

34. Leonida RAVAIOLI. — La conservazione dell'actinobacillo di Lignières e Spitz mediante l'essiccamento nel vuoto.

Riassunto. — L'A. fa una breve rassegna bibliografica sull'argomento, prendendo in esame soprattutto l'epizootologia della malattia e lo studio batteriologico del germe che la causa. Passa quindi a descrivere l'essiccamento nel vuoto di tale germe e le variazioni che esso subisce dopo tale trattamento. Descrive pure la morfologia del germe al microscopio elettronico, prima, durante e dopo l'essiccamento.

Résumé. — L'A. passe brièvement en revue la littérature sur l'actinobacillose, examinant surtout les caractères épizootiques de la maladie et discutant au point de vue bactériologique le germe pathogène qui en est la cause. Il étudie et décrit la dessiccation de ce germe dans le vide et les variations qu'il subit après ce traitement. Il décrit aussi la morphologie du germe observé au microscope électronique avant, durant et après la dessiccation.

Summary. — The author has compiled a short literature survey of the problems concerned, in particular the epizootology of the disease and the bacteriological study of the organism causing the disease. He has described the drying in vacuo of this organism and the changes which it undergoes after this treatment. The morphology of the organism was studied with the electron microscope before, during and after dessiccation.

Zusammenfassung. — Der V. setzt eine rasche Durchsicht der die Aktinomykose betreffende Literatur voraus und untersucht im besondern die Epizootologie der Krankheit und das bakteriologische Studium des Keimes, der diese Krankheit hervorruft. Er beschreibt dann die Trocknung dieses Keimes im Vakuum und die daraus folgenden Änderungen. Er beschreibt auch die unter dem Elektronenmikroskop beobachtete Morphologie dieses Keimes, vor, während und nach der Trocknung.

L'actinobacillosi per le sue caratteristiche epidemiologiche cliniche anatomiche ed istopatologiche veniva confusa anteriormente al 1900 con l'actinomicosi. Il *Discomyces* del Rivolta ne era considerato l'agente eziologico unico (1).

Fu in seguito alla violenta epizootia di actinobacillosi che si verificò nei primi anni del 1900 in Argentina, specialmente nella provincia di Buenos

Aires e ai lavori che su tale argomento fecero LIGNIÈRES e SPITZ che si poterono differenziare i rispettivi agenti etiologici.

Gli studi dei due AA. vennero ben presto confermati da numerosi ricercatori, quali NOCARD (2), PÉTIT (3), HAUER (4), CHRÉTIEN (5), BONGERT (6), KLARIN (7), HUGGINS (8), GRIFFITH (9), BONSWORT (10), HÜLPHERS (11), MAGNUSSON (12), GUNST (13), sia in Europa che in America.

In Italia la prima segnalazione di tale malattia si ebbe nel 1929 da LANFRANCHI, MESSIERI, e RISTORI, (14), che ne descrissero un vasto focolaio in bovini del Ferrarese. Dopo di loro molti altri AA. come BOTTURA (15), CAMBOTTO (16); RAVAGLIA (17), SEREN (20), CILLI (20), MENZANI (18), ed altri, ne confermarono la presenza.

L'actinobacillo è un piccolo germe immobile, aerobio, asporigeno, gram negativo, a forma coccobacillare. In terreni culturali artificiali manifesta un notevole pleomorfismo. Tutti gli AA. che si sono interessati del suo studio batteriologico, sono concordi nel ritenerlo un germe estremamente labile. LIGNIÈRES e SPITZ (19), hanno notato come venga facilmente distrutto dal calore e da tutti gli agenti fisici e chimici, e come le colture, sia tenute a 37°, che a temperatura di laboratorio, perdano rapidamente e facilmente la capacità di sviluppo nei successivi trapianti. Essi ritengono che la vitalità del germe, persista più a lungo nel pus conservato in pipette chiuse alla fiamma. Tuttavia tale resistenza si aggira, secondo g'i AA. intorno ai due mesi.

MESSIERI (20), invece, pur giustamente facendo osservare come il germe possa acquistare o perdere alcune delle sue caratteristiche in conseguenza di particolari circostanze, non ultima la malignità e l'età della lesione da cui viene isolato, non è mai riuscito ad ottenere sviluppo dopo un solo mese da pus conservato in pipette chiuse alla fiamma e tenute in condizioni diverse di temperatura.

LIGNIÈRES e SPITZ (19) scrivono che l'essiccamento, specie se fatto lentamente, distrugge con rapidità la vitalità del germe.

Nei comuni terreni culturali tale vitalità è pure assai debole. Nei terreni liquidi e più ricchi di sostanze organiche è maggiore che in quelli solidi. Nell'ampio lavoro di MESSIERI, (20), sull'argomento, si legge come su agar semplice sia assai difficile ottenere un trapianto positivo da una cultura di oltre 10 giorni.

Dalle culture in brodo si hanno invece trapianti positivi fino ai 15-30 giorni, a seconda dei ceppi, in brodo-siero quasi costantemente fino ad un mese e in brodo alla pappa di cervello, i ceppi si conservano vitali fino a 40-45 gg. e qualcuno fino al 60° giorno.

Alla ricerca di un metodo che permettesse una più lunga conservazione

dei ceppi, Messieri ha condotto una interessante esperienza, coltivando l'actinobacillo in brodo addizionato a foglie essiccate di « medicago sativa ».

In tale terreno l'A. ha potuto constatare la sopravvivenza del germe fino a un massimo di 75 gg.

Per ciò che riguarda i ceppi di origine ovina, non vi è ragione di ritenerli diversi da quelli di origine bovina. Gli AA. che se ne sono interessati, quali LIGNIÈRES e SPITZ (19), RAVAGLIA (17), TUNNCLIFF (21), MARSH e WILKINS (22), sono concordi nel ritenerli simili, salvo un carattere di minor patogenicità.

Tale notevole labilità nell'ambiente esterno sia del pus actinobacillare che dell'actinobacillo in cultura contrasta stranamente coi dati epizootologici della malattia. E' opinione comune come essa colpisca in genere animali allevati in forti agglomerati e in luoghi umidi, bassi e acquitrinosi.

Tuttavia è sufficiente anche un semplice sguardo d'insieme su quanto è stato scritto sull'argomento per accorgersi come la malattia sia stata segnalata un po' ovunque dall'Europa all'Africa, dall'America del Sud a quella del Nord, in regioni cioè a clima, a latitudine, a metodo di allevamento diversissimi tra loro. Essa infatti è stata descritta da SGAMBATI e SFORZA anche in bovini africani allevati allo stato brado in luoghi dell'interno molto asciutti (23), (24).

Dal punto di vista epizootologico l'ambiente esterno non pare alterare in nulla la vitalità del germe, non solo ma neanche modificare in qualche maniera la sua patogenicità.

A tale proposito MESSIERI (20), riferisce come in località ove la malattia ha caratteristiche di particolare virulenza non gli sia stato mai dato di vedere insorgere ed esaurirsi una enzoozia e tanto meno una epizoozia.

Tutto ciò sibbene brevemente accennato, credo sia sufficiente a mettere in evidenza come i dati dedotti dalle prove sperimentali di laboratorio sulla vitalità e resistenza dell'actinobacillo nell'ambiente siano ben diversi dai dati che si possono detrarre dall'andamento epizootologico della malattia in questione.

SCOPO DEL LAVORO:

E' cosa nota da lungo tempo come l'essiccamento nel vuoto permetta una lunga conservazione delle cellule batteriche senza alterarne le caratteristiche.

Dalla letteratura che mi è stato possibile consultare, non mi risulta che qualche A. si sia interessato della conservazione dell'actinobacillo nè mediante l'essiccamento nel vuoto nè mediante liofilizzazione (25), (26), (27), (28), (29), (30).

Ho voluto quindi sperimentare se questo germe, così labile a detta di

tutti nelle prove culturali di laboratorio, ma pur così stranamente tenace nell'ambiente esterno, resistesse, per un lungo periodo una volta essiccato nel vuoto, e quali eventuali variazioni e modificazioni subisse.

PARTE SPERIMENTALE:

I due ceppi di actinobacillo sui quali ho condotto le esperienze, provengono dal laboratorio della Clinica Medica Veterinaria di Bologna.

Essi mi sono stati gentilmente concessi dal prof. A. Messieri, Direttore della Clinica stessa, che qui sentitamente ringrazio.

