

53. LA CONSERVAZIONE DEI MICROBI MEDIANTE L'ESSICCAMENTO.

In quest'ultimi anni sono stati resi noti diversi metodi di conservazione dei germi (di Heim, Neufeld, Swift, Otten, Pauli ecc.) aventi tutti, come base essenziale, l'essiccamento degli stessi; ciò nettamente in contrasto con le comuni conoscenze microbiologiche su la resistenza dei germi all'essiccamento, ritenuta in genere assai esigua per tutti quelli asporigeni.

Il valore scientifico oltre che pratico della conservazione mediante l'essiccamento è tale che forse non è dato ancora di apprezzarlo in tutta la sua portata. Comunque dai risultati dei diversi sperimentatori resta accertato che mediante tale mezzo di conservazione gran parte dei germi patogeni, sporigeni e non sporigeni, possono rimanere vitali per 2-3-4-6 anni. Si aggiunga infine che, a detta degli stessi AA., i germi, allo stato di essiccamento, non subirebbero alcuna variazione delle loro qualità morfologiche, culturali e biologiche.

Nel Dicembre 1936 iniziai lo studio dell'essiccamento di alcuni germi patogeni per gli animali domestici, scelti fra quelli dotati di una minore resistenza e più suscettibili quindi a risentire i danni di una tale conservazione. Mi son servito della tecnica di Pauli, che mi ha pienamente corrisposto; per ottenere l'essiccamento in minor tempo ho distribuito in ciascun tubo cc. 0,2 di emulsione batterica, invece di cc. 0,5. In tal modo la siero-emulsione batterica, ottenuta raccogliendo la patina culturale di agar-culture di 24 ore con siero normale di cavallo, viene perfettamente essiccata in vuoto fosforico in meno di 24 ore. I tubi contenenti la patina culturale essiccata vanno strozzati e poi chiusi alla fiamma col vuoto.

Recentemente la tecnica di essiccamento è stata oltremodo perfezionata dagli AA. americani mediante il sistema di congelamento dell'emulsione batterica; ciò però richiede degli apparecchi speciali, che non a tutti i laboratori è dato di poter disporre.

Riporto qui appresso l'elenco dei germi essiccati e l'esito delle prove di vitalità:

SPECIE MICROBICA	Data di essiccamento	Data della prova di vitalità
Bact. Erysipelatus suis Ceppo Bologna	20-12-936	20- 3-939
Q » » » Padova	» » »	» » »
» » » » Milano	» » »	» » »
» » » » Roma I	» » »	» » »
» » » » Roma II	» » »	» » »
Bact. Avisepticus Ceppo I	20-12-936	20- 3-939
» » » II	» » »	» » »
» » » III	» » »	» » »
Staphylococcus pyog. aureus Ceppo Tubaro	20-12-936	30- 3-939
» » » albus » Roma	» » »	» » »
Streptococcus pyog. B. Ceppo Lodigiana	23-11-937	10- 3-939
» » » Marchesi	» » »	» » »
» » » Tagliabue	» » »	» » »
Streptococcus Mastiditis Ceppo Vienna	20-12-936	10- 3-939
Diplococcus Vituli Ceppo Brescia 1	23-11-937	10- 3-939
» » » » 3	» » »	» » »
» » » » 7	» » »	» » »
» » » » 8	» » »	» » »
» » » » 14	» » »	» » »
» » » » 18	» » »	» » »
» » » » 22	» » »	» » »
» » » » 27	» » »	» » »
» » » » 29	» » »	» » »
Bact. Prodigiosum	20-11-937	20- 3-939
Bac. Abortus equi Ceppo Roma	20-12-937	20- 3-939
Brucella Abortus bovis Ceppo Roma 19	» » »	» » »
Brucella Melitensis Ceppo Caprarola	» » »	» » »
Corynebacterium pyog. bovis Ceppo Roma	20- 3-937	20- 3-939

Le prove di vitalità hanno dunque accertato la sopravvivenza di tutti i germi da me essiccati per un periodo di tempo da un anno e mezzo a due anni. In generale i trapianti si sono ottenuti facilmente ed i germi hanno dimostrato gli stessi caratteri morfologici, culturali e biologici posseduti prima dell'essiccamento. Vi sono però state dell'eccezioni e su queste mi soffermerò brevemente.

