19. LA COLTURA DEI GERMI ANAEROBI NEI TERRENI LIQUIDI ALL'ACIDO ASCORBICO E VACCINI CON ESSI PREPARATI.

E' noto che nella pratica corrente di laboratorio, la coltura in aerobiosi dei germi anaerobi viene ottenuta con l'aggiunta ai terreni colturali di sostanze chimiche, quali ad esempio la cisteina, il glutatione, l'acido tioglicolico, il solfito di sodio, l'acido piruvico, il glucosio, ecc. Tali sostanze agirebbero modificando il potenziale d'ossido riduzione dei mezzi di coltura. La presenza infatti dell'ossigeno o dell'acqua ossigenata in piccole dosi nel brodo nutritivo, provoca un arresto assai lungo nella crescita di un germe anaerobio, senza che questo sia ucciso.

Questo arresto corrisponde precisamente al tempo necessario perchè l'anaerobio possa, producendo sostanze riduttrici (composti solfidrilici) abbassare il potere d'ossido riduzione del mezzo colturale ad un valore necessario al suo sviluppo. Ora l'aggiunta di sostanze riduttrici al mezzo colturale riduce la durata di tale periodo negativo, per cui l'anaerobio può svilupparsi in poco tempo.

In questi ultimi anni è stata usata a questo scopo, con successo, l'acido ascorbico, che secondo il parere dei diversi AA. agirebbe come sostanza riducente.

Già il Weinberg ⁽¹⁾ cita l'acido ascorbico fra le sostanze che possono permettere lo sviluppo degli anaerobi in presenza dell'aria.

Il merito di avere per primo dimostrato sperimentalmente l'influenza dell'acido ascorbico sulla crescita degli anaerobi in presenza dell'aria, spetta all'Ehrisman ⁽²⁾ il quale aggiunse ai vari terreni colturali l'1‰ di una soluzione di Cebion Merk in acqua distillata, preventivamente neutralizzata con NaOH N/5 e sterilizzata per breve tempo a bagnomaria. L'A. notò infatti che l'acido ascorbico spiegava un'azione favorevole sulla crescita di vari germi anaerobi in terreni liquidi mentre non aveva nessuna influenza nelle semine in superficie di agar.

Gorrieri (3) nel 1936 per primo in Italia eseguì alcune prove di controllo su questo metodo, sostituendo poi in secondo tempo all'acido ascorbico puro il limone e il pomodoro. L'A. preparò palloncini di brodo glucosato al 2 %, con un pH 8,2-9 ai quali aggiunse in gruppi distinti l'1 ‰ di vitamina C; pezzi e succo di limone; pezzi e succo di pomodoro prelevati asetticamente. Il pH sopra citato era tenuto così alto dall'A. per neutralizzare l'acidità prodotta dall'aggiunta al brodo delle sostanze innanzidette. In tubi contenenti 6 cc. di questi terreni nutritivi insemenzò due gocce di brodo coltura tetanica di 15 giorni d'età e conclude:

1) Che l'aggiunta della polpa di pomodoro, forse meglio del succo, è un mezzo, almeno quanto il Tarozzi e non meno certo dell'acido ascorbico puro, assai pratico per la coltura del bacillo tetanico, il quale trova anche un habitat abbastanza propizio in substrati contenenti pezzi di limone.

2) Che l'aggiunta di polpa di pomodoro al brodo semplice, e di succo di limone al brodo glucosato non dà luogo al manifestarsi dell'attività produttrice del bacillo tetanico.

Cianci e Palmieri (4) Klinger e Guggenhein (5) Faurest (6) Patoka e Jlavsky (7) confermano in seguito la favorevole azione che esplica la vitamina C nella crescita degli anaerobi in presenza dell'aria.

Gorrieri (8) Cianci e Palmieri (9) accertarono pure che anche alcuni frutti vegetali aggiunti sterilmente al brodo rendevano questo terreno atto allo sviluppo degli anaerobi.