I due ceppi erano stati isolati di recente da pus actinobacillare proveniente da bovini del ferrarese. Essi erano contrassegnati come Act. n. 535 e sper. I. — Quando mi giunsero avevano già subito vari trapianti su agar semplice.

Eseguito l'essiccamento nel vuoto, come sarà descritto più avanti, ne ho voluto contemporaneamente provare, allo scopo di confrontare le eventuali variazioni, la vitalità nei comuni terreni culturali, l'attività biochimica, la capacità a produrre indolo, acetil-metilcarbinolo, triptofano, a ridurre i nitrati, a subire fenomeni dissociativi; infine ne ho osservato le variazioni morfologiche sia al microscopio ottico che elettronico.

VITALITA' NEI COMUNI TERRENI CULTURALI:

Su agar semplice, a pH 7, 2, per strisciamento entrambi i ceppi sviluppano a 37° in 12-24 ore con piccole colonie caratteristiche, rugiadose, trasparenti inizialmente, poi biancastre contornate da riflessi azzurrini. In breve tempo aumentano notevolmente fino a formare colonie di 3-4 mm. di diametro.

Esse si presentano come in genere tutti gli AA. ed i testi le descrivono, cioè a margini netti e a superficie liscia.

Qualcuna però vista a forte ingrandimento non ha una superficie liscia, ma puntiforme.

L'aderenza delle colonie al mezzo solido sul quale crescono, la pastosità e l'aspetto filante delle colture se prelevate con l'ansa li ho constatati in maniera incostante, e non sono mai stati tali da poter venire considerati come caratteri differenziali.

Come ho già detto i due ceppi avevano subito alcuni trapianti e ciò può a detta di vari AA. venire a diminuire o completamente togliere questo particolare comportamento all'actinobacillo (MESSIERI (20), LIGNIÈRES e SPITZ (19), TOPILEY (31).

RAVAGLIA (17) ritiene che tale caratteristica più che alla attività vitale del germe debba essere considerata legata a variazioni anche minime della reazione del mezzo.

Su agar semplice, a temperatura ambiente, la vitalità dei due ceppi di actinobacillo si è dimostrata varia e incostante, ma non ha mai superato i 40 giorni.

Spesso i trapianti in decima giornata risultavano già sterili.

In terreni solidi più ricchi dell'agar semplice la vitalità dei due ceppi s'è rivelata ancora inferiore.

Su agar glicerinato ho riscontrato un massimo di resistenza fino a 20 giorni, su agar siero fino a 30, su agar sangue fino a 35.

Terreni ancor meno indicati alla conservazione di tale germe si sono dimostrati: il siero coagulato, il terreno di Löffler, il terreno di Pergola, il terreno di Petraghiani e quello di Dorset. Da essi, il trapianto dopo 8 o 10 giorni mi è risultato costantemente sterile.

In gelatina per strisciamento e infissione, su patata acida e su terreno di Sabouraud non ho mai notato alcun sviluppo.

In brodo si ha un uniforme intorbidamento nelle prime 24 ore e successivamente si forma una lieve pellicola superficiale. Dopo 40 o 50 ore il mezzo chiarifica con precipitazione di deposito sul fondo e formazione di piccoli fiocchetti aderenti alle pareti della provetta quasi simulanti una grossa agglutinazione.

La vitalità dei due ceppi in brodo non ha mai superato i 40 giorni.

In terreni liquidi più ricchi quali il brodo glicerinato, il brodo siero, il brodo peptonato, il brodo glucosato si ha un più rapido e abbondante sviluppo, ma la vitalità del germe in tali terreni si è sempre dimostrata inferiore ai 30 giorni.

In acqua peptonata è giunta a un massimo di 15 giorni e nel latte di 10.

In brodo alla pappa di cervello, terreno considerato da vari AA. ⁽²⁰⁾ ⁽¹⁷⁾ elettivo per una lunga conservazione dell'actinobacillo, ho avuto trapianti positivi fino al 40-45 giorno, ma non costantemente. Alle volte trapianti dopo 15 giorni sono rimasti sterili.

Non ho notato alcuna notevole differenza, nei riguardi della vitalità fra i due ceppi, nei diversi terreni culturali provati.

Le culture dopo le prime 24 ore di termostato a 37° erano tenute in laboratorio a temperatura ambiente.

Da tali prove resta quindi confermato, se pur ve n'era bisogno, la scarsa vitalità e resistenza dell'actinobacillo, inclusi i due ceppi in esame nei più comuni terreni culturali.

ATTIVITA' BIOCHIMICA.

Per saggiare il potere di fermentazione dei due ceppi nei riguardi degli idrati di carbonio ho usato tubi di Durham con acqua peptonata a cui venivano addizionati l'idrato di carbonio da saggiare e l'Andrade come indicatore.

I tubi, dopo l'insemenzamento sono stati posti in termostato a 37° per 72 ore e sono state eseguite 3 letture; una dopo 24 ore, una dopo 48 e la terza dopo 72 ore.

I risultati sono riportati nella Tavola n. 1 colonna I.

Fermentazione degli idrati di carbonio

TAVOLA 1

Idrati di Carbonio	Colonna I, ceppi in esame		Colonna II, Dopo un anno dall'essicc.		Colonna III, Dopo un anno dall'essicc. e 20 pass.		Col. IV Ceppo isol. dal bov.
	Ceppo N. 535 24h 48h 72h	Ceppo sper. 24h 48h 72h	Ceppo N. 535 24h 48h 72h	Ceppo sper. 24h 48h 72h	Ceppo 535 24h 48h 72h	Ceppo sper. 24h 48h 72h	Ceppo sp. II 24h 48h 72h
Glicerina . . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Eritrite . . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Sorbite . . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Dulcite . . .	+ + +	+ + +	— — —	— — —	+ + +	+ + +	— — —
Mannite . . .	+ + +	+ + +	± ± ±	+ + +	+ + +	+ + +	— ± ±
Arabinosio . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Xilosio . . .	+ + +	+ + +	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Glucosio . . .	+ + +	+ + +	± ± ±	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Fruttosio . . .	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Galattosio . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Lattosio . . .	+ + +	+ + +	— — —	— — —	— — —	— — —	— + +
Maltosio . . .	+ + +	+ + +	— — —	— — —	— — —	— — —	— + +
Saccarosio . .	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Raffinosio . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Destrina . . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Inulina . . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Salicina . . .	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —

± = lieve acidificaz.

+ = acidificazione

— = assenza di viraggio dell'indicatore

Periodo di osservazione 72 ore

Nella Tavola n. 2 ho riportato quanto sull'argomento scrivono i più moderni testi e gli AA. che particolarmente se ne sono interessati. Dal confronto di tali risultati si nota come i ceppi caduti sotto la mia osservazione abbiano il potere di fermentare il lattosio in maniera molto più evidente di quanto non abbiano constatato gli altri AA.

Fermentazione degli idrati di carbonio secondo diversi AA.

Idrati di carbonio	Secondo Magnusson	Secondo Topley and Wilson	Secondo Bergey	Secondo Ravaglia (ceppo ovino)	Secondo Messieri
Glicerina			±		
Sorbite	—				
Dulcite	—				
Mannite	+	+	+	+	+
Arabinosio	—				
Xilosio	+				
Ramnosio	—				
Glucosio (o destrosio)		+	+	+	+
Fruttosio (o levulosio)			+		
Galattosio			+		
Lattosio	+	±	±	—	+
Maltosio	+	+	+	+	
Saccarosio	+	+	+	+	
Raffinosio			±		
Inulina	—				
Salicina	—				

± = acidificazione entro le 48 ore.

+

-- = assenza di acidificazione.

Il ceppo ovino descritto da RAVAGLIA (17) si è dimostrato totalmente privo di tale potere.

Contrariamente a quanto dice il Bergey nei riguardi dell'actinobacillo, i due ceppi N. 535 e Sper. I°, non hanno determinato alcuna acidificazione, anche dopo lungo periodo d'incubazione, a carico del raffinosio, del galattosio, e della glicerina. In accordo invece con l'osservazione di tutti gli AA. non ho mai osservato produzione di gas.

Positiva la reazione di Legal-Weil per l'indolo, e di Griess per i nitriti. Negative invece sempre per entrambi i ceppi la ricerca del triptofano e la V. P. (Voges-Proskauer).



Tavola 1. - Colorazione Metodo Montroni. Rosette actinobacillari.

