate nello stesso armadio, erano invece rimaste perfettamente bianche. In un primo tempo pensai ad un inquinamento, ma dopo ripetuti esami microscopici e semine su piastra con successivo isolamento e studio di singole colonie, mi convinsi che il ceppo era puro e che aveva soltanto acquistato proprietà cromogene. Nuove culture allestite dai tubi vecchi e tenute nell'armadio, diedero pure sviluppo ad una patina pigmentata. Nulla di simile era avvenuto a carico degli altri germi acido-resistenti della collezione, comprendente 46 ceppi, parecchi dei quali non cromogeni.

Iniziai allora delle ricerche per stabilire più esattamente le condizioni che determinavano la comparsa del pigmento e studiai per prima cosa l'influenza del fattore « luce », che ha certamente la massima importanza. E' noto infatti che una gran parte dei germi dell'aria e degli strati superficiali del terreno, i quali sono perciò molto esposti ai raggi luminosi, sono cromogeni e che molti di questi coltivati all'oscuro, perdono temporaneamente tale proprietà.

Insemenzai a questo scopo numerosi provettoni di terreno Petraghani e, dopo averli mantenuti in termostato per 48 ore, per favorire il primo sviluppo delle culture, li tenni successivamente a temperatura ambiente e a luce diffusa dietro schermi di vetro colorato o immersi in soluzioni colorate. Constatai così che la produzione di pigmento si manifestava, nello spazio di pochi giorni, nelle culture tenute dietro vetro azzurro, grigio, dietro ad uno schermo di vetro al nichelio permeabile ai soli raggi ultravioletti, o immerse in soluzioni colorate turchine (Brillantkresyl-Blau) o violette (violetto di genziana). La pigmentazione era specialmente intensa nelle culture cresciute dietro schermo violetto o ultravioletto. In queste la patina assumeva una tinta grigio-viola molto intensa.

Il pigmento compariva anche nelle culture tenute a luce diffusa non eccessivamente intensa. Non compariva invece in quelle tenute sulla scansia dove in origine avevo conservato i miei *Mycobacteri* e dove la intensità luminosa era evidentemente insufficiente.

Nessuna formazione di pigmento si aveva nelle culture tenute al buio, o alla luce solare, o dietro schermi verdi-bleu (verde malachite), verdi (verde luce), gialli (tripaflavina), arancioni (rosso-fenolo neutro), rossi (fucsina, rosso fenolo alcalino). Così pure la produzione di pigmento mancava, nonostante la luce favorevole, nelle culture tenute precedentemente troppo a lungo in termostato e che quindi avevano già superata la fase del più rigoglioso sviluppo, o in culture allestite su terreni vecchi, poco umidi.

La mancata produzione di pigmento nelle culture esposte alla luce solare è probabilmente da attribuirsi al fatto che la luce troppo intensa danneggia i germi e ne ostacola lo sviluppo. E' da notarsi però che la pigmentazione avviene, e con grande intensità, nelle culture esposte alla luce solare, dietro allo schermo permeabile ai raggi ultravioletti, cioè a quelli che presumibilmente dovrebbero ostacolare lo sviluppo della cultura e danneggiare i germi.

Non si può invece chiamare in causa un danneggiamento delle culture per spiegare la mancata produzione di pigmento nei germi tenuti dietro schermi verdi, gialli o rossi, perchè questi si sviluppano rigogliosamente. Anzi potei constatare in qualche caso, se lo schermo era troppo debole, o la luce troppo intensa, che anche in queste culture si aveva una debole produzione di pigmento grigio-viola.

Ricerche di controllo eseguite col B. prodigioso e col B. piociano, coltivati dietro agli stessi schermi colorati, non hanno mostrato alcuna differenza nella produzione di pigmento, che è stato ugualmente abbondante, qualunque fosse lo schermo usato.

Per determinare più esattamente a quali lunghezze d'onda fosse da attribuirsi la produzione di pigmento, tentai di ottenere una specie di spettro biologico, collocando culture dietro ad un grosso prisma che rifrangeva la luce di una potente lampada elettrica. Nonostante ripetuti tentativi, non riuscii ad ottenere una banda o una stria di pigmentazione, probabilmente perchè la fonte luminosa non raggiungeva un'intensità sufficiente.

Ad ogni modo, dalle mie ricerche, benchè condotte con luci che non si possono considerare strettamente monocromatiche, risulta evidente che la proprietà cromogena del germe è condizionata alla presenza di raggi luminosi del tratto più alto dello spettro. Pur non essendo in grado di

determinare con esattezza i limiti di questo, posso dire che esso sembra estendersi dal violetto all'ultravioletto. La contemporanea presenza di raggi a lunghezza d'onda maggiore, come accade nella luce solare, non inibisce l'azione dei raggi violetti-ultravioletti, a patto però che non ostacoli lo sviluppo della cultura.