Le soddisfacenti prove ottenute dagli AA. sopracitati potevano dispensarmi dal controllare il metodo; tuttavia ho voluto ripetere tali esperienze sostituendo al brodo ordinario, o al brodo glucosato quello all'estratto di carne (Acas), di facile ed economica preparazione, con l'aggiunta o no dell'1 % di siero normale di cavallo. A tale scopo ho distribuito del brodo di estratto di carne a pH 7,2 in tre gruppi di matracci, nella quantità di cc. 50 per ogni matraccio, aggiungendo poi ai palloncini di ogni gruppo rispettivamente l'1 ‰ di acido ascorbico, succo di arancia e di limone nelle quantità sotto elencate.

L'acido ascorbico usato è quello normalmente in commercio; l'ho sciolto in acqua distillata e l'ho filtrato poi per candela. Il succo di arancia e di limone li ho preparati ed aggiunti secondo la tecnica di Cianci

e Palmieri, e cioè ho filtrato per candela Chamberland F. i succhi neutralizzati in precedenza con carbonato di sodio e li ho aggiunti nella quantità di 1,5 a 0,5 per ogni 5-6 cc. di brodo comune.

Ho avuto però l'avvertenza di scaldare questi succhi per mezza ora a 80° in modo da distruggere i numerosi fermenti presenti in essi e di non rigenerare il terreno, onde eseguire così gli esperimenti nelle condizioni meno favorevoli.

Per ogni gruppo di palloncini ho insemenzato i seguenti ceppi: B. tetani, Oedematiens, B. Putrificus, Septicus, Chauvoei, Botulinus A e B, Parabotulinus Americano. In tutti i palloncini insemenzati con una goccia di brodo di 24 h. dei ceppi menzionati in terreno Tarozzi sterilizzato, si è ottenuto un abbondante e rigoglioso sviluppo con produzione di gas; nei palloncini di controllo assenza di sviluppo. Lo sviluppo è stato più notevole nel brodo al succo di arancia che in quello al succo di limone e all'acido ascorbico, forse in relazione agli zuccheri presenti in questo succo. Inoltre nelle colture all'acido ascorbico non fu notata la presenza di gas.

In un'altra serie di prove ho constatato che i brodi di carne ai quali avevo aggiunto pezzetti di arancia, limone, mela, patate, carote, e bucce di arancia e limone erano atti allo sviluppo dei germi anaerobi anche quando venivano sterilizzati per mezz'ora a 120° C.

Ho voluto poi vedere se il terreno alla vitamina C potesse trovare applicazione nella preparazione di vaccini contro le gangrene gassose degli animali domestici. Ho creduto pertanto di un certo interesse istituire alcune ricerche atte a dimostrare la possibilità di sostituire nella pratica corrente il nuovoterreno, al brodo di fegato attualmente in uso. Dal lato pratico poi tale terreno sarebbe economicamente vantaggioso e di netto carattere autarchico, potendosi con netto vantaggio sostituire all'acido ascorbico puro, succhi di arancia e di limone, che come è noto contengono tale vitamina in grande quantità.

Ai fini delle ricerche propostemi, ho preparato, secondo la tecnica del primo esperimento, tre serie di palloncini contenenti 500 cc. di brodo estratto di carne col 5 % di siero normale di cavallo (favorisce lo sviluppo e funziona da soluzione tampone) e alla prima serie di palloni ho aggiunto l'I^o‰ di acido ascorbico, alla II^a il 30 % di soluzione di arancia a pH 7,2, nella III^a il 42 % di una soluzione di limone allo stesso pH.

Questi palloncini insieme ad altri contenenti brodo Martin glucosato all'1%, e brodo glucosato al 2% con l'1‰ di vitamina C li ho insemenzati con un goccia di brodo coltura di 24 h di *B. Septicus* e di *B. Chauvoei*. Nei palloncini contenenti brodo Martin, subito dopo la semina dei germi, ho fatto il vuoto e li ho chiusi alla fiamma.