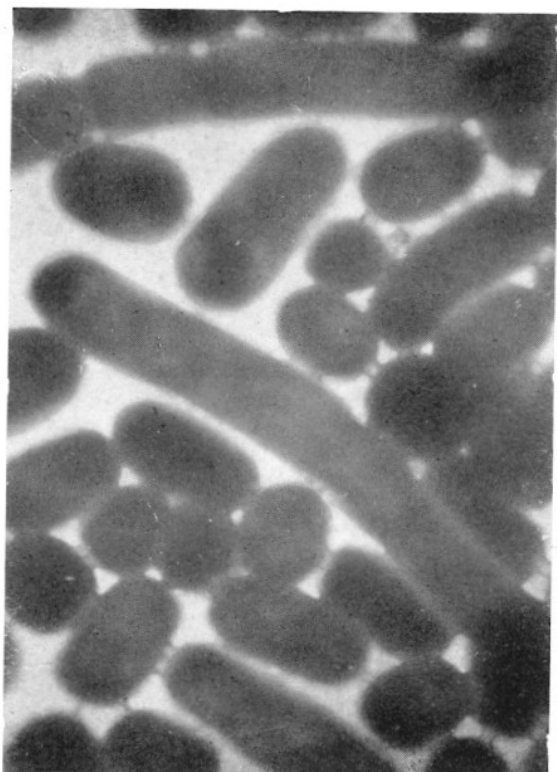


Fig. 1. - Actinobacillo Sper. r⁰, in brodo di 12 ore fissato in formalina.

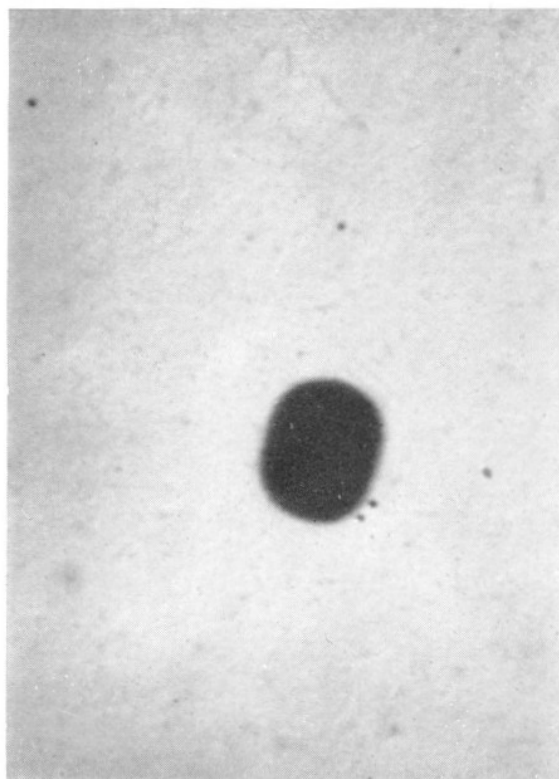


Fig. 2. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 12 ore fissato in acido osmico.



Fig. 3. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 12 ore fissato in acido osmico.

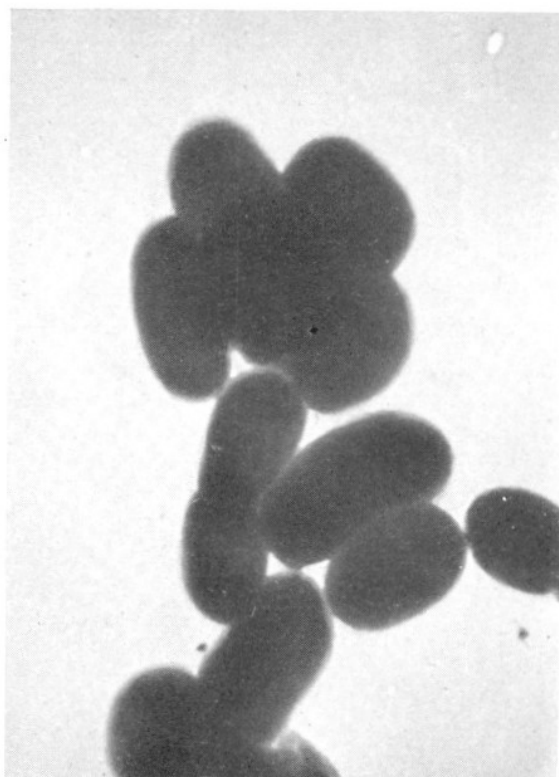


Fig. 4. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 24 ore fissato in formalina.

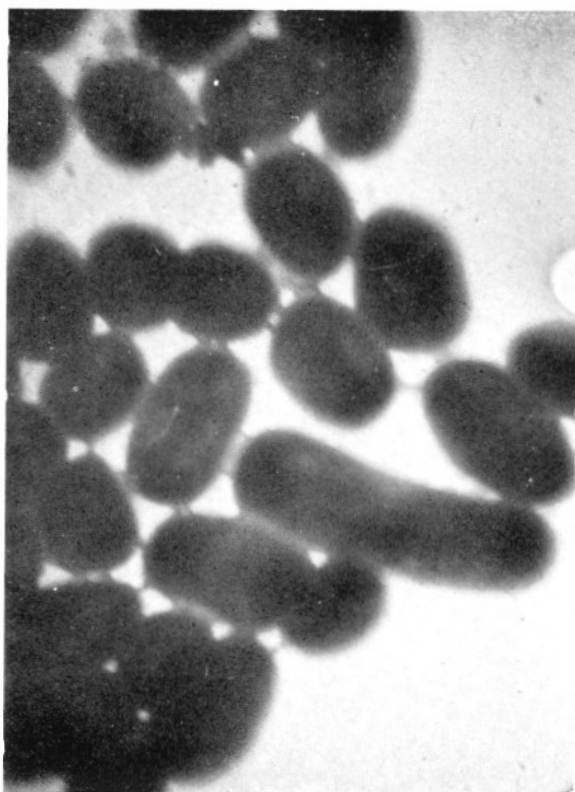


Fig. 5. - Actinobacillo Sper. 1°0, in brodo di 12 ore fissato in formalina.

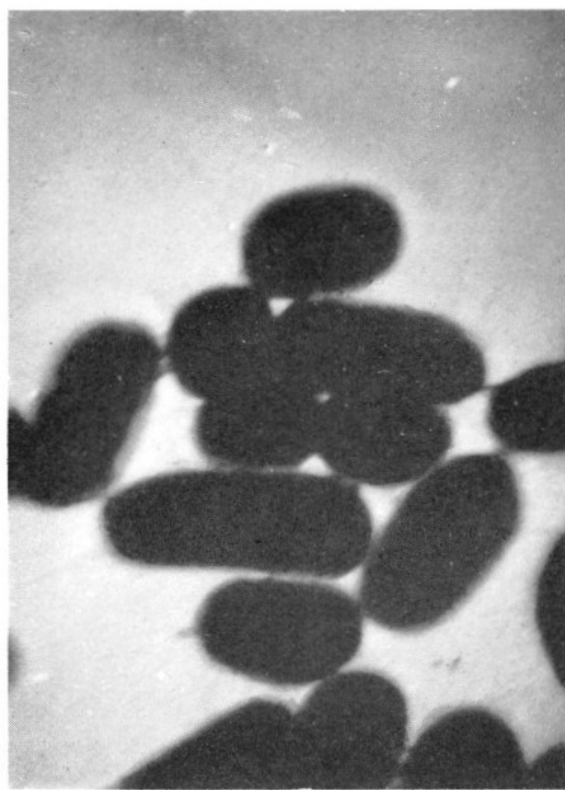


Fig. 6. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 12 ore fissato in formalina.

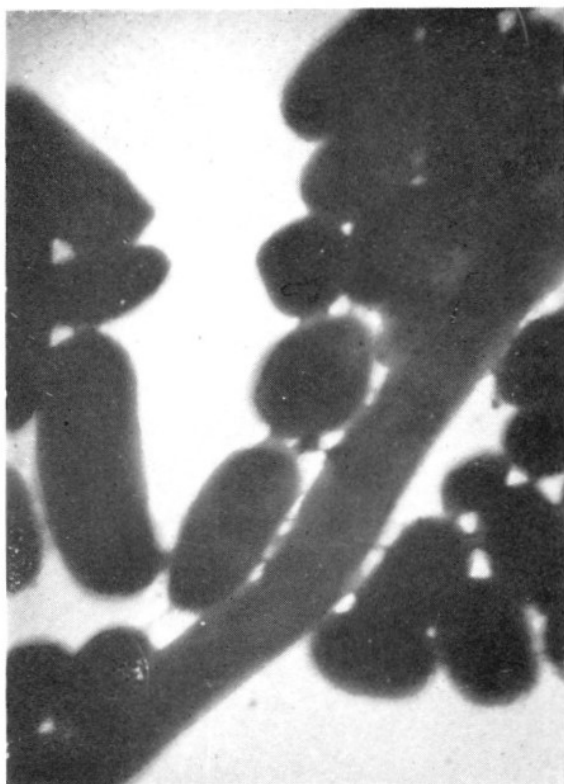


Fig. 7. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 12 ore fissato in formalina.

