

22. Gianfranco TIECCO. — I carboidrati dell' antigene somatico estratto da vari ceppi di *Pseudomonas*.

Riassunto. — E' stata studiata la composizione in carboidrati dell'antigene somatico di varie specie di *Pseudomonas* estratto con la tecnica di Boivin. Dai risultati ottenuti è stato possibile suddividere le specie esaminate in tre gruppi a seconda dei monosaccaridi presenti nell'antigene.

Summary. — The carbohydrate composition of the somatic antigens of various species of *Pseudomonas*, extracted by Boivin's technique has been studied. It was possible to separate the species examined into three groups depending on the monosaccharides present in the antigen.

In questi ultimi anni, gli studi sulla composizione delle varie parti del corpo batterico hanno avuto un notevole impulso specie per quanto riguarda i germi gram negativi.

Alcuni ricercatori italiani (^{1, 2, 3, 4, 5}) hanno compiuto un accurato esame degli antigeni somatici di numerosi stipiti di *Salmonella* utilizzando, per l'estrazione, la tecnica di Boivin. Gli Autori sono giunti alla conclusione che i ceppi aventi fattori antigeni diversi presentano una composizione in idrati di carbonio ed aminozuccheri qualitativamente differente, mentre ai ceppi contenenti lo stesso fattore corrisponde una composizione chimica analoga. Per quanto riguarda le frazioni proteiche dell'antigene somatico, gli Autori notarono invece una analoga composizione indipendentemente dalla provenienza dell'antigene stesso.

EGAMI e coll. (⁶) hanno riferito che l'endotossina isolata da *Pseudomonas aeruginosa* è costituita da almeno tre frazioni: una proteica, una rappresentata dagli acidi nucleici e la terza glicidica; quest'ultima è formata da glucosio, ramnosio, ribosio e 2-deossiribosio. EAGON e DEBONDER (⁷) hanno invece orientato le loro indagini sul polioside isolato dalla capsula di 11 ceppi di *Pseudomonas fluorescens*; l'idrolisi di tale polioside non fornisce dati uniformi, infatti il glucosio (o galattosio) è presente in tutti i ceppi mentre gli altri zuccheri rivelati (mannosio, fucosio, rammosio, xilosio, glucosamina) non sono costantemente presenti.

Mi è sembrato interessante riprendere in esame l'argomento allo

scopo di mettere in evidenza eventuali differenze nella struttura antigene di varie specie di *Pseudomonas* tali da poter essere di ausilio nella identificazione dei germi appartenenti a questo genere.

MATERIALI E METODI

a) *Ceppi batterici*. — Sono stati utilizzati sei ceppi di *Pseudomonas* appartenenti a specie diverse e già precedentemente studiate ⁽⁸⁾ e precisamente: *Pseudomonas aeruginosa* NRRL B26, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 949, *Pseudomonas iodinum* ATCC 9397, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973, *Pseudomonas ovalis* ATCC 950, *Pseudomonas mildenbergii* ATCC 795.

b) *Isolamento dell'antigene somatico*. — L'antigene somatico è stato estratto dai corpi batterici per mezzo dell'acido tricloroacetico secondo la tecnica di Boivin.

Allo scopo di ottenere grandi quantità di corpi batterici, le colture sono state allestite in fermentatori in acciaio inossidabile da impianto pilota ⁽⁹⁾ della capacità di 10 litri, utilizzando come terreno di crescita il brodo sorbitolo il quale consente uno sviluppo molto rigoglioso conservando inalterato il pH. L'ossigenazione del terreno è stata garantita dal movimento vorticoso prodotto da un'elica ad 8 pale, del diametro di 90 mm. che gira a 750 rpm. Altre condizioni oltre alla temperatura di sviluppo di 30°C, sono state una atmosfera di pressione interna ed una uscita d'aria di 2 o 3 litri al minuto.

Colture di 24 h di età, ottenute nelle condizioni su esposte, sono state centrifugate ed i batteri raccolti ripetutamente lavati in soluzione di Ringer fino a reazione di Molich negativa. Le cellule batteriche ottenute sono state quindi sospese in soluzione fisiologica sterile fredda, in ragione di 200 mg/cm³, ed infine addizionate ad un ugual volume di ac. tricloroacetico al 10%.

Dopo una permanenza di 3 h a temperatura di +4°C, le sospensioni sono state nuovamente centrifugate ed il supernatante raccolto e dializzato per 48 h in acqua di fonte corrente e quindi per 24 h in acqua distillata; il dializzato infine è stato liofilizzato in modo da ottenere l'antigene allo stato secco.

c) *Analisi degli idrati di carbonio*. — Per questa ricerca è stato impiegato il metodo cromatografico su carta.

Gli antigeni ottenuti come sopra ricordato, sono stati idrolizzati con H₂SO₄ 1N (50 cm³ per ogni 100 mg di antigene) per 8 h a 100°C. Trascorso

tale periodo l'ac. solforico è stato allontanato per centrifugazione, sotto forma di BaSO_4 aggiungendo una soluzione equimolecolare di cloruro di bario. Il supernatante, liofilizzato, e risospeso in pochi cm^3 di acqua distillata, è stato impiegato per le prove cromatografiche.

A tale scopo è stato impiegato il metodo ascendente e discendente, carta Whatman 1, utilizzando i seguenti solventi:

- 1) fenolo: acqua (80:20);
- 2) butanolo: ac. acetico: acqua (4:1:5);
- 3) butanolo: ac. formico: acqua (42:16:42);
- 4) butanolo: etanolo: acqua (4:1:1);
- 5) butanolo: piridina: acqua (3:2:1,5);

e come rivelatore ossalato acido di anilina ⁽¹⁰⁾.