Dopo 24-48 ore di sviluppo ho eseguito il conteggio microscopico diretto dei germi ed ho notato che i due ceppi presentano uno sviluppo più abbondante nel brodo ai succhi di arancia e di limone che in quelli alla vitamina e brodo Martin (non si esclude che ciò sia in rapporto all'azione protettiva degli acidi organici presenti nei succhi aggiunti che ritarderebbero la distruzione della vitamina C), mentre molto scarso è lo sviluppo del bacillo *septicus* nel brodo glucosato con vitamina.

Con tutte le colture, ad eccezione di quelle in brodo glucosato alla vitamina C. le quali per lo scarso sviluppo batterico dovevano ritenersi inadatte ad essere impiegate per questo esperimento, ho proceduto a prove di virulenza inoculando quattro gruppi di cavie con quantità di colture progressivamente decrescenti, calcolando in modo da avere per ogni gruppo lo stesso numero di germi.

Lo sviluppo dei germi in brodo Martin è avvenuto con ritardo rispetto a quello avutosi negli altri terreni. Perciò, mentre le colture nei terreni al limone e all'arancia sono state inoculate dopo 24 h., quello in brodo Martin lo sono state dopo tre giorni d'incubazione.

Come risulta nella tabella N. 1 la virulenza dei germi non presenta variazioni notevoli nei vari terreni usati.

Delle stesse colture ho saggiato il potere immunizzante: dopo averle formolate al 5‰ le ho lasciate in termostato per 6 giorni e dopo aver eseguito gli opportuni controlli di sterilità ed innocuità ho inoculato con le diverse colture vari gruppi di cavie per accertare l'immunità conferita ad esse.

Come prove di controllo ho inoculato altri due gruppi di cavie con vaccini del commercio; uno contro il *C. Sintomatico*, costituito da germi vivi attenuati, e l'altro contro le gangrene gassose, costituito da germi uccisi col formolo. Dopo 15 giorni dalla vaccinazione ho inoculato ad ogni cavia di ciascun gruppo e ad altre due, quale controllo, una dose m. m. del corrispondente germe che aveva servito per l'immunizzazione. Le stesse dosi le ho inoculate ai due gruppi di cavie immunizzate col

TABELLA I.

Brodo estratto di carne con succo di arancia			Brodo estratto di carne con succo di limone			Brodo estratto di carne con vitamina C			Brodo Martin		
Data	Peso cavie gr.	Numero dei germi inoculati	Esito	Data	Peso cavie gr.	Numero dei germi inoculati	Esito	Data	Peso cavie gr.	Numero dei germi inoculati	Esito
9-3	380	66.000.000	+ 20 h.	9-3	400	66.000.000	+ 20 h.	11-3	360	66.000.000	+ 24 h.
»	410	66.000.000	+ 28 h.	»	380	66.000.000	+ 24 h.	»	380	66.000.000	+ 22 h.
»	350	33.000.000	+ 24 h.	»	360	33.000.000	+ 28 h.	»	400	33.000.000	+ 48 h.
»	360	33.000.000	+ 40 h.	»	350	33.000.000	+ 28 h.	»	410	33.000.000	+ 48 h.
»	390	16.000.000	vive	»	370	16.000.000	vive	»	380	16.000.000	vive
»	400	16.000.000	vive	»	340	16.000.000	vive	»	390	16.000.000	vive
CEPPO B. SEPTICUS.											
10-3	340	66.000.000	+ 44 h.	10-3	350	66.000.000	+ 60 h.	10-3	380	66.000.000	+ 60 h.
»	390	66.000.000	+ 60 h.	»	400	66.000.000	vive	»	400	66.000.000	+ 44 h.
»	370	33.000.000	vive	»	380	33.000.000	vive	»	390	33.000.000	vive
»	400	33.000.000	vive	»	360	33.000.000	vive	»	370	33.000.000	vive
»	370	16.000.000	vive	»	400	16.000.000	vive	»	390	16.000.000	vive
»	380	16.000.000	vive	»	360	16.000.000	vive	»	410	16.000.000	vive
CEPPO B. CHAUVOEI.											
10-3	340	66.000.000	+ 44 h.	10-3	350	66.000.000	+ 60 h.	12-3	380	66.000.000	+ 36 h.
»	390	66.000.000	+ 60 h.	»	400	66.000.000	vive	»	400	66.000.000	vive
»	370	33.000.000	vive	»	380	33.000.000	vive	»	370	33.000.000	vive
»	400	33.000.000	vive	»	360	33.000.000	vive	»	350	33.000.000	vive
»	370	16.000.000	vive	»	400	16.000.000	vive	»	390	16.000.000	vive
»	380	16.000.000	vive	»	360	16.000.000	vive	»	410	16.000.000	vive