Il *Corynebacterium pyogenes* dopo due anni di essiccamento si è sviluppato al primo trapianto soltanto nei terreni al sangue; le culture in agar e brodo siero, in agar e brodo semplice sono rimaste sterili. Questa incapacità di sviluppo s'è conservata fino al 3° passaggio in serie nei terreni al sangue, dopo il quale è stato possibile ottenere la cultura anche negli altri terreni. Lo stesso batterio inoltre ha presentato, nella prima cultura dopo l'essiccamento, una completa modificazione delle sue qualità tintoriali e cioè una netta Gram-negatività; tale variazione è scomparsa nelle successive subculture.

I ceppi di *B. Erysipelatus suis* ed il ceppo III di *B. Avisepticus* hanno presentato anch'essi una modificata esigenza culturale, giacchè lo sviluppo di essi è stato ottenuto nei terreni al siero e non in quelli comuni.

Infine lo Streptococco piogeno B emolitico Ceppo Marchesi nella prima subcultura ha presentato una dissociazione batterica, che descriverò illustrandola con alcune fotografie.

Il fenomeno dissociativo fu da me rilevato nelle subculture in agar-sangue dalla prima brodo-siero cultura ottenuta dopo l'essiccamento di due anni.

Su le linee di strusciamento erano prevalenti delle colonie piccole, puntiformi, mentre qua e là molto rare si distinguono nettamente per la loro maggiore dimensione delle altre colonie.

Esegui l'isolamento in culture pure dalle due differenti qualità di colonie e su tali culture un completo studio batteriologico.

Per comodità di esposizione indicherò le due fasi di dissociazione con le lettere N e G e cioè con N la fase normale rappresentata dalle colonie piccole e con G quella dalle colonie grandi.

La fase N in brodo-sangue ed in brodo-siero presenta nelle 24 ore uno sviluppo abbondante con deposito fioccoso al fondo e alle pareti della provetta; in seguito il terreno si presenta completamente o parzialmente limpido. Scuotendo la provetta i fiocchetti si dissolvono in gran parte per poi precipitare ancora. Microscopicamente si rileva la presenza di streptococchi a catene lunghe e conglomerate, nettamente Gram-positive.

In agar-sangue la variante N dà colonie piccole, puntiformi, B emolitiche (fig. 1); in agar-siero tali colonie, di uguali dimensioni, si rilevano semiopache e di color azzurognolo (fig. 2). Con l'ansa di platino si riesce a staccare facilmente la patina batterica ed egualmente bene a stemperarla in soluzione fisiologica, ottenendo una emulsione omogenea. In agar semplice si ha lo stesso comportamento.

La fase G in brodo-sangue e brodo-siero presenta nelle 24 uno sviluppo molto abbondante, con intorbidamento uniforme del liquido culturale; successivamente si ha un deposito, ma il liquido sovrastante resta sempre uniformemente torbido. Microscopicamente si mette in evidenza il prevalere di streptococchi a catene brevi, formate di quattro-cinque elementi.

In agar-sangue la variante G dà colonie B emolitiche, di grandezza due-tre volte maggiore delle colonie di fase N (fig. 4). In agar-siero si ha la stessa caratteristica e cioè la maggiore grandezza (fig. 5); inoltre le colonie si rivelano di aspetto opaco e di color bianco-porcellana. Con l'ansa di platino difficilmente si riesce a staccare dalla superficie culturale la patina batterica, fortemente aderente al substrato nutritivo ed eguale difficoltà s'incontra nel tentativo di stemperarla in soluzione fisiologica.

Oltremodo interessante è il comportamento di questa fase G su l'agar semplice. Nella prima subcultura in agar semplice sia da brodo-sangue che da brodo-siero cultura la fase G mantiene immutati i caratteri culturali: colonie grosse, opache, porcellanacee, aderenti al substrato. Nei successivi passaggi in serie le colonie diventano sempre più piccole, più trasparenti ed infine assumono lo stesso aspetto di quelle della fase N.

Un comportamento quasi identico al precedente si verifica nelle subculture in brodo semplice.

Per meglio valutare i caratteri delle due fasi dissociative, ho fatto l'esame a piccolo ingrandimento (40-50 diametri) di colonie isolate di ciascun tipo.