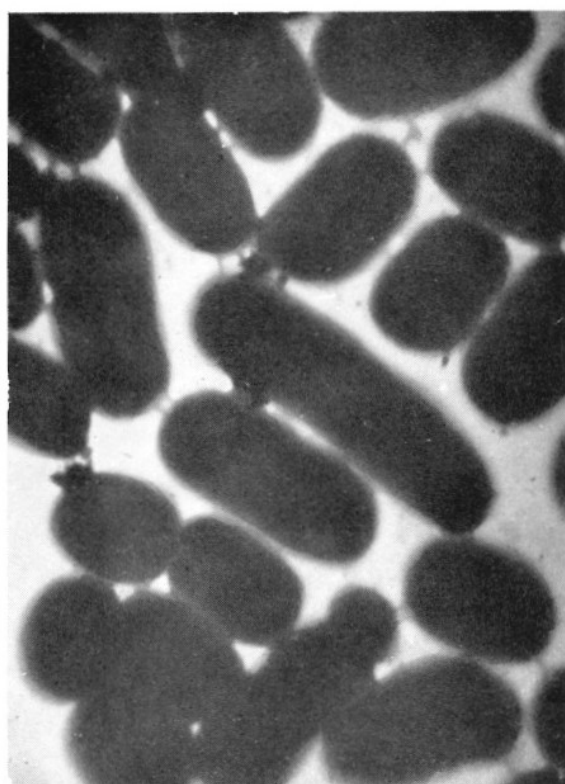


Fig. 8. - Actinobacillo Sper. 1°0, in brodo di 12 ore fissato in formalina.



Fig. 9. - Actinobacillo Sper. 1°, in brodo di 12 ore fissato in formalina.

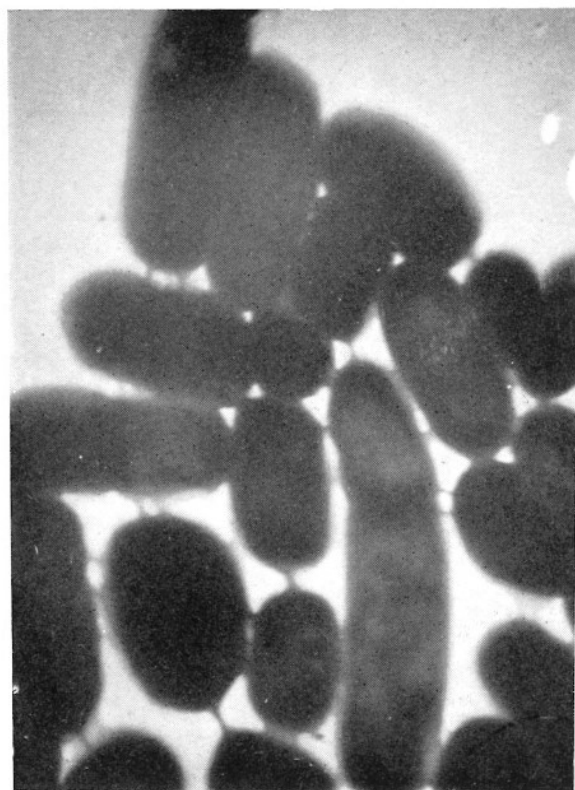


Fig. 10. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 12 ore fissato in formalina.

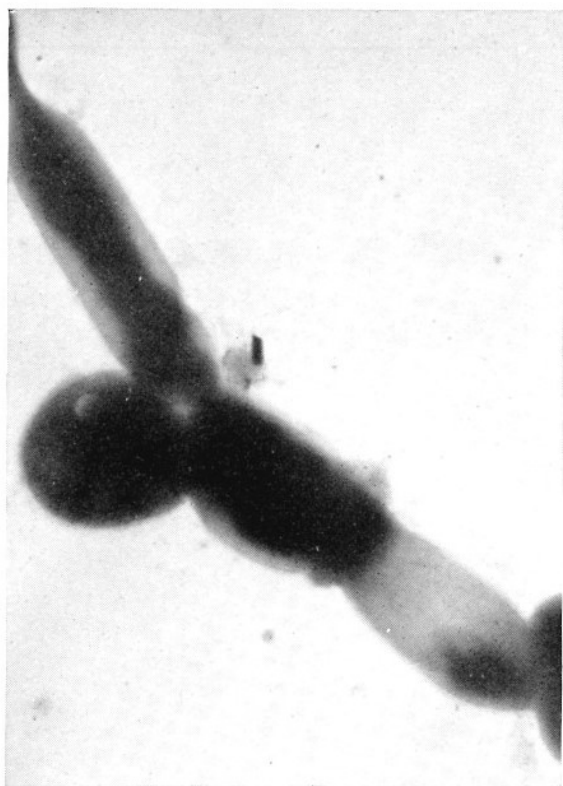


Fig. 11. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 12 ore fissato in acido osmico.



Fig. 12. - Actinobacillo n. 535, in brodo di 24 ore fissato in formalina.

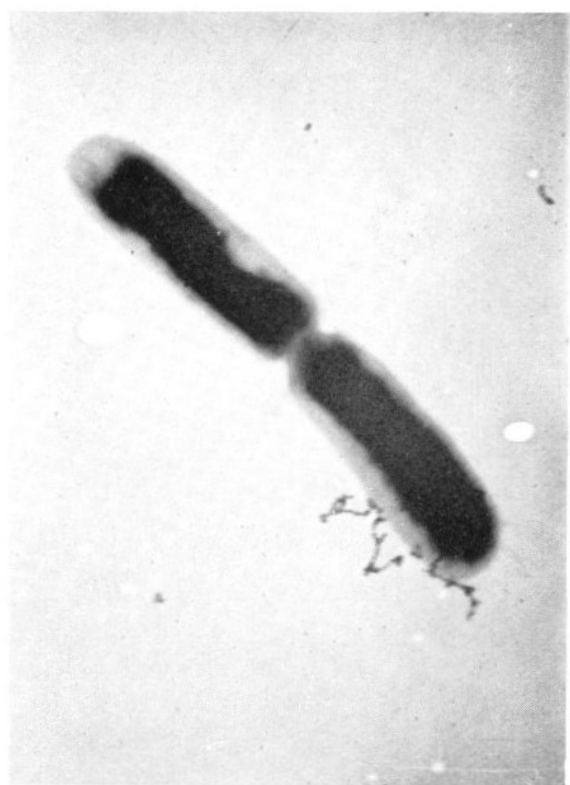


Fig. 13. - Actinobacillo Sper. 1°, in agar di 24 ore fissato in formalina.

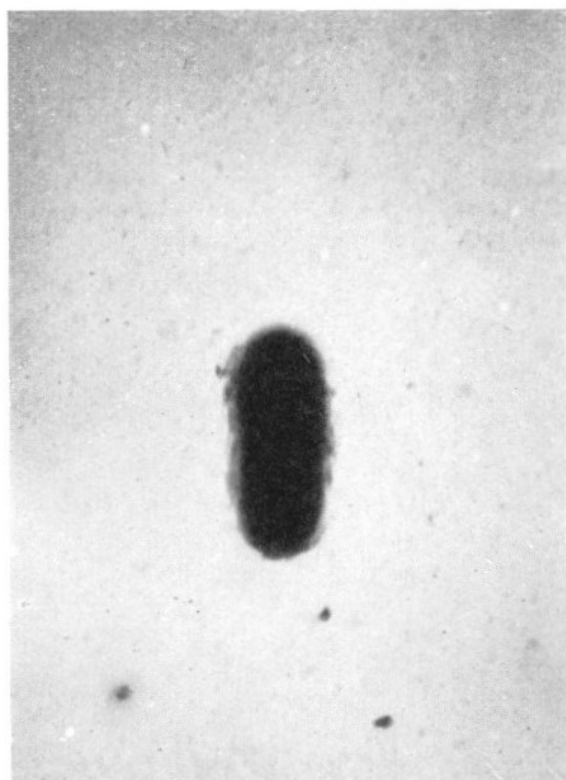


Fig. 14. - Actinobacillo Sper. 1°, essiccato, fissato in acido osmico.