La produzione di pigmento avviene, oltre che sul terreno di Petraghani, anche su quello di Loll, di Petroff, sulla patata glicerinata. Non si ha invece sull'agar semplice, sull'agar-uovo, in brodo, acqua peptonata, latte, gelatina.

Il pigmento è prodotto soltanto negli strati più superficiali della patina batterica, cioè in quelli esposti alla luce. Manca completamente negli strati profondi. Esso non si diffonde nel mezzo culturale. Viene decolorato lentamente dai mezzi ossidanti, è insolubile in acqua, acidi, basi, alcool metilico, etilico, etere, acetone, benzolo.

Dopo aver studiato le proprietà cromogene del germe, sono passato a studiarne le altre caratteristiche. Devo premettere che non ho trovato nessuna differenza, sia morfologica, sia di rapporto fra forme cianofile e forme acido resistenti, fra le culture pigmentate e quelle no.

Il germe in questione è un autentico *Mycobacterio*. Non presenta mai ramificazioni laterali, e quindi è ben differenziabile dagli actinomiceti, alcuni dei quali producono un pigmento violetto.

Nelle culture presenta aspetti un po' diversi a seconda dei vari terreni. Ha la forma di bastoncini piuttosto tozzi ad estremità arrotondate, corti, quasi coccobacillari nelle culture recenti in brodo o su agar. In ogni caso si tratta di bastoncini più tozzi e meno lunghi di quelli del bacillo di Koch. Si trova isolato o in ammassi irregolari. E' immobile, gram-positivo, intensamente acido- e alcool-resistente. Nei preparati colorati con lo Ziehl, accanto a germi uniformemente e intensamente rossi, se ne scorgono altri un po' più pallidi, contenenti nel protoplasma, al centro o ad una estremità, un granulo intensamente colorato in rosso cupo, di diametro non superiore allo spessore del corpo batterico. Esso non deve esser considerato una spora. Spesso, come accade comunemente nei *Mycobacteri* non patogeni, accanto alle forme acido-resistenti, se ne scorgono altre, più o meno abbondanti, cianofile, sottili, allungate. Si scor-

gono anche forme di passaggio cianofile contenenti un granulo o una chiazza acido-resistente al centro, o anche, più raramente, forme costituite da una breve catenella di minuti granuli acido-resistenti, allineati in un protoplasma cianofilo. I germi cianofili sono specialmente abbondanti intorno al secondo-quarto giorno di sviluppo.

Il ceppo « Saenz » si sviluppa con facilità e rapidamente sui comuni terreni per la cultura del germe tubercolare e dà su questi colonie rotondegianti, umide, bernoccolute, di tipo liscio piuttosto aderenti al mezzo culturale e mediocrementemente emulsionabili. Cresce anche in brodo e in acqua peptonata formando soltanto una pellicola superficiale, rugosa e non intorbidando il mezzo. Non fluidifica la gelatina e cresce in questa più rigogliosamente lungo il tratto superiore del canale d'innesto. Su agar dà una patina secca, rugosa, facilmente staccabile e meno abbondante che sui terreni atti allo sviluppo del bacillo di Koch. Cresce anche su terreni contenenti il mezzo per cento di taurocolato di sodio. Cresce nel latte senza coagularlo. Lo sviluppo avviene facilmente a temperatura ambiente, però l'optimum si ha a 37° . E' strettamente aerobio. Trattato per 10' con acido solforico al 10 %, dà ancora sviluppo a culture contenenti forme cianofile e acido-resistenti.

Non è indoligeno e non fermenta i seguenti idrati di carbonio: lattosio, glucosio, saccarosio, arbutina, levulosio, maltosio, sorbite, mannite, mannosio, galattosio, salicina, dulcite, inulina, eritrite, adonite, destrina, raffiniosio, inosite, isodulcite, xilosio, arabinosio, amido.

Per saggiarne l'azione patogena sugli animali, ho inoculato 1 cc. di una densa sospensione di germi, ai seguenti animali: 3 cavie sottocute, 3 cavie in peritoneo, 2 conigli in peritoneo, 2 polli in peritoneo. Nessuno degli animali mostrò segni evidenti di malattia. Dopo un mese l'intradermoreazione praticata con tubercolina vecchia di Koch e la cutireazione praticata con l'esotubercolina diagnostica di Finzi, diedero in ogni caso risultato negativo.