Le colonie di fase N si presentano perfettamente circolari ed omogenee, con una zona centrale anch'essa circolare più intensamente colorata (fig. 5).

Le colonie della fase G hanno un margine regolarmente circolare; presentano un centro più intensamente colorato e di forma irregolare, avvolto da un alone biancastro e più esternamente circondato da un anello concentrico di colore anch'esso più scuro (fig. 6).

Le due fasi N e G hanno dimostrato lo stesso grado di virulenza verso il topino, che è stato ucciso dopo 24 ore dall'inoculazione di cc. 0,1 di brodo-cultura di 24 ore.

A questo punto credo opportuno accennare ai motivi che mi hanno fatto adottare la distinzione su detta; mentre sarebbe stato più semplice riportarsi ai tipi di varianti descritti per gli streptococchi da Cowan, Grumbach e Spassky.

Cowan distingue negli streptococchi due fasi: una S ed un'altra R nel senso di Arkwright.

Grumbach nega che negli streptococchi vi sia una vera forma R; egli distingue invece una forma normale da un'altra in preda a fenomeni di batteriofagia.

Spassky, che ha studiato la dissociazione dello streptococco della scarlattina, distingue quattro tipi: S; R; O; L.

Il tipo S dà brodoculture con intorbidamento uniforme.

Il tipo R dà in brodocultura un deposito fioccoso; in agar colonie tre-quattro volte più grandi di quelle del tipo S e con margine irregolare.

Il tipo O dà colonie grandi quanto quelle del tipo R, il loro margine è però regolarmente rotondo. Sarebbe una forma di transizione fra S ed R ed infatti nelle culture in brodo del tipo O compaiono tutti gli altri tipi.

Il tipo L dà in agar colonie piccole, che dopo 24-48 ore mostrano la lisi. Il trapianto in terreno liquido o solido non avviene (colonie suicide).

La fase da me indicata con la lettera G, per alcuni caratteri, potrebbe riportarsi alla fase R di Cowan od al tipo O di Spassky. Io però ne escludo l'identità.

Infatti ho dimostrato che le colonie di fase G hanno il margine regolarmente rotondo e perciò sono prive della caratteristica essenziale della fase R nel senso di Arkwright; d'altra parte, poichè nei passaggi in serie nei terreni solidi o liquidi al sangue o al siero la fase G rimane invariata, non è possibile identificarla con la fase O di Spassky.

Nelle numerose culture da me eseguite, anche in quelle di vecchia data, non ho osservato fenomeni di batteriofagia.

La caratteristica prevalente delle due fasi da me osservate è la dimensione delle colonie e perciò che ho indicato con N — normale la fase con colonie di dimensioni normali e con G — quella con colonie più grandi.

CONCLUSIONI.

Allorchè, nelle ulteriori ricerche, avrò stabilito il limite di vitalità dei germi essiccati, potrò giungere a conclusioni definitive.

In base a quello che finora ho accertato, posso stabilire i seguenti principi:

1) Che lo stato di vita latente dei germi, essiccati secondo la tecnica di Pauli, risponde alle condizioni per una buona e lunga conservazione dei germi stessi, i quali in genere mantengono invariati i loro caratteri morfologici, culturali e biologici.

2) Che alcuni germi di maggiore sensibilità possono subire, in tale stato, delle transitorie modificazioni delle proprie esigenze culturali, dei caratteri tintoriali e presentare una vera dissociazione batterica.

In relazione alla possibilità di una modificazione delle esigenze culturali è necessario eseguire i primi trapianti dopo l'essiccamento su i terreni culturali di elezione dei singoli germi.

Infine questa stessa modificazione delle esigenze culturali può essere invocata come la possibile causa di alcuni risultati negativi ottenuti da precedenti ricercatori in analoghe prove di essiccamento dei germi.

RIASSUNTO

L'A. ha conservato vivi e vitali, per un periodo di tempo da un anno e mezzo a due anni, 27 Ceppi di germi patogeni per gli animali domestici, essicandoli in vuoto fosforico e mantenendoli in tubi chiusi alla fiamma col vuoto.

