

4. R. NEGRI e L. von LORCH. — Tipizzazione delle brucelle mediante il dietilditiocarbamato di sodio (DEDTC) secondo una nuova metodica.

**Riassunto.** — Gli AA. hanno cercato di tipizzare sessantuno ceppi di brucella (ventiquattro stipiti di *Brucella melitensis*, ventitrè stipiti di *Brucella abortus*, tredici stipiti di *Brucella suis* e uno stipite di *Brucella bronchiseptica*) mediante un nuovo metodo al DEDTC, modificando completamente quello di Renoux.

Per la nuova prova è stato impiegato il terreno carota-fegato, mentre le piastre di agar-germi sono state preparate con l'usuale tecnica standard, usata per la titolazione biologica degli antibiotici, impiegando dei microcilindri per la diffusione della soluzione all'1% di DEDTC.

Con tale tecnica è stato possibile tipizzare cinquantasei stipiti, sui sessantuno presi in esame, e la reazione si è dimostrata di facile, rapida applicazione (lettura in 48 ore) e di semplice e chiara interpretazione.

Contemporaneamente, come ricerche collaterali per la tipizzazione, sono state eseguite alcune delle prove classiche (produzione di  $H_2S$ ; sviluppo sul terreno di Petraghani; prova di Huddleson). Solo la prova di Huddleson e quella sul terreno di Petraghani sono state concordi, nella maggioranza dei casi, con la prova al DEDTC, eseguita secondo la tecnica degli AA.

Le letture delle prove al DEDTC si possono schematizzare come segue:

*Brucella melitensis*. — Zona di inibizione; anello bianco; fascia di inibizione; sottile anello bianco latte; fascia di inibizione. Diametro totale della reazione mm 60-64 circa.

*Brucella abortus*. — Zona di inibizione; anello bianco sfumato; anello brunastro di inibizione; fascia bianco latte; fascia di inibizione. Diametro totale della reazione mm 50-52 circa.

*Brucella suis*. — Zona di inibizione; anello bianco; zona di inibizione. Diametro totale della reazione mm 34-35 circa.

*Brucella bronchiseptica*. — Zona di inibizione; due anelli bianchi sfumati, separati da una sottile zona di inibizione; zona di inibizione; largo anello bianco sfumato alla periferia. Diametro totale della reazione, escluso l'anello bianco, mm 32 circa.

**Résumé.** — Les auteurs ont tenté de typifier soixante et une souches de brucella (24 stocks de *Brucella melitensis*, 23 de *Brucella abortus*, 13 de *Brucella suis* et 1 de *Brucella bronchiseptica*) en se servant d'une nouvelle méthode au DEDTC, en modifiant complètement celle de Renoux.

Pour ce nouvel essai on s'est servi du terrain carote-foie; tandis que les plaques de agar furent préparés selon la technique ordinaire standard que l'on emploie pour titrer biologiquement les antibiotiques, en employant des microcylindres pour la diffusion de la solution au 1% de DEDTC.

Par cette technique on a pu typifier cinquante six souches, sur les 61 examinées et la réaction est facile, d'application rapide (lecture dans les 48 heures) et d'une interprétation simple et claire.

On a conduit en même temps des recherches collatérales en faisant un certain nombre d'essais classiques (production de  $H_2S$ ; développement sur le terrain de Petraghani; essai de Huddleson). Seulement l'essai de Huddleson et celui fait sur le terrain de Petraghani ont été, dans la plupart des cas, en accord avec l'essai au DEDTC fait selon la technique des auteurs.

La lecture des essais au DEDTC peuvent se résumer comme suit:

*Brucella melitensis* — Zone d'inhibition; anneau blanc; bande d'inhibition; léger anneau blanc comme le lait; bandeau d'inhibition; diamètre total de la réaction env. 60-64 mm.

*Brucella abortus* — Zone d'inhibition; anneau blanc estompé; anneau brunâtre d'inhibition; bandeau blanc de lait; bandeau d'inhibition. Diamètre total de la réaction env. 50-52 mm.

*Brucella suis* — Zone d'inhibition; anneau blanc; zone d'inhibition. Diamètre total de la réaction env. 34-35 mm.

*Brucella bronchiseptica* — Zone d'inhibition; deux anneaux blancs estompés, séparés par une mince zone d'inhibition; zone d'inhibition; large anneau blanc estompé à la périphérie. Diamètre total de la réaction, anneau blanc exclu, env. 32 mm.

**Summary.** — The writers attempted to type 61 strains of brucella (24 stocks of *Brucella melitensis*, 23 of *Brucella abortus*, 13 of *Brucella suis* and one of *Brucella bronchiseptica*) by means of a new DEDTC method, entirely modifyng the Renoux method.

For this new trial, carrot-liver medium was used, while the agar plates were prepared by the ordinary standard technique used for biological titration of antibiotics, utilizing micro-cylinders for diffusing 1% of DEDTC through the solution.

With this technique it was possible to type 56 stocks out of the 61 tested, and the reaction was shown to be easily and rapidly applied (readings in 48 hours) and simple and clear to interpret.