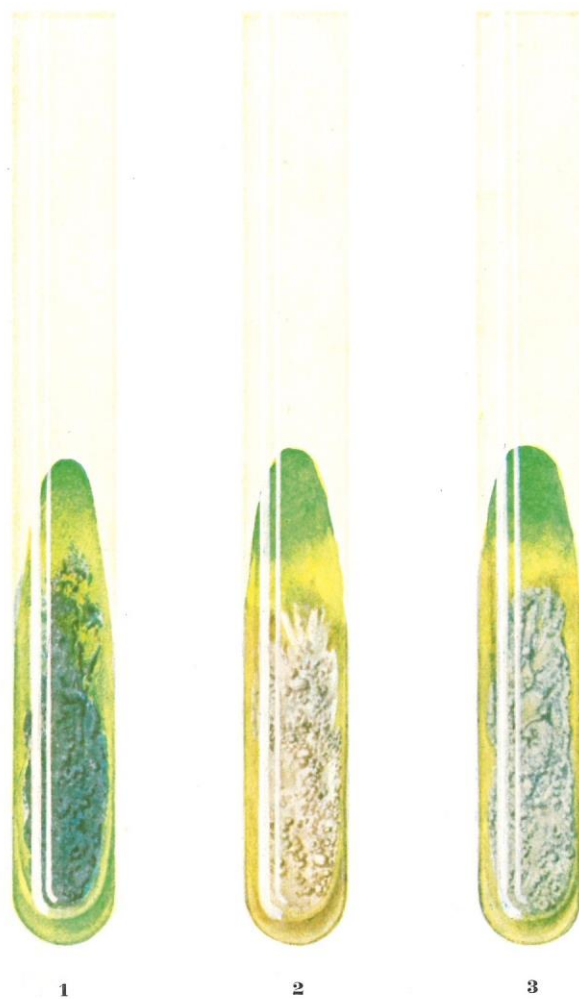
Due cavie, un pollo ed un coniglio, furono sacrificati dopo 33 giorni. Mentre nei tre primi non trovai nulla di patologico, il coniglio presentava all'autopsia numerosi noduli purulenti, giallastri, grossi come capocchie di spilli o grani di miglio, disseminati nella compagine dell'omento o immediatamente sottostanti al peritoneo parietale, specie alle

regioni lombari. Un nodulo più grosso, delle dimensioni di un pisello, era situato sotto al diaframma, in corrispondenza dell'apofisi ensiforme. Due noduletti simili, più piccoli, si vedevano nel parenchima epatico. Nulla di patologico a carico degli altri organi. Il fegato e la milza non apparivano ingrossati.

Nel pus dei noduli erano contenuti numerosissimi germi acido-resistenti, in buona parte alterati, d'aspetto granulare; altri apparentemente integri, piuttosto corti, isolati o raccolti in piccoli mazzetti, erano spesso situati nel protoplasma di macrofagi. Allestite delle culture con questo pus, potei ottenere lo sviluppo di scarsissime colonie costituite da germi cianofili e germi acido-resistenti, piuttosto corti. Praticato un passaggio, ebbi lo sviluppo di una patina abbondante, costituita da germi più allungati, quasi esclusivamente acido-resistenti, e collocata la cultura dietro ad uno schermo violetto, ottenni la comparsa del solito pigmento. Gli altri animali sacrificati dopo 2, 3 e 4 mesi, non mostrarono all'autopsia alcuna lesione, eccezion fatta per una cavia (4° mese) che presentava al fegato un ascesso incapsulato, di dimensioni superiori a quelle di una noce, contenente un pus fluido, costituito in prevalenza da polinucleati alterati. Nè la ricerca diretta, nè quella culturale, permisero di mettere in evidenza nel pus o sulle pareti dell'ascesso, germi acido-resistenti; si sviluppò invece nelle culture, in grande quantità, un altro germe banale. Perciò è dubbio che l'ascesso si possa mettere in rapporto con l'inoculazione del ceppo Saenz.

Non credo che si possa dare grande importanza alle lesioni riscontrate in un unico coniglio, perchè esse sono simili a quelle che si producono con una certa facilità inoculando all'animale alte dosi di un qualsiasi germe acido-resistente saprofita. Tali lesioni non hanno carattere evolutivo e non sono trasmissibili in serie: i germi che si ritrovano nel pus sono in buona parte morti o incapaci di riprodursi; infatti anche nel mio caso, nei tubi di cultura ho avuto lo sviluppo di scarsissime colonie.

In complesso, per le sue caratteristiche culturali e biologiche, il ceppo « Saenz » non si stacca in modo particolare dai comuni Mycobacteri saprofiti. La sua caratteristica però di produrre un pigmento violetto e di produrlo soltanto sotto l'azione di luci di una determinata lunghezza d'onda, lo rendono, a mio parere, degno di studio e d'attenzione.



CEPPO "SAENZ,, CRESCIUTO:

1. Dietro schermo di vetro al nichelio.
2. Al buio.
3. Dietro schermo di vetro azzurro.

RIASSUNTO

L'A. studia le caratteristiche di un germe acido-resistente non patogeno, il quale produce un pigmento grigio-violaceo sotto l'azione dei raggi del tratto violetto-ultravioletto dello spettro solare.

SUMMARIUM

Auctor exquirat notas proprias germinis cuiusdam acido-resistentis non pathogenis; quod ubi radiis tractus violaceo-ultraviolecei expositum est spectri solaris, pigmentum gignit cinereo-violaceum.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.