Fig. 15. - Actinobacillo n. 535, essiccato, fissato in acido osmico.

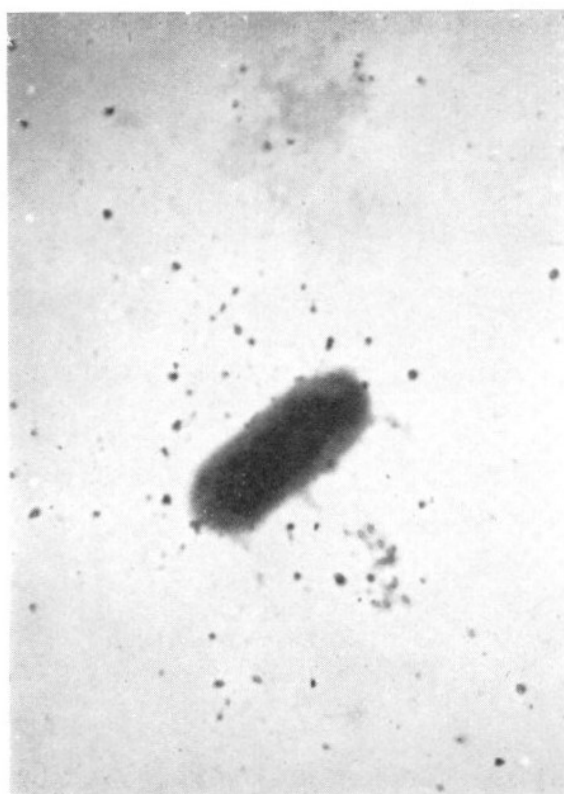


Fig. 16. - Actinobacillo Sper. 1°, essiccato, fissato in acido osmico.



Fig. 17. - Actinobacillo Sper. 1°, essiccato, fissato in acido osmico.



Fig. 18. - Actinobacillo n. 535, essiccato, fissato in formalina.

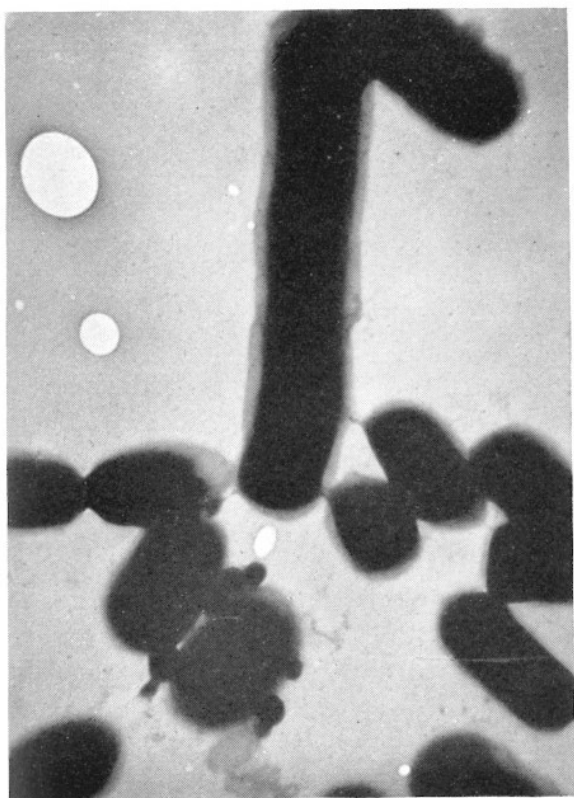


Fig. 19. - Actinobacillo Sper. 1°, dopo un anno d'essiccamento in brodo di 24 ore fissato in formalina.

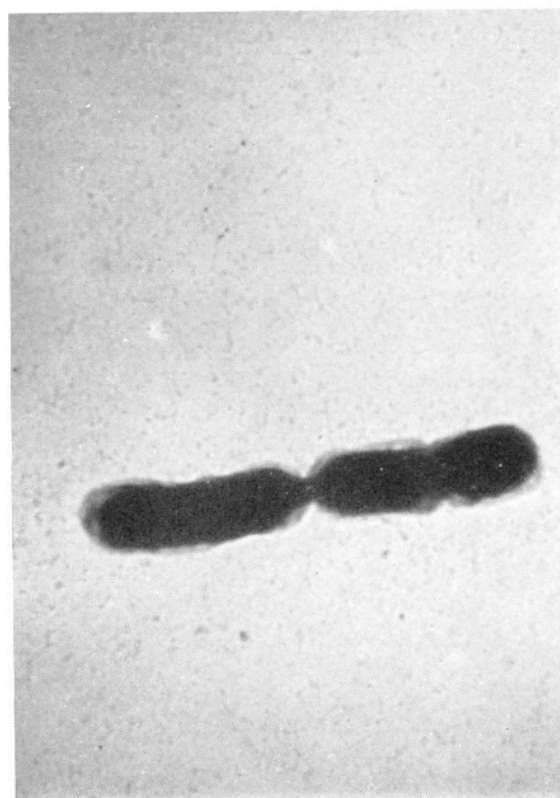


Fig. 20. - Actinobacillo n. 535, dopo un anno d'essiccamento in brodo di 24 ore fissato in formalina.

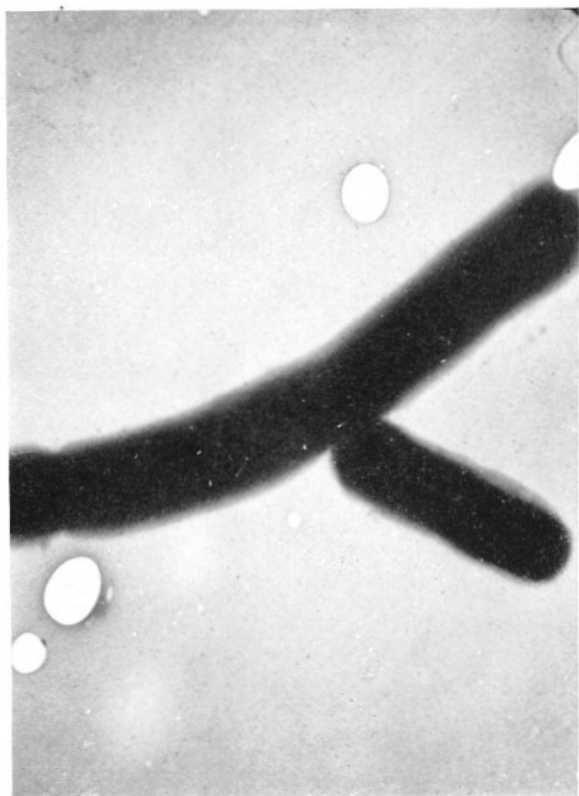


Fig. 21. - Actinobacillo Sper. 1°, dopo un anno d'essiccamento in brodo di 12 ore fissato in formalina.



Fig. 22. - Actinobacillo n. 535, dopo un anno d'essiccamento in brodo di 24 ore fissato in acido osmico.

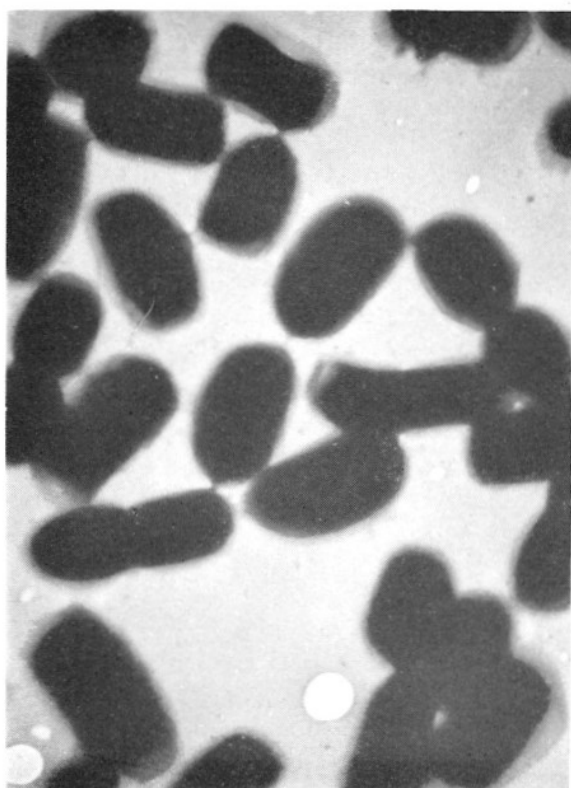


Fig. 23. - Actinobacillo Sper. 1°, dopo un anno d'essiccamento in brodo di 12 ore fissato in formalina.