Allo scopo di evidenziare eventuali aminozuccheri presenti negli idrolisati è stato utilizzato il metodo di GARDELL ⁽¹¹⁾ modificato da STOFFYN e JEANLOZ ⁽¹²⁾. Esso consiste nel deporre i campioni in esame sulla carta, spruzzarvi sopra ninidrina e quindi porre il foglio a 80°C per 3 h dopo di che il cromatogramma viene normalmente sviluppato. Così facendo l'amminozucchero viene trasformato in un idrato di carbonio con un atomo di carbonio in meno (per es. la glucosamina viene trasformata in arabinosio).

Per meglio separare gli idrati di carbonio con R_f quasi uguali, il cromatogramma, prima di essere rivelato con ossalato acido di anilina, è stato sviluppato due volte consecutive.

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

	Ps. aeruginosa	Ps. fluorescens	Ps. iodinum	Ps. mildenbergii	Ps. fragi	Ps. ovalis
glucosio	+	+	+	+	+	+
galattosio	—	+	—	—	—	—
ramnosio	+	+	+	—	+	+
amminozucchero	+	+	+	+	+	+

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti dagli altri AA. impiegando germi appartenenti allo stesso genere è possibile notare che esiste una certa discordanza. Infatti contrariamente a quanto riportato da Egami e coll. in *Pseudomonas aeruginosa* e da Eagon e Dedonder in *Pseudomonas fluorescens*, negli idrolisati in esperienza non è stato mai possibile mettere in evidenza ribosio, deossiribosio, mannosio, fucosio e xilosio.

Pur tuttavia i dati riferiti nella tabella, anche se ottenuti con un numero molto limitato di ceppi ed appartenenti tutti a specie diverse, permettono di dedurre quanto segue:

a) la composizione in carboidrati dei singoli antigeni somatici non è comune per tutti i ceppi esaminati;

b) il glucosio è presente in tutti gli antigeni, come pure il rammosio, fatta eccezione, per questo ultimo, del ceppo *Pseudomonas mildenbergii*;

c) il galattosio è presente solo in *Pseudomonas fluorescens*;

d) esiste un aminozucchero comune, rilevabile impiegando la tecnica di Gardell modificata da Stoffyn e Jeanloz, in tutti gli antigeni in esame. L'idrato di carbonio formatosi, dopo trattamento con ossalato acido di anilina, appare come una macchia di colore bruno la quale dopo una diecina di giorni diviene gialla. Alla luce ultravioletta essa presenta una fluorescenza bruna sia subito dopo essersi rivelata che quando ha assunto la colorazione gialla; il suo Rf è di 0,89.

I risultati ottenuti permettono quindi, anche con le riserve dovute al limitato numero di specie batteriche impiegate, di asserire che gli antigeni somatici estratti da varie specie di batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* hanno una composizione chimica di idrati di carbonio non uniforme ma che tale differenza non permette la identificazione delle singole specie. Infatti, in base alla composizione chimica, i ceppi esaminati possono essere suddivisi in tre gruppi ben distinti:

1) l'antigene risulta formato da glucosio ed aminozucchero; il gruppo è formato dal solo *Pseudomonas mildenbergii*;

2) l'antigene risulta formato da glucosio, rammosio ed aminozucchero; questo gruppo è il più numeroso e risulta formato da *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas iodinum*;

3) l'antigene risulta formato da glucosio, galattosio, rammosio ed aminozucchero. In questo gruppo si trova *Pseudomonas fluorescens*.

Tutto questo può far pensare che il genere *Pseudomonas*, analogamente al genere *Salmonella*, abbia l'antigene somatico costituito da diversi partigeni ciascuno dei quali presenta una propria composizione in idrati di carbonio. Pertanto tutti i ceppi aventi nell'antigene somatico partigeni diversi presenteranno una composizione in carboidrati qualitativamente differente mentre quelli che contengono partigeni uguali avranno una analoga composizione.

Questa è solo una ipotesi, tuttavia sarebbe opportuno approfondire l'argomento prendendo in esame un numero maggiore di ceppi appartenenti alle svariate specie ed inoltre effettuare prove atte a mettere in evidenza il comportamento sierologico delle singole specie in relazione al loro contenuto in carboidrati.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) DEFRANCESCHI A., BO G. e NAVA G. C. - Boll. Ist. sieroter. milan., 34: 703 (1955).
- (²) BO G., DEFRANCESCHI A. e NAVA G. C. - G. Microbiol., 3: 247 (1955).
- (³) NAVA G. C., BO G. e DEFRANCESCHI A. - G. Microbiol., 4: 95 (1957).
- (⁴) BO G. e NAVA G. C. - Boll. Ist. Sieroter. milan., 36: 556 (1957).
- (⁵) NAVA G. C. e BO G. - Riv. ital. Igiene, 18: 200 (1958).
- (⁶) EGAMI F., SHIMOMURA M., ISHIHARA H., HOMMA J. Y., SAGAHASHI K. e HOSOYA S. - Bull. Soc. Chim. Biol., 36: 779 (1954).
- (⁷) EAGON R. G. e DEDONDER R. - C. R. Acad. Sci., 244: 527 (1955).
- (⁸) TIECCO G. - Atti Soc. ital. Sci. vet., 13: 522 (1959).
- (⁹) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI E. e VAN DER SLUIS Y. - Rend. Ist. sup. Sanità, (edizione inglese) 17: 61 (1957).
- (¹⁰) PARTRIDGE S. M. - Biochem. Soc. Symposia, Cambridge, 3: 52 (1950).
- (¹¹) GARDELL S., HEJJKENSKJÖLD F. e ROCH-NORLEIND A. - Acta chem. scand., 4: 970 (1950).
- (¹²) STOFFYN P. Y. e JEANLOZ R. W. - Arch. Biochem. Biophys., 52: 373 (1954).