Alcuni dei germi essicati hanno presentato transitorie modificazioni delle proprie esigenze culturali e dei caratteri tintoriali, altri una vera dissociazione batterica.

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

BIBLIOGRAFIA

1. ANDREUCCI A. - « Contrôle de la méthode de Pauli pour la conservation de souches bactériennes », *Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microb.*, 8, XI, 422 (1936).
 2. GRUNBACH A. - « Ueber Streptokokkenbakteriophagen und Dissoziationserscheinungen an Streptokokken », *Centr. f. Bakt. O.*, 118, 76 (1930).
 3. PAULI P. - « A propos d'un procédé facile pour la conservation des microorganismes à l'état de vie latente », *Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microb.*, 4, IX, 239 (1932).
 4. - SPASSKY N. - « Untersuchungen ueber die Scharlachstreptokokken-Dissoziation », *Centr. f. Bakt. O.*, 128, 151 (1933).
-
-

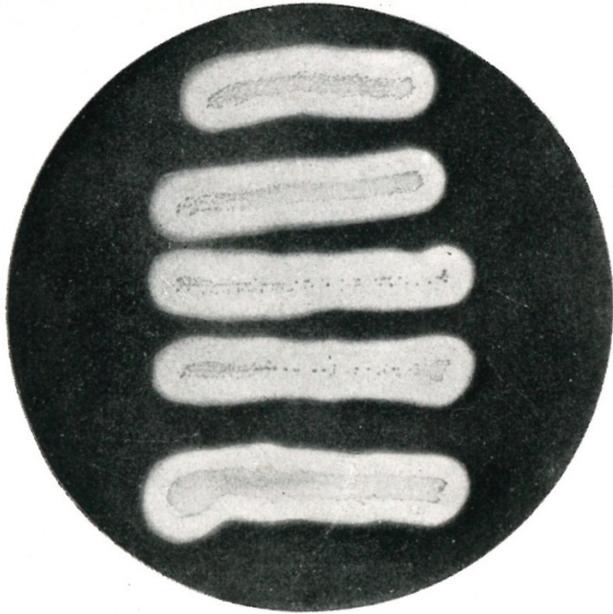


Fig. 1

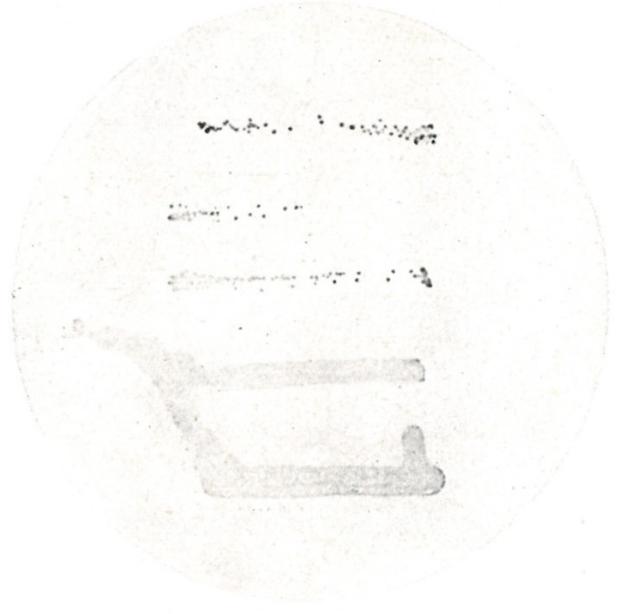


Fig. 2

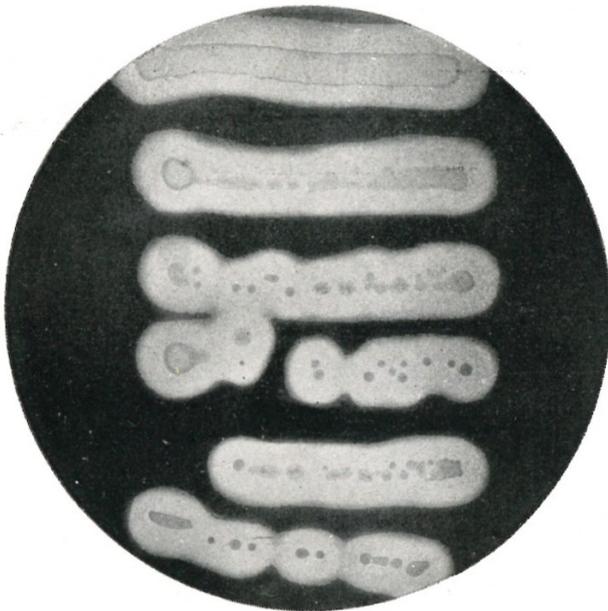


Fig. 3

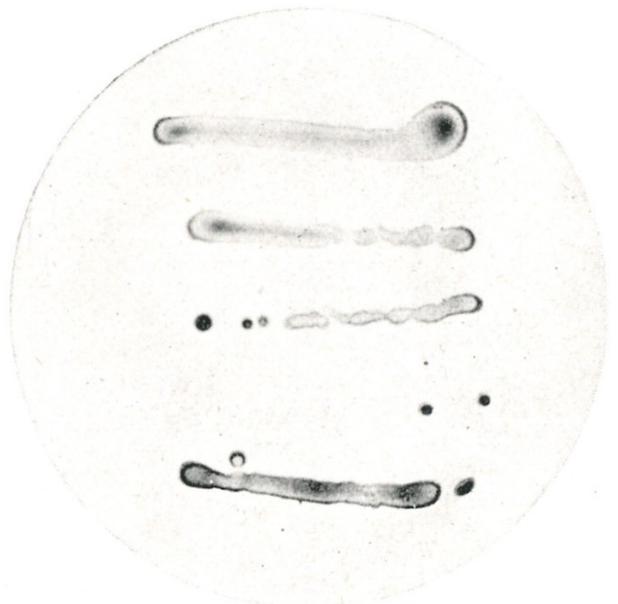


Fig. 4

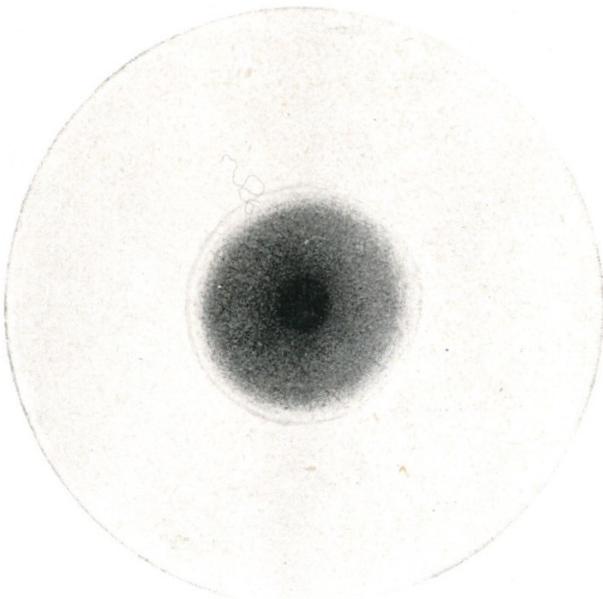


Fig. 5

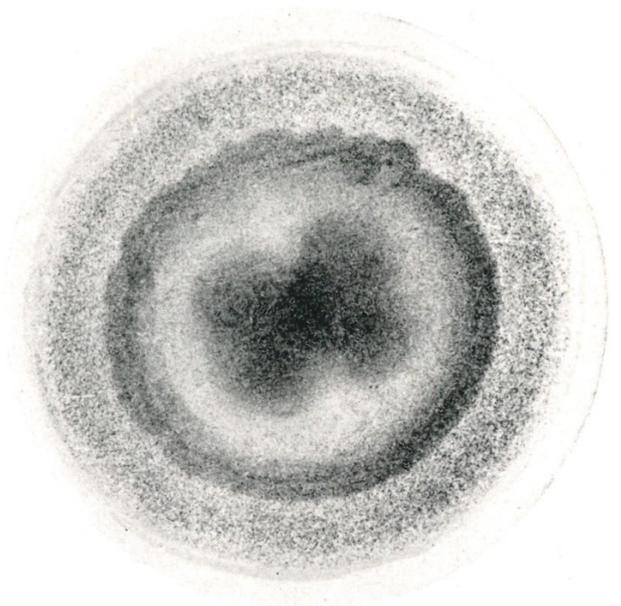


Fig. 6