At the same time, there were carried out for comparative purposes several of the classical tests ( $H_2S$  production; development on Petragnani medium; Huddleson test). Only the Huddleson test and the test on Petragnani medium agreed, in most cases, with the DEDTC test carried out according to the present writers' technique.

The DEDTC test readings may be outlined as follows:

*Brucella melitensis* — Zone of inhibition; white ring; band of inhibition; fine milk-white ring; band of inhibition. Total diameter of reaction, 60-64 mm. approx.

*Brucella abortus* — Zone of inhibition; shaded white ring; brownish inhibition ring; milk-white band; band of inhibition. Total diameter of reaction, 50-52 mm. approx.

*Brucella suis* — Zone of inhibition; white ring; zone of inhibition. Total diameter of reaction, 34-35 mm. approx.

*Brucella bronchiseptica* — Zone of inhibition; two shaded white rings, separated by a fine zone inhibition; zone of inhibition; wide shaded white ring at the periphery. Total diameter of the reaction, excluding the white ring, 32 mm. approx.

**Zusammenfassung.** — Die Verfasser haben versucht, die Typenbestimmung von 61 *Brucella*-Stämmen (24 Stämme der *Brucella melitensis*, 23 Stämme der *Brucella abortus*, 13 Stämme der *Brucella suis* und 1 Stamm der *Brucella bronchiseptica*) mittels eines neuen DEDTC-Verfahrens unter völliger Aenderung des Renoux' schen Verfahrens vorzunehmen.

Für den neuen Versuch wurde ein Nährboden aus Karotten und Leber verwendet, während die Agarkeimplatten nach dem üblichen Standardverfahren hergestellt wurden, das auch für die biologische Titrierung der Antibiotica angewendet wird, wobei Mikrozyylinder für die Verteilung der 1% igen DEDTC-Lösung benutzt werden.

Auf diese Weise war es möglich, die Typenbestimmung bei 56 von den 61 untersuchten Stämmen vorzunehmen, wobei die Reaktion schnell und leicht durchzuführen (Ablesung nach 48 Stunden) und einfach und eindeutig auszulegen war.

Als Nebenversuche wurden gleichzeitig einige klassische Proben durchgeführt (Herstellung von  $H_2S$ , Entwicklung Versuch sowie der Versuch mit dem Petragnani-Nährboden ergaben in der Mehrzahl der Fälle

eine Uebereinstimmung mit der nach dem Verfahren der Verfasser durchgeführten DEDTC-Probe.

Die Ablesung der DEDTC-Proben kann wie folgt schematisiert werden:

*Brucella melitensis* — Inhibitionszone, weisser Ring, Inhibitionsgürtel, dünner milchweisser Ring, Inhibitionsgürtel, Gesamtdurchmesser der Reaktion etwa 60-64 mm.

*Brucella abortus* — Inhibitionszone, verschwommener weisser Ring, bräunlicher Inhibitionsring, milchweisser Gürtel, Inhibitionsgürtel, Gesamtdurchmesser der Reaktion etwa 50-52 mm.

*Brucella suis* — Inhibitionszone, weisser Ring, Inhibitionszone, Gesamtdurchmesser der Reaktion etwa 34-35 mm.

*Brucella bronchiseptica* — Inhibitionszone; zwei verschwommene wiesse, von einer schmalen Inhibitionszone getrennte Ringe; Inhibitionszone; breiter weisser, aussen verschwommener Ring; Gesamtdurchmesser der Reaktion ausschliesslich des weissen Rings etwa 32 mm.

---

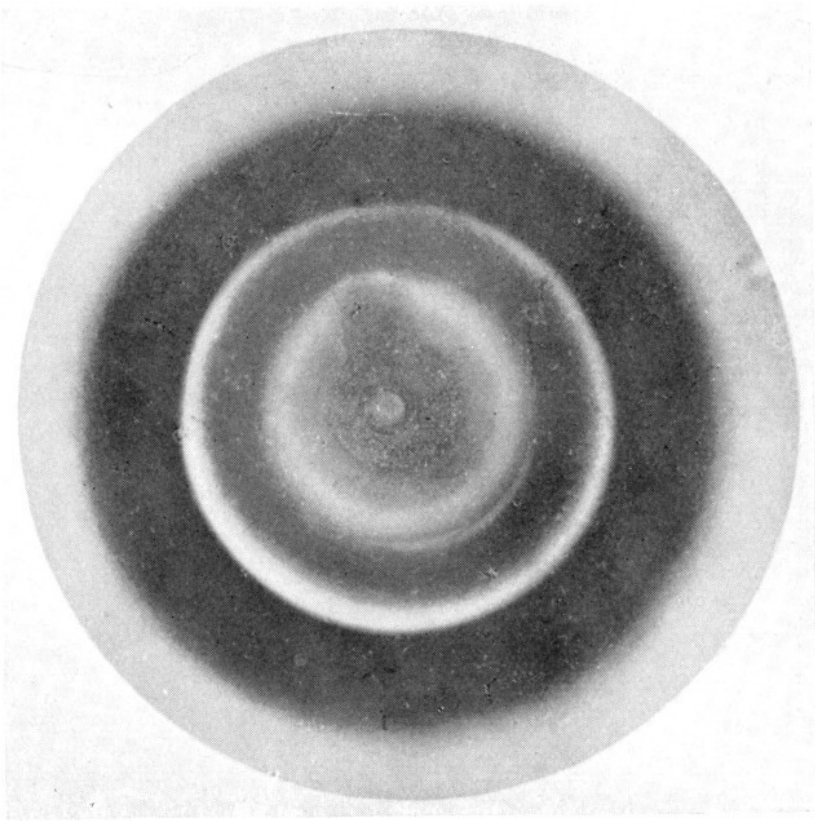
Il metodo comunicato da RENOUX <sup>(1)</sup> sulla differenziazione delle varie specie di brucella per mezzo del DEDTC, ha senza dubbio portato un contributo notevole in questo campo. Detta sostanza, fatta diffondere su una piastra di agar-germi, provoca delle reazioni tipiche per ogni stipite di brucella.