Fig. 24. - Actinobacillo n. 535, dopo un anno d'essiccamento in brodo di 12 ore fissato in formalina.

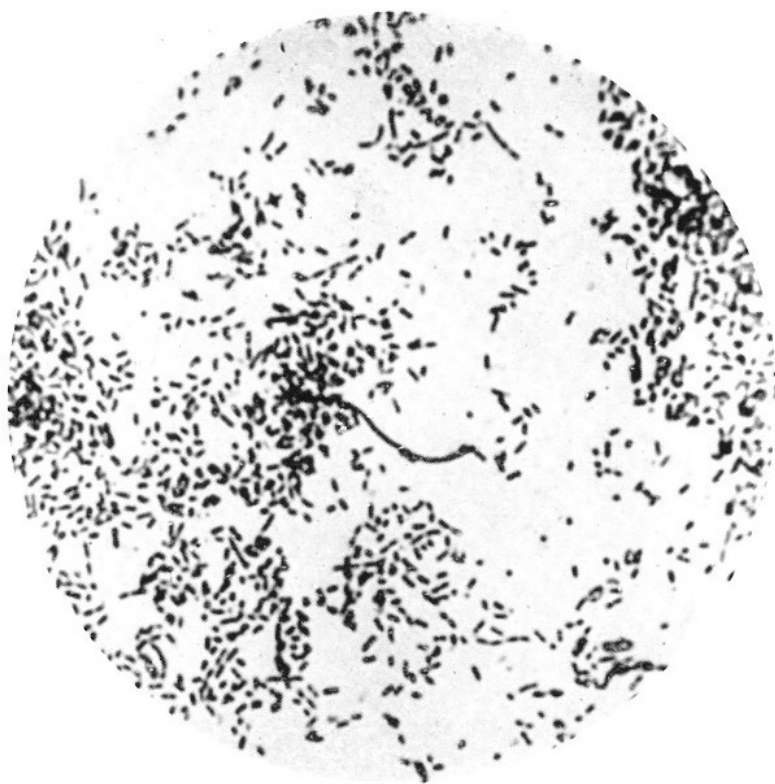


Fig. 25. - Actinobacillo Sper. 1°, prima dell'essiccamento (ingrandimento: diametri 1200).



Fig. 26. - Actinobacillo Sper. 1°, dopo un anno d'essiccamento (ingrandimento: diametri 1200).

FENOMENI DISSOCIATIVI.

Il comportamento dei due ceppi in brodo e la difficoltà riscontrata da tutti gli AA. per poter eseguire con l'actinobacillo la agglutinazione, mi hanno fatto sorgere il sospetto che il germe, e particolarmente i due ceppi che avevo in esame, potessero facilmente andare incontro a fenomeni dissociativi.

Tale mia supposizione era ancor più avvalorata dal fatto che ogni volta che distendevo una ansata di cultura batterica dei due ceppi su di un vetrino diluendola con soluzione fisiologica, mi si verificava una rapida e spesso evidentissima grossa agglutinazione, che mi disturbava non poco nell'allestimento di preparati microscopici.

In base a queste osservazioni, e per convalidare i miei sospetti, ho saggiato i due actinobacilli sia con la tripaflavina che col reattivo di Millon.

Mentre la tripaflavina diluita 1:500 (metodo Alessandrini), confermava in pieno i miei sospetti, determinando per entrambi gli stipiti una rapida ed evidentissima agglutinazione, il reattivo di Millon (metodo Bruce-White) mi ha dato risultati non costanti.

Dense sospensioni batteriche, sia del ceppo 535 che Sper. I° mi hanno infatti virato alle volte verso il giallo-ocra, altre verso il rosso-rosa in maniera alterna e spesso contrastante.

MORFOLOGIA.

L'osservazione dei due ceppi batterici col microscopio ottico sia a fresco che previa colorazione non ha fatto che confermare quanto sull'actinobacillo riportano tutti i testi.

Forma bacillare o coccobacillare, fortemente pleomorfa senza capsula, senza ciglia, immobile, asporigena, nettamente gram negativa, e non acido resistente. Abbastanza frequenti le forme allungate e filamentose (vedi foto I°).

Della morfologia al microscopio elettronico parlerò alla fine della trattazione.

ESSICCAMENTO.

Agar-colture di 24 ore vennero emulsionate con siero normale sterile di cavallo. Due gocce della densa sospensione sono state poste in provettine da sierodiagnosi sterili, chiuse con tappo di cotone e messe in un essiccatore contenente nel fondo, dell'anidride fosforica. Per mezzo di una pompa determinai il vuoto e ve lo mantenni costantemente per 48 ore.

Dopo tale periodo il materiale era completamente disseccato e aderente al fondo e alle pareti delle provette sotto forma di piccole scaglie rossastre.

Tali provettine vennero strozzate e chiuse alla fiamma sotto vuoto e quindi conservate a temperatura aggirantesi tra i 5° e i 10° C.

ESPERIENZE ESEGUITE DOPO UN ANNO DALL'ESSICCAMENTO.

Dopo un anno esatto dall'essiccamento vennero aperte alcune provette ed iniziati gli esami per controllare la vitalità e le eventuali alterazioni subite dai ceppi.

Sciolto e diluito il materiale essiccato con qualche goccia di brodo semplice ho insemizzato tubi di agar e brodo, e tubi di agar e brodo siero. Solo circa la metà delle provette aperte si è dimostrata vitale. In genere ho ottenuto sviluppo con maggior facilità dagli insemamenti in brodo più che in agar.

Comunque qualche provetta mi ha determinato sviluppo anche in agar. L'intorbidamento in brodo semplice è uniforme, mentre in brodo siero si notano numerosi piccoli fiocchetti simulanti un'agglutinazione già fin dalle prime ore di sviluppo.

Su agar e agar siero le colonie sono scarse, rotondeggianti, grandi, colisimili, e presentanti le caratteristiche già precedentemente descritte.

Esse non hanno alcuna aderenza al mezzo colturale e si staccano facilmente con l'ansa.

Le prime colture ottenute però, sia in brodo che in agar hanno uno sviluppo lento e tardivo, hanno cioè una prolungatissima fase latente, a paragone delle colture trapiantate settimanalmente sui comuni terreni. Questa prolungata fase latente, è già stata osservata anche dal PROOM ed HEMMONS (29) su altri germi sottoposti a liofilizzazione e da MAZZARACCHIO (30) che riferisce su di un comportamento analogo a carico di un *corynebacterium pyogenes*. Tale particolare comportamento del resto si ripete in misura molto meno evidente, in ogni cultura batterica che viene trapiantata dopo un lungo periodo.

Il fenomeno credo possa avere una duplice interpretazione: o esso è dovuto ad alterazioni della cellula batterica nei riguardi della vitalità in conseguenza del trattamento subito, oppure l'essiccamento ha notevolmente ridotto la carica batterica uccidendo parte dei germi trattati. Questa seconda interpretazione viene avvalorata dallo scarso ed isolato numero di colonie che sviluppano su agar. Tuttavia la interpretazione dei fenomeni biologici è di tale complessità, che non si può escludere a priori come la prima interpretazione non possa avere un certo valore.

I successivi trapianti riportano in brevissimo tempo la fase latente al normale periodo.

L'attività biochimica dei due ceppi, dopo un anno di essiccamento, (tavola n. 1, col. II) è pure notevolmente modificata.

La dulcite, lo xilosio, il lattosio e il maltosio che venivano fermentati dai due ceppi batterici non lo sono più dopo l'essiccamento. Il ceppo n. 535 ha pure lievemente diminuito la propria attività nei riguardi della mannite e del glucosio.

Tale trattamento quindi, oltre a modificare il periodo della fase latente, viene a ridurre anche notevolmente il corredo enzimatico della cellula batterica. La modificazione però non risulta totalmente irreversibile, perchè così come un breve numero di passaggi sui comuni terreni riportano il periodo di fase latente al normale, nella stessa maniera pochi trapianti della cultura batterica fanno riacquistare parzialmente al germe il proprio corredo enzimatico perduto in conseguenza dell'essiccamento.

