

73. M. PRINCIVALLE, G. DE FELIP, Littoria von LORCH e Silvana ALBERTI.
Sull'impiego della reazione di precipitazione nella classificazione dei lattobacilli.

Riassunto. — Gli autori hanno eseguito una revisione, su base sierologica, della classificazione di alcuni stipiti appartenenti a diverse specie di lattobacilli della loro collezione.

Inoltre hanno tentato di differenziare, sierologicamente, lo *Streptococcus faecalis* dallo *Streptococcus lactis*.

Nel corso di queste ricerche è stata impiegata la reazione di precipitazione eseguita secondo una tecnica che prevede l'impiego di un terreno colturale privo di proprietà apteniche, la filtrazione per Seitz dei sieri e antigeni precipitanti e l'estrazione degli antigeni precipitanti per 30'.

Con tale tecnica è stato possibile ottenere sieri capaci di classificare sicuramente ceppi appartenenti alla specie *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*.

La differenziazione sierologica dello *Streptococcus faecalis* dallo *Streptococcus lactis*, non è stata possibile in quanto tali stipiti hanno dimostrato comunanza antigenica; mentre il *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus lactis* hanno dimostrato assenza di comunanza antigenica con il *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*.

Résumé. — Les auteurs ont effectué une révision sérologique de la classification de quelques souches appartenant à différentes espèces de lactobacilles de leur collection. Ils ont même essayé la différenciation sérologique entre *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus lactis*.

Au cours de ces recherches on a employé la réaction de précipitation effectuée par une technique qui comporte l'usage d'un milieu de culture dépourvu de propriétés apthéniques, la filtration par Seitz des sérums et des antigènes précipitants et l'extraction des antigènes précipitants en 30'.

A l'aide de cette technique il a été possible d'obtenir des sérums capables de classer avec certitude des souches appartenant aux espèces *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*. La différenciation de *Streptococcus faecalis* à l'égard de *Streptococcus lactis* n'a pas été possible à cause de l'analogie antigénique démontrée par ces souches. Au contraire *L. acidophilus* et *L. casei* n'ont pas d'antigènes communs à l'égard de *L. helveticus*, *L. bifidus*, *S. faecalis*, *S. lactis*.

Summary. — A revision, on a serological basis, of the classification of some strains belonging to various species of lactobacilli in the authors' collection was carried out. Forthev an attempt was made to distinguish *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus lactis* serologically.

The precipitation reaction was used for this work, applying a technique involving the use of a culture medium free from haptenic properties, seitz filtration of the sera and precipitating antigens and extraction of the precipitating antigens for 30 min.

With this technique it is possible to obtain sera capable of typing with certainty, strains belonging to the species *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*.

The serological differentiation of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus lactis* was not possible in that these strains showed common antigens whilst *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus lactis* showed an absence of common antigens with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactibacillus casei*.

Zusammenfassung. — Die Verfasser haben die Revision der Klassifikation einiger Stämme, welche verschiedenen Arten von Milchbazillen ihrer Sammlung zugehören, auf serologischer Grundlage ausgeführt.

Sie haben ausserdem versucht *Streptococcus faecalis* von *Streptococcus lactis* serologisch zu differenzieren.

Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde die Niederschlag-Reaktion angewandt; sie wurde nach einer Technik ausgeführt, welche einen ohne aptenische Eigenschaften Nährboden, die Seitz-Filtrierung der Seren und der Niederschlag-Antigenen und die Extraktion der Niederschlag-Antigenen auf 30' gebraucht. Durch diese Technik wurden Seren erhalten, welche mistande sind die Stämme der Arten *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus casei* gewiss zu klassifizieren.

Die serologische Differenzierung des *Streptococcus faecalis* von *Streptococcus lactis* war nicht möglich, da diese Stämme gemeinsame Antigenen besitzen. Dagegen haben *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus zifidus*, *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus lactis* keine Antigengemeinschaft mit *Lactobacillus acidophilus* und *Lactibacillus casei* erweist.

In questi ultimi anni numerosi autori si sono interessati al problema della classificazione dei lattobacilli, basandosi sulle loro proprietà colturali, morfologiche, biochimiche ed antigeniche [WILLIAMS (1); ORLAND (2);

BRIGGS ⁽³⁾; SHARPE ⁽⁴⁾; DAVIS ⁽⁵⁾; WHEATER ⁽⁶⁾; WHEATER ⁽⁷⁾; DAVIS ⁽⁸⁾; MATTICK ⁽⁹⁾; SHARPE ⁽¹⁰⁾; NAYLOR ⁽¹¹⁾].

L'introduzione dei metodi sierologici ha chiarito enormemente il problema della classificazione dei lattobacilli, anche se in certi casi è possibile incorrere in qualche incertezza dovuta all'esistenza di specie batteriche con comunanza antigenica [SHARPE ⁽⁴⁾; SHARPE ⁽¹⁰⁾; NAYLOR ⁽¹¹⁾].

Su queste premesse abbiamo creduto opportuno rivedere la classificazione di alcuni ceppi della nostra collezione di lattobacilli.

Tale collezione era stata realizzata nel passato con stipiti batterici provenienti da altre collezioni o da isolamenti eseguiti da specialità farmaceutiche e da derivati del latte.

Gli stipiti batterici erano stati a loro tempo classificati secondo le tecniche usualmente impiegate, basandosi cioè sull'esame delle caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche.

La recente introduzione della tecnica sierologica di classificazione, ci ha pertanto indotti ad una revisione degli stipiti della nostra collezione e in particolare di quelli abitualmente impiegati a scopi terapeutici: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*.