La tecnica dell'autore francese è la seguente:

In piastre di Petri, del diametro di cm 7, si versa dell'« Albimi-agar » per uno strato di mm 2 di spessore; solidificato l'agar, le piastre vengono asciugate per 3 ore in termostato a 37°C.; si prepara una sospensione batterica aggiungendo circa cm<sup>3</sup> 4 di soluzione fisiologica ad una coltura, dell'età di 36-48 ore, dello stipite in esame, coltivato su « Albimi-agar » o su agar-fegato (la densità della sospensione è circa quella del campione n. 2 dell'opacimetro di MAC FARLAND). Detta sospensione viene distribuita su tutta la superficie di una piastra di « Albimi-agar » e il liquido in eccesso viene aspirato con pipetta Pasteur; le piastre, aperte, vengono poste in termostato a 37°C. per una ora, onde favorire l'assorbimento della sospensione batterica da parte dell'agar. Si prepara estemporaneamente una soluzione all'1% di DEDTC in acqua distillata sterile; dei dischetti di carta da filtro, sterili, del diametro di mm 11, vengono imbevuti della soluzione di DEDTC e posti al centro delle piastre che si incubano a 37°C. per 3 giorni; indi si esegue la lettura su fondo scuro.

L'azione del DEDTC si esprime in modo diverso nei confronti delle tre specie di brucella: l'alternarsi di zone di inibizione, di anelli di marcato sviluppo batterico e di qualche reazione cromatica permette di differenziare gli stipiti in esame.

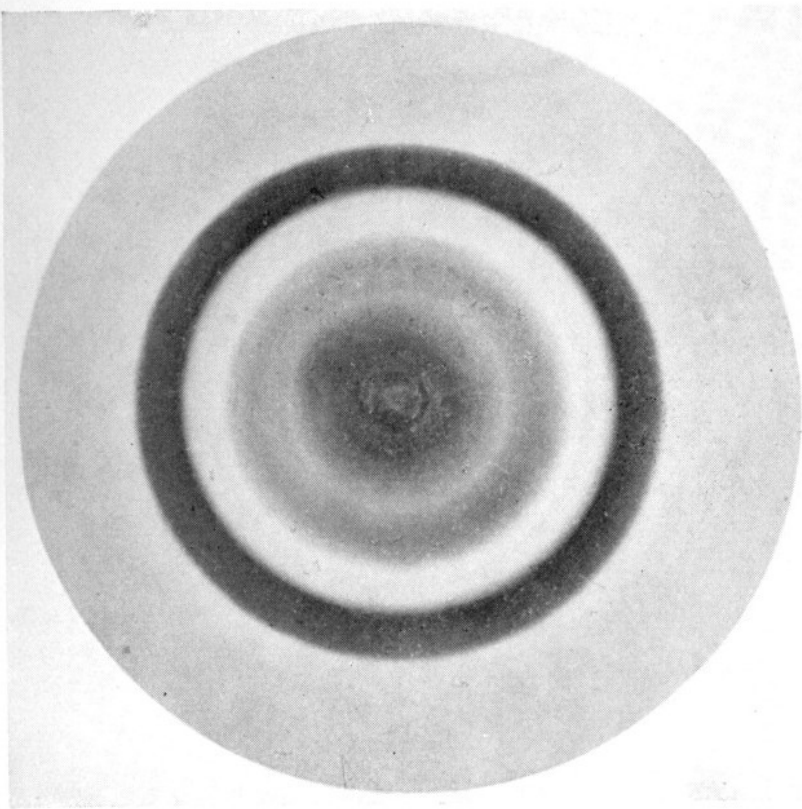
Recentemente ORTENZI <sup>(2)</sup>, controllando il metodo di RENOUX, ha confermato la possibilità di differenziare, in modo ben definito, le tre specie di brucella impiegando il DEDTC.



Fot. N. 1. - *BRUCELLA MELITENSIS*.

*Prova al DEDTC:* fotografia di piastra con la tipica reazione della *Brucella melitensis* (è stato tolto il microcilindro, per evidenziare meglio la reazione).