TABELLA II.

Brodo estratto di carne con succo di arancia				Brodo estratto di carne con succo di limone				Brodo estratto di carne con vitamina C				Brodo Martin			
Data	Peso in gr. delle cavie	Quantità inoculata sottocute in cc.	D. m. m. di bacillo inoculata dopo 15 giorni	Esito al 15° giorno	Data	Peso in gr. delle cavie	Quantità inoculata sottocute in cc.	D. m. m. di bacillo inoculata dopo 15 giorni	Esito al 15° giorno	Data	Peso in gr. delle cavie	Quantità inoculata sottocute in cc.	D. m. m. di bacillo inoculata dopo 15 giorni	Esito al 15° giorno	
17-3	350	2	1	+ 24 h.	17-3	380	2	1	vive	17-3	380	2	1	vive	
»	400	2	1	vive	»	400	2	1	vive	»	400	2	1	vive	
»	310	2	1	vive	»	350	2	1	+ 70 h.	»	350	2	1	+ 90 h.	
»	350	2	1	vive	»	360	2	1	vive	»	380	2	1	+ 70 h.	
»	380	2	1	+ 484	»	390	2	1	vive	»	360	2	1	vive	
»	370	2	1	vive	»	400	2	1	vive	»	350	2	1	vive	
»	400	2	1	vive	»	410	2	1	vive	»	410	2	1	vive	
»	350	1	1	vive	»	380	1	1	vive	»	420	1	1	vive	
»	380	1	1	+ 48 h.	»	360	1	1	+ 48 h.	»	380	1	1	+ 48 h.	
»	360	0,0	1	+ 20 h.	»	370	0,0	1	+ 22 h.	»	390	0,0	1	+ 20 h.	
»	390	0,0	1	+ 18 h.	»	350	0,0	1	+ 18 h.	»	380	0,0	1	+ 22 h.	
VACCINAZIONE DELLE CAVIE CON CULTURA DI B. SEPTICUS. FORMULATE AL 5 ^o /100.															
18-3	350	2	1	+ 72 h.	18-3	360	2	1	vive	18-3	360	2	1	vive	
»	380	2	1	+ 72 h.	»	400	2	1	vive	»	390	2	1	vive	
»	340	2	1	vive	»	350	2	1	+ 72 h.	»	370	2	1	+ 50 h.	
»	400	2	1	vive	»	390	2	1	+ 50 h.	»	410	2	1	vive	
»	360	2	1	vive	»	360	2	1	vive	»	350	2	1	+ 66 h.	
»	410	2	1	vive	»	400	2	1	vive	»	380	2	1	vive	
»	390	2	1	vive	»	410	2	1	vive	»	400	2	1	vive	
»	410	1	1	vive	»	390	1	1	+ 72 h.	»	380	1	1	vive	
»	380	1	1	+ 72 h.	»	370	1	1	vive	»	360	1	1	+ 120 h.	
»	360	0,0	1	+ 36 h.	»	370	0,0	1	+ 20 h.	»	370	0,0	1	+ 24 h.	
»	390	0,0	1	+ 24 h.	»	380	0,0	1	+ 22 h.	»	400	0,0	1	+ 30 h.	
VACCINAZIONE DELLE CAVIE CON CULTURE DI B. CHAUVOEI FORMULATE AL 5 ^o /100.															
18-3	350	2	1	+ 72 h.	18-3	380	2	1	vive	18-3	360	2	1	vive	
»	380	2	1	+ 72 h.	»	360	2	1	+ 48 h.	»	390	2	1	vive	
»	340	2	1	vive	»	340	2	1	vive	»	370	2	1	+ 50 h.	
»	400	2	1	vive	»	400	2	1	vive	»	410	2	1	vive	
»	360	2	1	vive	»	410	2	1	vive	»	350	2	1	+ 66 h.	
»	410	2	1	vive	»	380	2	1	vive	»	380	2	1	vive	
»	390	2	1	vive	»	400	2	1	vive	»	400	2	1	vive	
»	410	1	1	vive	»	370	1	1	+ 70 h.	»	380	1	1	vive	
»	380	1	1	+ 72 h.	»	360	1	1	vive	»	360	1	1	+ 120 h.	
»	360	0,0	1	+ 36 h.	»	380	0,0	1	+ 20 h.	»	370	0,0	1	+ 24 h.	
»	390	0,0	1	+ 24 h.	»	350	0,0	1	+ 20 h.	»	400	0,0	1	+ 30 h.	