Infatti 20 trapianti eseguiti a distanza di 6 giorni l'uno dall'altro, hanno fatto riacquistare ai due ceppi la attività fermentativa nei riguardi della dulcite, e per il ceppo n. 535 anche per la mannite e il glucosio (tav. n. 1, col. III).

Entrambi i ceppi sono risultati non indoligeni alla prova di Legal-Weil. Pure negativa la ricerca del triptofano e la V.P. Positiva invece la reazione di Griess. Tra i caratteri perduti in seguito all'essiccamento è quindi da annoverarsi anche la capacità a produrre indolo.

Nei riguardi della probabile fase dissociata in cui si trovavano prima dell'essiccamento i due ceppi di actinobacillo presi in esame, sia lo sviluppo in brodo, specie in brodo siero, sia soprattutto le prove di agglutinazione rapida con tripaflavina, mi hanno confermato come i caratteri dei due ceppi siano rimasti invariati dopo tale trattamento. La reazione di Millon mi ha però sempre dato viraggi quasi costantemente verso il giallo.

A carico della morfologia del germe, visto al microscopio ottico, sia a fresco che previa colorazione, non ho rilevato alcuna modificazione (v. foto I).

POTERE PATOGENO.

Essendo i due actinobacilli di recente isolamento, non ho ritenuto necessario saggiarne il potere patogeno prima dell'essiccamento. I risultati positivi ottenuti dopo un anno di essiccamento hanno confermato le mie supposizioni sulla iniziale patogenecità dei due ceppi.

Con una subcultura in agar ottenuta da un primo isolamento sia del ceppo n. 535, che sper. I, conservati per un anno essiccati, ho preparato una ricca sospensione batterica in soluzione fisiologica.

Un cm³ di tale sospensione, sia del ceppo n. 535 che sper. I è stata inoculata a due bovini al padiglione auricolare, tra pelle e cartilagine, secondo

la tecnica descritta dal MONTI (33). Ho preferito usare il bovino per questa prova, essendo questo l'animale d'elezione per l'actinobacillosi.

Con questa tecnica infatti, già usata da altri AA. per saggiare la virulenza degli streptococchi e degli stafilococchi piogeni nel coniglio (34), è possibile ottenere nel bovino la riproduzione « in miniatura », come riferisce il Monti della neo formazione actinobacillare.

Già in quarta giornata dalla inoculazione del materiale, è stato possibile rilevare alla palpazione in entrambi i bovini, un piccolo nodo al padiglione dell'orecchio. Il nodo era della grandezza di una noce, duro, privo di alone infiammatorio, lievemente dolente. Nei giorni seguenti i due noduli aumentarono di volume e in ottava-decima giornata da duri fibrosi che erano divennero, specie al centro, molli e fluttuanti. In undicesima giornata, una delle due piccole tumefazioni, sotto modica pressione, si ruppe eliminando uno zaffo di pus bianchiccio, colloso, inodoro, con tutte le caratteristiche sia macroscopiche che tattili del pus actinobacillare. In dodicesima giornata si ottenne lo stesso materiale anche dal secondo piccolo ascesso freddo.

L'esame microscopico a fresco con glicerina al picrocarminio rivelò i caratteristici cespugli di clave. Dal pus previa frantumazione, vennero allestite colture. Il rimanente materiale venne fissato per i preparati istologici. Dal pus di entrambi gli ascessi, ottenni in coltura pura l'actinobacillo. Purtroppo, per un banale incidente, perdetti il ceppo n. 535 isolato dal bovino. Proseguì quindi le esperienze col solo ceppo derivato dallo sper. I che indicai col nome di sper. II.

Tale stipite si presentò in quasi tutti i suoi caratteri simile a quello da cui derivava. Risultarono infatti negative le ricerche: dell'indolo, del tripotofano e la V. P. Positiva invece la prova di Griess.

L'attività biochimica fu riacquistata nei riguardi del lattosio e del maltosio mentre 20 passaggi su agar non avevano ottenuto tale effetto. Si mantenne invece negativa per la dulcite, e di minore intensità per la mannite.

Nonostante il passaggio su animale recettivo, il ceppo venne ugualmente agglutinato dalla tripaflavina, mentre invece con reattivo di Millon virava verso il giallo-ocra. Nessun cambiamento apprezzabile a carico delle affinità tintoriali e della morfologia.

I preparati istologici vennero colorati con ematossilina ed eosina, e col metodo Montroni. Con quest'ultimo metodo la lesione actinobacillare specifica, cioè la rosetta formata dagli ammassi di clave, era evidentissima anche se molto giovane. Le clave risultarono colorate intensamente in rosso, mentre i nuclei delle cellule dei tessuti circostanti assunsero una colorazione violetta, e il protoplasma verdastra (v. disegno tav. III). Essendo il mio scopo

solo quello di poter dimostrare anche istologicamente come il germe, dopo essere stato conservato essiccato per un anno, abbia il potere di riprodurre la lesione specifica, non mi dilungo oltre nella descrizione della lesione in quantochè essa è già stata ampiamente ed esaurientemente descritta.

Successivamente ho ripetuto la stessa esperienza in vivo inoculando direttamente il contenuto di tre provette, sciolto al momento dell'uso. Nessuno dei due bovini inoculati ha reagito positivamente.

Non credo di essere lontano dal vero nel ritenere che ciò possa essere dipeso soprattutto dalla esiguità della carica batterica inoculata.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO.

Allo scopo di meglio valutarne le eventuali variazioni morfologiche, ho controllato l'actinobacillo per mezzo del microscopio elettronico, prima, durante e dopo l'essiccamento (*).

Culture in brodo e agar semplice di 12 e 24 ore vengono centrifugate a 2000 giri per 15 minuti. Dalle colture in agar la patina viene raccolta in acqua bidistillata sterile. Si fissa quindi il sedimento ottenuto con una soluzione di formalina al 10% o con una soluzione di acido osmico al 2%. La fissazione con acido osmico è particolarmente raccomandata perchè evita di alterare la delicata struttura cellulare (35). Il materiale, dopo fissazione, viene ripetutamente lavato con acqua bidistillata sterile, e centrifugato. La tendenza dei due ceppi ad autoagglutinarsi mi ha disturbato non poco e costretto a ripetuti lavaggi. Una goccia del materiale così preparato viene posta sulla pellicola di collodio, lasciata quindi essicare ed osservata al microscopio elettronico.

Per osservare il germe durante l'essiccamento ho sciolto il materiale essiccato con poche gocce di acqua bidistillata, lasciandola a contatto per qualche ora, ho quindi fissato e lavato. Purtroppo con questo materiale nonostante i ripetuti lavaggi, non mi è mai stato possibile ottenere preparati molto chiari e puliti.

La morfologia dell'actinobacillo, vista al microscopio elettronico, concorda pienamente con la descrizione che di essa ne fanno gli AA. in base alle osservazioni al microscopio ottico.

Subito evidentissimo appare il pleomorfismo del germe (fig. 1-2-3).

Vicino ad individui tozzi, a barilotto, coccoidi (fig. 2-4-5-6), compaiono forme allungate, giganti, filamentose (fig. 7-8).

E' evidente come l'actinobacillo passi attraverso a tutti e tre i succes-

(*) Ringrazio il Prof. TRABACCHI, la Prof.ssa MORTARA e il Dott. CASTAGNOLI del Laboratorio di Fisica per l'aiuto prestatomi in queste ricerche.

sivi stadi in cui RUSKA e PIEKARSKI (³⁶⁻³⁷) suddividono lo sviluppo dei germi.

A forme uniformemente opache, compatte, in cui la membrana pericellulare è invisibile o scarsamente visibile (fig. 2-3-4-6-7), succedono forme in cui detta membrana è ben visibile e il protoplasma è meno omogeneo con ispessimenti irregolari e diffusi nel corpo batterico, o è fortemente coartato (fig. 5-8-9-10-13).

Nella terza fase, considerata di senescenza, il protoplasma è ancora più diafano e si raccoglie verso i poli o al centro in formazioni nucleosimili (fig. 1-11-12).

E' da notare come i tre tipi sopradescritti, espressioni di tre periodi evolutivi del germe, si riscontrino indifferentemente in culture di 12 e di 24 ore.