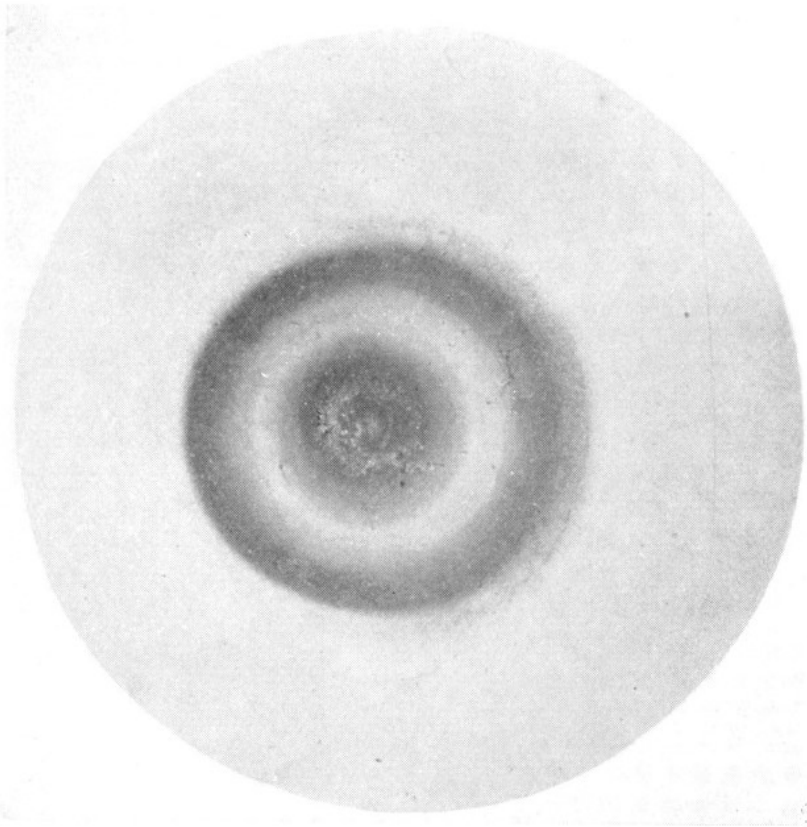
*Lettura alla 48<sup>a</sup> ora, eseguita dal centro della piastra:* zona di inibizione del diametro di circa mm 18-20; anello bianco di circa mm 3-4, sfumato all'interno, circondato da un anello bruno all'esterno; fascia di inibizione della larghezza di circa mm 5-6; sottile anello bianco-latte ben evidente di circa mm 2-3; fascia di inibizione della larghezza di circa mm 8-10; diametro totale della reazione mm 60-64 circa.



Fot. N. 2 - *BRUCELLA ABORTUS*.

*Prova al DEDTC:* fotografia di piastra con la tipica reazione della *Brucella abortus* (è stato tolto il microcilindro, per evidenziare meglio la reazione).

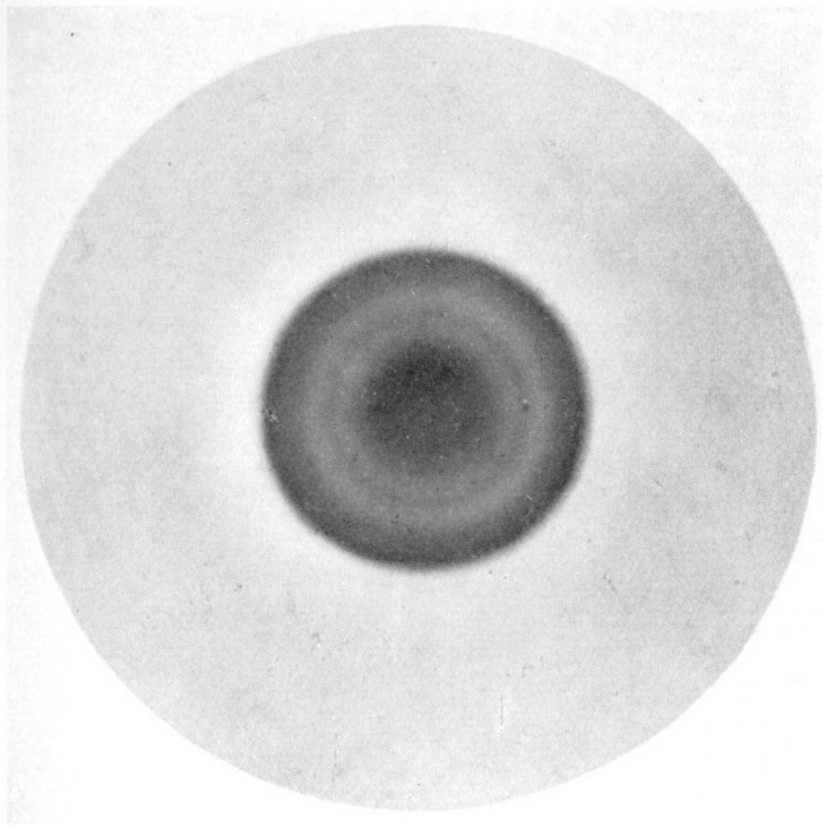
*Lettura alla 48<sup>a</sup> ora, eseguita dal centro della piastra:* zona di inibizione del diametro di circa mm 16; anello bianco sfumato, poco evidente, di circa mm 3-4; anello bruno di inibizione di circa mm 4-5; fascia bianco-latte, ben evidente, di circa mm 5-6; fascia di inibizione di circa mm 5-6; diametro totale della reazione mm 50-52 circa.