TABELLA III.

VACCINAZIONE DELLE CAVIE CON VACCINO DEL COMMERCIO.

Vaccino contro le gangrene gassose				Vaccino contro le gangrene gassose				Vaccino vivo contro il C. sintomatico						
Data	Peso in gr. delle cavia	Quantità inoculata sottocute in cc.	D. m.m. di B. Chavoei inoc. dopo 15 giorni dalla vaccinaz.	Esito al 15° giorno	Data	Peso in gr. delle cavia	Quantità inoculata sottocute in cc.	D. m.m. di B. Septicus inoc. dopo 15 giorni dalla vaccinaz.	Esito al 15° giorno	Data	Peso in gr. delle cavia	Quantità inoculata sottocute in cc.	D. m.m. di B. Chavoei inoc. dopo 15 giorni dalla vaccinaz.	Esito al 15° giorno
9-3	360	2	1	+ 72 h.	17-3	340	2	1	+ 28 h.	18-3	400	0,5	1	vive
»	400	2	1	vive	»	410	2	1	vive	»	350	0,5	1	+ 72 h.
»	380	2	1	vive	»	380	2	1	vive	»	390	0,5	1	vive
»	350	2	1	vive	»	360	2	1	+ 60 h.	»	360	0,5	1	vive
»	390	1	1	vive	»	350	1	1	vive	»	380	0,5	1	+ 54 h.
»	390	0,0	1	+ 24 h.	»	390	0,0	1	+ 24 h.	»	360	1,0	1	vive
					»	370	0,0	1	+ 20 h.	»	400	1,0	1	vive
										»	360	1,0	1	vive
										»	350	1,0	1	vive
										»	380	0,0	1	+ 20 h.
										»	390	0,0	1	+ 22 h.

vaccino del commercio, inoculando però metà delle vaccinate contro le gangrene gassose col *B. Septicus*, e l'altra metà col *B. Chauvoei*.

Come risulta dalle tabelle II-III e IV, le cavie vaccinate contro il *B. Chauvoei* e il *B. Septicus* coi vaccini preparati nel modo sopra detto, e quelle vaccinate col vaccino del commercio, hanno presentato una buona resistenza all'infezione sperimentale con una dose m.m. dei rispettivi germi. Tutte le cavie controllo sono morte in brevissimo tempo. Il numero delle cavie sopravvissute è pressapoco uguale per ogni gruppo vaccinato, sia coi vaccini da me preparati che con quelli provenienti dal commercio. Quasi tutte le cavie hanno presentato al punto d'innesto un esteso edema che lentamente si è riassorbito.