Le fotografie eseguite sui germi durante la conservazione in essiccamento, cioè in stato anabiotico, dimostrano come il germe si trovi in condizioni assai simili per le caratteristiche morfologiche a ciò che si verifica nel terzo periodo o di senescenza. Non mi è stato dato infatti di poter osservare che assai raramente germi a protoplasma compatto e con membrana scarsamente visibile (fig. 14).

Molto più frequentemente invece ho osservato germi con membrana pericellulare visibile e protoplasma fortemente e uniformemente coartato al centro. Non infrequenti pure le forme con protoplasma non uniformemente coartato al centro ma con ispessimenti irregolari e diffusi (fig. 15-16-17-18).

Dopo un anno di essiccamento i due ceppi già ai primi passaggi in brodo dimostrarono di avere riacquistato totalmente la loro primitiva morfologia (fig. 19-20-21-22-23-24).

CONCLUSIONI

Dalle esperienze eseguite è quindi possibile dedurre:

1) L'essiccamento nel vuoto dell'actinobacillo del LIGNIÈRES e SPITZ ne permette la conservazione in una percentuale di circa il 50% per un periodo non inferiore a un anno.

2) Tale trattamento non altera l'attività dei germi, che permangono vitali, in maniera sensibile nè totalmente irreversibile.

3) Mentre infatti l'attività indoligena si è totalmente estinta e non è stato possibile riattivarla neanche per mezzo di un passaggio « in vivo », la maggioranza delle attività biochimiche perse in conseguenza dell'essiccamento, sono state riacquistate dal germe dopo breve numero di passaggi su agar o un passaggio « in vivo ».

4) L'attività patogena è totalmente conservata.

5) Viene presa in considerazione la possibilità che l'actinobacillo in genere e in specie i due ceppi caduti sotto la mia osservazione possano subire fenomeni dissociativi. La dissociazione dei due ceppi n. 535 e sper. I, si è dimostrata irreversibile, anche dopo passaggio su animale recettivo.

6) La morfologia vista al microscopio elettronico conferma ciò che era stato osservato al microscopio ottico. L'osservazione elettronica mette in evidenza come durante l'essiccamento il germe vada soggetto con maggior facilità a fenomeni interpretabili come senescenze.

Tuttavia già ai primi passaggi in brodo esso riacquista rapidamente e totalmente la primitiva morfologia.

7) All'inizio della trattazione, ho fatto osservare come, contrariamente all'opinione corrente il germe sia quasi ubiquitario e come pure contrariamente alle deduzioni che dalle prove di laboratorio si erano potute trarre, il germe sia tutt'altro che labile nell'ambiente esterno se si considera l'andamento epizootologico della malattia.

Non posso certamente in base alle scarse e incomplete esperienze eseguite, trarre deduzioni che potrebbero essere azzardate, tuttavia oggi si conosce un mezzo atto a conservare inalterato, per un periodo assai lungo, in quasi tutte le sue attività, ma soprattutto in quelle patogene, un germe che fino ad ora era considerato tra i più labili.

E' possibile che in natura possa verificarsi un fenomeno simile od analogo a quanto si è ottenuto in laboratorio?

Non credo che oggi si possa rispondere a questa domanda nè in senso affermativo nè in senso negativo. Ad ogni modo se si potesse considerare come possibile in natura un fenomeno simile, cesserebbe di esistere l'incogruenza tra una malattia estremamente tenace e quasi ubiquitaria, e l'estrema labilità nell'ambiente esterno dell'agente eziologico che la genera.

Roma, Sez. Veterinaria - Laboratorio di Microbiologia - 15 novembre 1949.

BIBLIOGRAFIA

- 1) PONFIK - Die Aktinomykose des Menschen. Berlin, 1882.
- 2) NOCARD - L'actinobacillose de la langue « Bull. de la Soc. Centr. de Med. Veter. », 1905.
- 3) PETIT - Actinobacillose linguale simulant à s'y méprendre la tuberculose chez un boeuf « Bull. de la Soc. Centr. de Med. Veter. », 1905.
- 4) HAUER - Un cas d'actinobacillose chez une vache « l'Hygiène de la viande et du lait », 1912.
- 5) CHETIEN - Actinobacillose d'un ganglion sous gloss eu chez le boeuf « l'Hygiène de la viande et du lait », 1912.
- 6) BONGERT - Die Actologie d. Aktinomykose bei Rindern u. Schweinen « Zeitschr. f. H. u. Milchhyg. », 1924.
- 7) KLARIN - Bidrag Till Kannedomen om notkreatursaktinomykosen etiologi « Skand. Veterinartidskrift », 1924.

- 8) HIGGINGS - Proceedings. Amer. Vet. Med. Assoc. Ref. Moore « The Pathology of Inf. Diseases of Animals », Ithaca, 1908.
- 9) GRIFFITH - On the Pathology of bovin actinomycosis « Jour. of Hyg », 1916.
- 10) BOSWORTH - The Causal organismus of Bovine Actinomycosis « Proc. Royal Society of Medicine in Veterinary Record », 1930.
- 11) HULPHERS - Fortsatta undersökningar rörande notkreatursaktinomykosens aetio-
logi « Svensk Veterinartidskrift » s. 273, 1923.
- 12) MAGNUSSON - Quelques cas d'actinomycose expérimentale chez les bovidés « Re-
vue Générale de Med. Vétér », 1923.
- 13) GUNST - Over Verwekkers van Actinomycose Bij Het Rund. « Tydschrift voor
Diergeneeskunde ». Deel 54, 1927.
- 14) LANFRANGHI, MESSIERI, RISTORI - Su di un focolaio di Actinobacillosi in Italia.
« La Nuova Veterinaria », 1929.
- 15) BOTTURA - Actinobacillosi in provincia di Bologna. « La Nuova Veterinaria »,
1930.
- 16) ZAMBOTTO - Actinobacillosi in Provincia di Rovigo. « La Nuova Veterinaria
1930 ».
- 17) RAVAGLIA - L'actinobacillosi della pecora. « La Nuova Veterinaria », 1934.
- 18) MENZANI - Alcune localizzazioni actinobacillari all'apparato genitale. « La Nuo-
va Veterinaria », 1936.
- 19) LIGNIÈRES et SPITZ - L'actinobacilliose « Bull. de la Soc. Centr. de Med. Vétér. »,
1902.
- 20) MESSIERI - L'actinobacillosi bovina. « La Nuova Veterinaria », 1931.
- 21) TUNNICLIFF - J. Infect. Dis. 69. 52, 1941.
- 22) MARCH e WILKINS - Actinobacillosis in Sheep. « Jour of Amer. Vet. Med. As-
soc. », 1939.
- 23) SGAMBATI - L'actinobacillosi in Cirenaica. « La Nuova Veterinaria », 1932.
- 24) SFORZA - L'actinobacillosi in Eritrea. « Arch. Ital. di Scienze Med. Colon », 1941.
- 25) PAULI - A' propos d'un procédé facile pour la conservation des microorganismes
à l'état de vie latente « Bull. Soc. Int. di Microbiologia », Sez. Italiana. IV, 1932.
- 26) MORTON, PULASKI - The preservation of bacterial cultures « J. Bact. » 35, 1938.
- 27) SWIFF - A simple method for preserving bacterial cultures by freezing and
drying « J. Bact. » 33, 1937.
- 28) RAYNER - Simple method for the preservation of cultures and sera by drying
« J. Bact. Path » 55, 1943.
- 29) PROOM, HEMMONS - The drying and preservation of bacterial cultures « The
Jour. of Gener. Micr » 3, 1949.
- 30) MAZZARACCHIO - La conservazione dei microbi mediante l'essiccamento, « Rend.
Ist. Sup. Sanità » II, 1939.
- 31) TOPLEY and VILSON'S - « Principles of bacteriology and immunity » I, 1948.
- 32) BERGEY'S - Manual of Deter. Bact. 1948.
- 33) MONTI - La riproduzione sperimentale dell'actinobacillosi al padiglione auri-
colare dei bovini - III Congr. della Soc. Ital. delle Scienze Veterinarie, 1949.
- 34) PUNTONI - Manuale di microbiologia medica, 1948.
- 35) BABUDIERI - Note di tecnica per la microscopia elettronica. II fissazione dei
preparati. Estratto Rend. Ist. Sup. Sanità IX.
- 36) RUSKA - Morphologische Befunde bei der bacteriophagen Lyse. « Arch. f. Vi-
rusforsch », 2, 1942.
- 37) PIERKARSKI - Cytologische Untersuchungen an Paratyphus und colibakterien
« Arch. f. Microbiol », 8, 1937.