Fot. N. 3. - *BRUCELLA SUIS*.

*Prova al DEDTC:* fotografia di piastra con la tipica reazione della *Brucella suis* (è stato tolto il microcilindro, per evidenziare meglio la reazione).

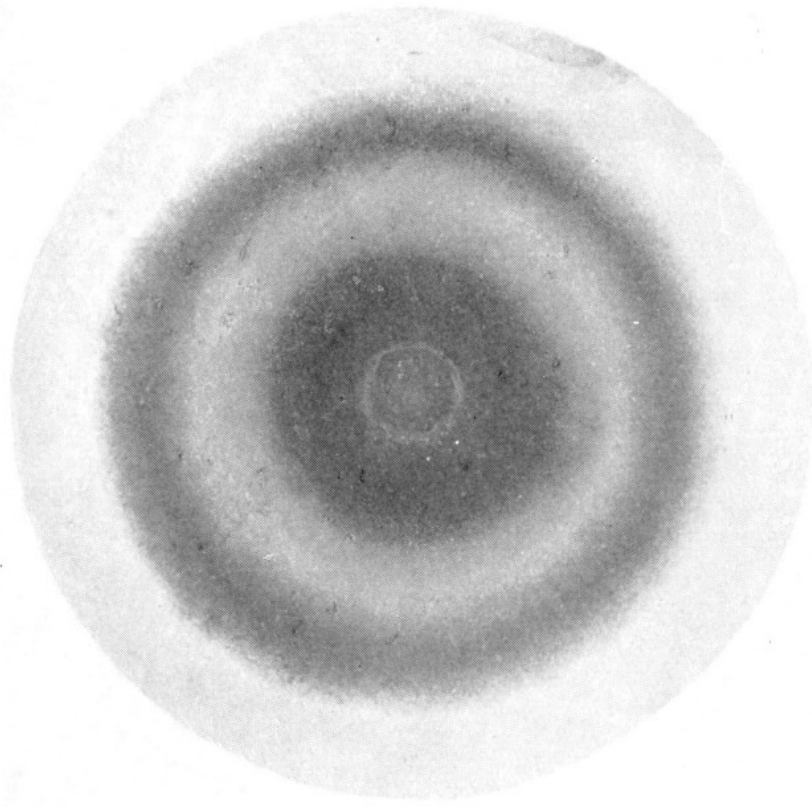
*Lettura alla 48<sup>a</sup> ora, eseguita dal centro della piastra:* zona di inibizione del diametro di circa mm 18; anello bianco di circa mm 4-5; zona di inibizione di circa mm 4; diametro totale della reazione mm 34-35 circa.



Fot. N. 4. - *BRUCELLA BRONCHISEPTICA*.

*Prova al DEDTC:* fotografia di piastra con la tipica reazione della *Brucella bronchiseptica* (è stato tolto il microcilindro, per evidenziare meglio la reazione).

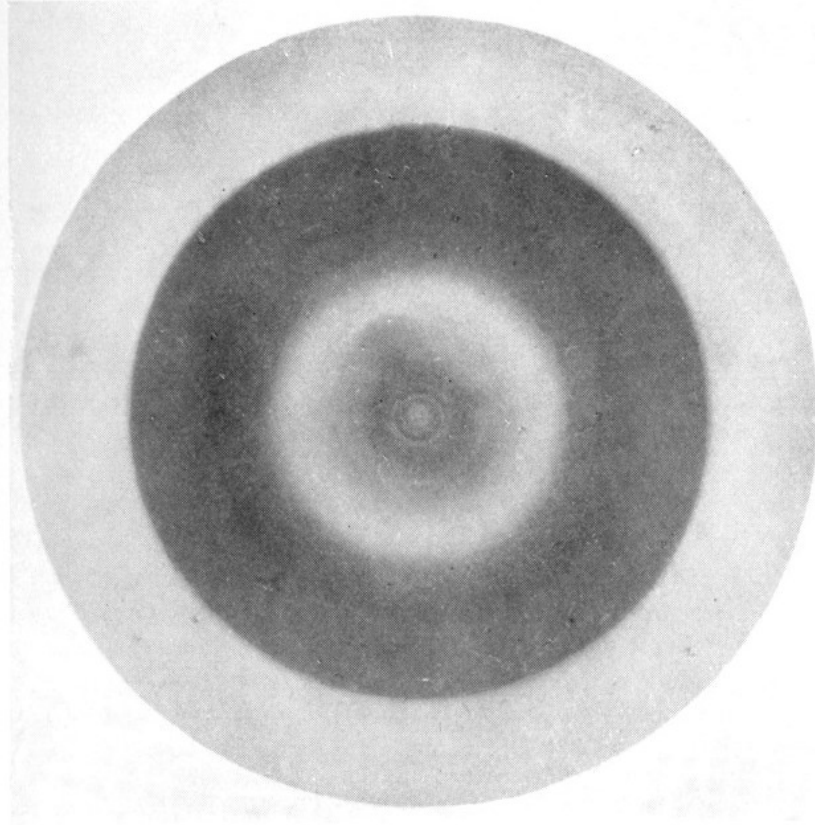
*Lettura alla 48<sup>a</sup> ora, eseguita dal centro della piastra:* zona di inibizione del diametro di circa mm 9-10; due anelli bianchi sfumati (di circa mm 1-2 ciascuno), separati da una sottile zona di inibizione di circa mm 1; zona di inibizione di circa mm 3; largo anello bianco, sfumato alla periferia, di circa mm 5-6; diametro totale della reazione (escluso l'anello bianco) mm 32 circa.