Sarebbe opportuno che tali ricerche d'immunizzazione fossero estese ai grossi animali poichè se in questi si ottenessero risultati soddisfacenti si potrebbe convenientemente usare brodi vitaminati nella preparazione dei vaccini contro gli anaerobi.

Dai dati sopra riportati si può concludere:

1) Il brodo di estratto di carne con vitamina C e con succhi di arancia e di limone è un mezzo adatto per lo sviluppo dei germi anaerobi in presenza di aria;

2) L'aggiunta di glucosio al 2 % nei terreni vitaminati non migliora in genere il mezzo colturale anzi per il *Septicus* tale aggiunta inibisce quasi completamente lo sviluppo;

3) La virulenza dei ceppi *Septicus* e *Chauvoei* sviluppati sui terreni sopra detti non si attenua;

4) L'immunizzazione delle cavie con le predette colture integrali formolate è pressapoco uguale a quella che si ottiene con vaccini vivi e con vaccini formolati ottenuti dallo sviluppo delle colture in brodo di fegato.

RIASSUNTO

Colture in aerobiosi di *B. Tetani*, *Oedematiens*, *Septicus*, *Chauvoei*, *Botulinus A e B*, *Parabotulinus americano* in brodo estratto di carne con vitamina C sviluppano in modo rigoglioso. In tale mezzo colturale il *B. Septicus* e il *B. Chauvoei* conservano invariata la loro virulenza e i vaccini preparati con tali germi hanno un normale potere immunizzante.

SUMMARIUM

Culturae in aerobiosi Bacillorum Tetani, Oedematici, Septici, Chauvoei, Botulini A et B, Parabotulini americani in iure carnis extracto, addita vitamina C, mirum in modum augescunt atque explicantur. Eiusmodi in medio culturali B. Septicus et B. Chauvoei virulentiam suam servant integram, vaccinaque his germinibus confecta immunitatem probe praestant.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WEINBERG, « Le Microbes Anaérobies », Masson, Paris, 1937.
 - (²) EHRISMAN, « Askorbinsäurehaltige Nährmedien für anaerobe Bacillen », Ztschr. f. Hfg. Inf. fektionschr., 118, 544 (1936).
 - (³) GORRIERI, « Sulla coltura degli anaerobi in mezzi liquidi contenenti acido ascorbico », Diagn. e Tecn. di Lab., 7, 271 (1936).
 - (⁴) CIANCI e PALMIERI, « Il succo d'arancia per la coltura aerobica di germi anaerobi », Boll. Soc. Ital. di Biologia Sper., 12, 110 (1937).
 - (⁵) KLIGER e GUGGENHEIM, « Influence of ascorbic acid on the growth and toxin of Cl Tetani and the detoxication of tetanus toxin », citato nel Bull. Inst. Pasteur, 37, 904 (1939).
 - (⁶) FAUREST, « Sur un procédé pratique pour réaliser l'anaerobiose des milieux de culture », La Presse Médical, 47, 1662 (1939)
 - (⁷) PATOCKA e JLAUSKY, « L'acido ascorbique et ls anaérobies », Ann. Pasteur, 62, 296 (1939).
 - (⁸) GORRIERI, « Sull'impiego di alcuni prodotti del regno vegetale per la coltura degli anaerobi in terreni liquidi e in presenza di aria », Diag. e Tecn. di Lab., 8, 89 (1937).
 - (⁹) CIANCI e PALMIERI, « Vitamina C e succo d'arancia per la coltura dei germi anaerobi », Boll. Soc. Ital. di Biologia Sper., 12, 757 (1937).
-
-
-