Fot. N. 5.

*Prova al DEDTC:* fotografia di piastra con reazione atipica di uno stipite classificato in collezione come *Brucella melitensis* (è stato tolto il microcilindro per evidenziare meglio la reazione).

*Lettura alla 48<sup>a</sup> ora, eseguita dal centro della piastra:* zona di inibizione del diametro di circa mm 30 (il sottile anello rilevabile al centro di detta zona, è formato da un deposito di cristalli di DEDTC); fascia bianca lievemente sfumata all'interno di circa mm 9; anello di inibizione sfumato all'esterno di circa mm 6; diametro totale della reazione mm 60 circa.



Fot. N. 6.

*Prova del DEDTC:* fotografia di piastra con reazione atipica di uno stipite classificato in collezione come *Brucella melitensis* (è stato tolto il microcilindro per evidenziare meglio la reazione).

*Lettura alla 48<sup>a</sup> ora, eseguita dal centro della piastra:* zona di inibizione del diametro di circa mm 10-12; anello bianco, di circa mm 5-6, sfumato all'interno; larga zona di inibizione di circa mm 14-15; diametro totale della reazione mm 55 circa.

Poichè la tipizzazione delle brucelle sta attualmente attraversando un periodo critico per le sempre più numerose segnalazioni di stipiti con caratteri intermedi tra le varie specie, ci è parso interessante confrontare il nuovo metodo al DEDTC con i più importanti metodi classici, al fine di procedere alla revisione degli stipiti della collezione dell'Istituto Superiore di Sanità.

Le ricerche preliminari, eseguite impiegando la tecnica di RENOUX, non ci hanno completamente soddisfatti come non ci hanno convinto, sulla possibilità di differenziazione, le fotografie riportate nel lavoro originale dell'autore francese, per cui abbiamo creduto opportuno cambiare completamente metodica

#### MATERIALI E TECNICA.

A) *Ceppi batterici*: Abbiamo proceduto alla revisione di sessantuno ceppi di brucelle, comprendenti ventiquattro stipiti di *Brucella melitensis*, ventitrè stipiti di *Brucella abortus*, tredici stipiti di *Brucella suis* e uno stipite di *Brucella bronchiseptica*.

B) *Terreno di coltura*: Abbiamo usato il terreno carota-fegato, solido e liquido, da noi realizzato <sup>(3)</sup> e usualmente da noi impiegato per la coltura delle brucelle. La rapidità e l'abbondanza di sviluppo (12 ore per la *Brucella bronchiseptica*; 24 ore per la *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis*), la costanza delle caratteristiche di specie e di fase, ci hanno indotto a impiegare detto terreno per le ricerche che sono oggetto di questa nota.

Il terreno carota-fegato è stato anche usato per tutte le prove collaterali di tipizzazione, ad eccezione naturalmente della prova eseguita sul terreno di PETRAGNANI.

Per la diffusione nell'agar della soluzione di DEDTC all'1%, preparata estemporaneamente, abbiamo usato microcilindri di porcellana del diametro esterno di mm 4,5, diametro interno mm 3,5, altezza mm 5. Gli stessi microcilindri che vengono da noi usati per la titolazione biologica degli antibiotici.

Secondo la nostra metodica, relativa alla prova al DEDTC, per ogni ceppo di brucella da tipizzare vengono preparate delle piastre di Petri, del diametro di cm 12, e si opera come segue:

In ognuna di dette capsule si versano cm<sup>3</sup> 21 di agar comune che si lascia solidificare (agar di fondo). Con la patina-coltura di 24 h del ceppo in esame si allestisce una sospensione batterica in soluzione fisio-

logica avente circa  $1,5 \times 10^8$  cellule/cm<sup>3</sup> - cm<sup>3</sup> 6 di agar carota-fegato, sciolto e raffreddato a 45°C.-50°C., aggiunti di cm<sup>3</sup> 0,25 della sopradde-tta sospensione batterica, si versano nelle piastre, precedentemente prepa-rate, in modo da stendere una sottile pellicola di agar-germi sull'agar di fondo. Le piastre si pongono per circa 15' in ghiacciaia a solidificare, indi sono pronte per l'uso.

La soluzione acquosa di DEDTC viene preparata estemporaneamente; le concentrazioni prese in considerazione sono: 0,5%; 1%; 1,5%. Le stesse soluzioni sono state provate anche dopo 8 giorni dal momento della preparazione.

Dette soluzioni di DEDTC vengono versate in vetrino da orologio; i microcilindri, prelevati con pinza, si riempiono per capillarità adagiandoli sulla superficie della soluzione; indi vengono deposti al centro della piastra sullo strato di agar-germi. Le piastre vengono poste in termostato a 37,5°C. e si eseguono le letture dopo 24, 48, 72 ore. Vengono anche poste in termostato piastre di controllo, preparate con la stessa tecnica di cui sopra, ma non seminate.

Già alla 24<sup>a</sup> ora si nota, sulle piastre seminate, uno sviluppo batterico che si presenta sotto forma di anelli tenui bianchi, intercalati da zone di mancato sviluppo (inibizione), attorno al microcilindro.

Si notano altresì alterazioni cromatiche del terreno di coltura che si presentano esse pure sotto forma di anelli brunastri o bruno-verdastri, intercalati tra zone di inibizione e anelli bianchi di sviluppo.

La lettura delle piastre alla 48<sup>a</sup> ora diventa più semplice, chiara e ben definita (Vedi fotografie n. 1, 2, 3, 4). Abbiamo potuto subito rilevare che gli anelli brunastri o bruno-verdastri sparivano con l'aumentato sviluppo batterico, evidenziando maggiormente gli anelli bianchi e le zone di inibizione.

La lettura eseguita alla 72<sup>a</sup> ora si dimostra meno chiara per l'abbondante sviluppo batterico e meno evidenti risultano le caratteristiche del fenomeno osservato alla 48<sup>a</sup> ora.

Le piastre di controllo (non seminate) fin dalla 24<sup>a</sup> ora presentano una serie di anelli colorati (reazione a coccarda) attorno al microcilindro; tale reazione cromatica perdura anche alla 72<sup>a</sup> ora.

Per quanto si riferisce alla concentrazione del DEDTC siamo d'accordo con RENOUX circa l'opportunità di impiegare soluzioni estemporanee all'1%; quelle al 0,5% e 1,5% determinano una più difficile lettura: nelle prime gli anelli si presentano più piccoli; nelle seconde, invece, molto più grandi e sfumati.

Le soluzioni dell'età di 8 giorni esprimono il fenomeno in maniera incostante e non caratteristica.

Contemporaneamente, come ricerche collaterali ai fini della tipizzazione, abbiamo eseguito la prova della produzione di  $H_2S$ , la prova di Huddleson e dello sviluppo sul terreno di Petraghani.

Non abbiamo ritenuto utile l'impiego della ricerca dell'attività ureasica, dato che il suo comportamento si dimostra, come è noto, assai irregolare specie con gli stipiti di *Brucella melitensis*.

Inoltre, la mancanza di sieri sicuramente monospecifici, ci ha impedito di ricorrere all'analisi sierologica.

Le prove collaterali sono riportate nella tabella allegata, insieme ai risultati ottenuti con la reazione al DEDTC, da noi eseguita secondo la nuova metodica sopra esposta.

#### DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.

Dalla tabella allegata si può rilevare:

*Prova al DEDTC.* - I ventiquattro stipiti contrassegnati in collezione come *Brucella melitensis* hanno dato risultati che definiamo tipici per la costanza dei caratteri, anche dopo ripetute prove (Vedi fotografia n. 1 e sua descrizione), in diciannove casi. I rimanenti cinque ceppi, contrassegnati con il n. 2, 17, 18, 22, 23, hanno presentato una reazione anomala, non riferibile, neanche per approssimazione, alle altre specie di brucella (Vedi fotografie n. 5 e 6 e loro descrizione). La prova al DEDTC per queste forme atipiche è stata ripetuta più volte, ma i caratteri anomali della reazione si sono sempre mantenuti costanti.

I ventitrè stipiti contrassegnati in collezione come *Brucella abortus* hanno sempre dato reazione da noi definita tipica per la costanza dei caratteri, anche dopo ripetute prove (Vedi fotografia n. 2 e sua descrizione).

I tredici stipiti contrassegnati in collezione come *Brucella suis* hanno sempre dato reazione da noi definita tipica per la costanza dei caratteri, anche dopo ripetute prove (Vedi fotografia n. 3 e sua descrizione).

Per quanto si riferisce alla *Brucella bronchiseptica*, unico ceppo di collezione, questa ha dato costantemente la reazione fissata nella fotografia n. 4 e nella sua descrizione.

Da quanto sopra descritto si può concludere che con la nostra metodica è possibile ottenere per le singole specie di brucella delle reazioni a caratteri costanti e ben definiti, sia per il numero delle zone di inibizione, degli anelli bianchi di sviluppo batterico, sia per il diametro totale della reazione.

| N. | STIPITI BATTERICI | FASE | PROVA<br>al<br>DEDTC | PRODUZIONE di H <sub>2</sub> S<br>ore |    |    |    | PROVA di<br>Huddleson |                     | PETRAGNANI |
|----|-------------------|------|----------------------|---------------------------------------|----|----|----|-----------------------|---------------------|------------|
|    |                   |      |                      | 24                                    | 48 | 72 | 96 | Tionina<br>1:25.000   | Fucsina<br>1:25.000 |            |
| 1  | SFr 2             | S    | M<br>atipica         | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 2  | SFr 3             | S    |                      | —                                     | +  | +  | +  | +                     | +                   | + g        |
| 3  | SFr 4             | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 4  | SFr 5             | R    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 5  | SFr 6             | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 6  | sieroterapico     | R    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 7  | Ascoli            | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + s        |
| 8  | Termini 2         | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 9  | Termini 6         | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 10 | Gangi 1           | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 11 | Termini 4         | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 12 | Marineo           | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 13 | Pecora Partanna   | S    | M                    | +                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 14 | Austria Schuller  | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 15 | Austria Pfera     | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 16 | SFr 40            | S    | M                    | —                                     | +  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 17 | Allemandi         | S    | atipica              | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 18 | Bonan             | S    | atipica              | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 19 | SR 5              | R    |                      | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 20 | Istisan           | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + G        |
| 21 | Buch 19           | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 22 | SFr 3             | S    | M                    | —                                     | +  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 23 | SFr 3             | R    | atipica              | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | —          |
| 24 | S                 | R    | atipica              | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | —          |
| 25 | MK 64             | S    | M                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | + vs       |
| 26 | SZR               | R    | A                    | +                                     | +  | —  | —  | +                     | +                   | —          |
| 27 | Bang              | S    | A                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | —          |
| 28 | KR 16             | S    | A                    | +                                     | +  | —  | —  | +                     | +                   | —          |
| 29 | Padera            | S    | A                    | +                                     | +  | —  | —  | +                     | +                   | —          |
| 30 | Bonetti           | S    | A                    | —                                     | —  | —  | —  | +                     | +                   | —          |

*Brucella melitensis*

*Brucella abortus*



Anche le reazioni tipiche della *Brucella suis* e *Brucella bronchiseptica*, pur avendo in comune alcuni caratteri, questi sono ben differenziabili per il caratteristico e grande anello bianco delimitante la reazione della *Brucella bronchiseptica* (Vedi fotografie n. 3 e 4 e loro descrizione).

*Prove complementari.* — Per quanto si riferisce alle prove classiche complementari da noi prese in esame, possiamo rilevare che la prova di produzione di  $H_2S$  è quella che ha presentato un andamento atipico per un grandissimo numero di ceppi.

La prova di sviluppo sul terreno di Petragnani ha invece risposto all'aspettativa, come la prova di Huddleson, nella maggioranza dei casi.

Raffrontando i risultati ottenuti con la nostra metodica al DEDTC, risultati da noi definiti tipici per la costanza delle caratteristiche di reazione, con quelli della prova di Huddleson e della coltura su terreno di Petragnani, possiamo senz'altro parlare di concordanza di risultati (Vedi tabella).

Per quanto si riferisce alle cinque reazioni atipiche al DEDTC, osservate con i ceppi classificati in collezione come *Brucella melitensis*, possiamo rilevare quanto segue:

Stipite n. 2 — reazioni atipiche: prova al DEDTC; produzione di  $H_2S$ ; coltura su terreno di Petragnani. La sola prova di Huddleson confermerebbe la specie di *Brucella melitensis*.

Stipite n. 17 — reazioni atipiche: prova al DEDTC. La prova di Huddleson, la produzione di  $H_2S$ , lo sviluppo su terreno di Petragnani confermerebbero la specie di *Brucella melitensis*.

Stipite n. 18 — reazioni atipiche: prova al DEDTC; sviluppo su terreno di Petragnani. La prova di Huddleson e la produzione di  $H_2S$  confermerebbero la specie di *Brucella melitensis*.

Stipite n. 22 — reazioni atipiche: prova al DEDTC; sviluppo sul terreno di Petragnani. La prova di Huddleson e la produzione di  $H_2S$  confermerebbero la specie di *Brucella melitensis*.

Stipite n. 23 — reazioni atipiche: prova al DEDTC; sviluppo sul terreno di Petragnani. La prova di Huddleson e la produzione di  $H_2S$  confermerebbero la specie di *Brucella melitensis*.

Solo le reazioni sierologiche, con sieri sicuramente monospecifici, potrebbero forse definire la specie.

Sta di fatto che il comportamento anomalo rilevato con la prova al DEDTC è stato anche evidenziato da qualche altra prova classica, in specie dalla prova di sviluppo sul terreno di Petraghiani, che ha mostrato un comportamento atipico solo in quei casi in cui anche la prova al DEDTC ha dimostrato atipia. In conclusione, con la metodica sopra descritta, è stato possibile tipizzare cinquantasei ceppi di brucella su i sessantuno presi in esame.

La reazione si è dimostrata di facile, rapida applicazione (lettura in 48 ore) e di semplice e chiara interpretazione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) RENOUX G. - Ann. Inst. Pasteur, 82: 556 (1932).
  - (<sup>2</sup>) ORTENZI R. - Arch. Vet. Italiano, 4: 443 (1933).
  - (<sup>3</sup>) VON LORCH L. e NEGRI R. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 18: (1933).
-