Per la produzione di sieri agglutinanti e precipitanti abbiamo utilizzato stipiti batterici appartenenti a collezioni straniere, classificati mediante la tecnica della siero-precipitazione.

Tale reazione sierologica è stata anche da noi impiegata nel corso di queste ricerche, in quanto prove preliminari avevano dimostrato una scarsissima risposta in anticorpi agglutinanti; ciò conferma quanto rilevato da altri autori [SHARPE ⁽⁴⁾; MATTICK ⁽⁹⁾; SHARPE ⁽¹⁰⁾; NAYLOR ⁽¹¹⁾].

E' stata, inoltre, presa in considerazione la possibilità di differenziare, mediante la reazione di precipitazione, stipiti appartenenti alle specie *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus lactis*.

MATERIALI

STIPITI BATTERICI IMPIEGATI PER LA PREPARAZIONE DI SIERI PRECIPITANTI.

Lactobacillus acidophilus A.T.C.C. 7469 (N. 94), *Lactobacillus bulgaricus* 09 A.T.C.C. 10812 (N. 97), *Lactobacillus helveticus* H21 N.I.R.D. (N. 98), *Lactobacillus bifidus* N.C.I.B. 2797 (N. 99), *Streptococcus lactis* R A.T.C.C. 8043 (N. 100), *Streptococcus faecalis* A.T.C.C. 10541 (N. 101).

STIPITI BATTERICI IMPIEGATI PER LA PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PRECIPITANTI.

Oltre agli stipiti batterici di cui sopra, sono stati impiegati N. 36 ceppi della nostra collezione e precisamente:

N. 15 stipiti di *Lactobacillus casei*, contrassegnati in collezione con i numeri 1, 2, 3, 4, 6, 8, 22, 28, 62, 68, 73, 74, 75, 84;

N. 9 stipiti di *Lactobacillus acidophilus*, contrassegnati in collezione con i numeri 10, 27, 54, 77, 85, 86, 87, 88, 93;

N. 2 stipiti di *Lactobacillus lactis*, contrassegnati in collezione con i numeri 2, 24;

N. 3 stipiti di *Lactobacillus bulgaricus*, contrassegnati in collezione con i numeri 102, 103, 104;

N. 1 stipite di *Lactobacillus helveticus*, contrassegnato in collezione con il numero 70;

N. 1 stipite di *Lactobacillus bifidus*, contrassegnato in collezione con il numero 32;

N. 3 stipiti di *Streptococcus lactis*, contrassegnati in collezione con i numeri 26, 51, 76;

N. 3 stipiti di *Streptococcus faecalis*, contrassegnati in collezione con i numeri 102, 103, 104.

Terreno colturale. — Brodo carota-fegato a pH 6.

Conservativo. — Tiomersalato di sodio (soluzione madre in acqua distillata all'1‰).

Soluzione acida di estrazione. — Acido cloridrico 0,05 N in soluzione fisiologica.

Animali per la preparazione dei sieri precipitanti. — Conigli dei due sessi, del peso di circa kg 1,5.

TECNICA

PREPARAZIONE ANTIGENI DA INOCULARE.

Tutti gli antigeni da inoculare nei conigli erano preparati da colture in brodo carota-fegato (cm³ 100); tali colture venivano mantenute per 48 ore a 37°C, indi centrifugate. Il sedimento veniva lavato per tre volte in soluzione fisiologica, quindi sospeso in cm³ 10 della medesima.

Tali sospensioni venivano scaldate in b.m. a 60°C per 1 ora, indi diluite con soluzione fisiologica fino ad una concentrazione, in cellule batteriche, corrispondente a $6 \times 10^6/\text{cm}^3$.

Infine veniva aggiunto, quale conservativo, tiomersalato alla concentrazione finale di 1:10.000.

PREPARAZIONE DEI SIERI PRECIPITANTI.

I conigli prima di venire inoculati con le sospensioni batteriche di cui sopra, erano sottoposti ad un prelievo di sangue, onde controllare l'eventuale presenza, nei sieri normali, di anticorpi precipitati gli antigeni in esame. Accertata l'assenza di questi anticorpi, l'animale veniva sottoposto ad una serie di inoculazioni secondo il seguente schema:

1°	giorno	=	cm ³ 0,5	sottocute
3°	»	=	»	» endovena
7°	»	=	»	»
11°	»	=	»	»
15°	»	=	»	»
20°	»	=	»	»

Dopo 8 giorni dall'ultima inoculazione veniva eseguito, dalla safena, un prelievo per evidenziare l'avvenuta risposta immunitaria, mediante la reazione di precipitazione. L'animale veniva sottoposto ad una nuova serie di inoculazioni endovena se la risposta risultava negativa.

Accertati gli anticorpi, l'animale veniva salassato in bianco dalla carotide, ed il siero veniva raccolto sterilmente. Il siero aggiunto di tiomersalato (1:10.000) veniva filtrato per Seitz; parte del siero veniva infialato e conservato a 4°C e parte veniva liofilizzato. A tal fine il siero veniva distribuito nella quantità di cm³ 0,3 in fiale da vuoto da cm³ 5.

PREPARAZIONE DEGLI ANTIGENI PRECIPITANTI.

Gli stipiti batterici venivano coltivati per 48 ore a 37°C in brodo carota-fegato (cm³ 100); le colture venivano centrifugate ed il sedimento lavato per 3 volte in soluzione fisiologica, indi ripreso con cm³ 15 della soluzione acida di estrazione e portato in b.m. bollente per 30'. Tali sospensioni venivano neutralizzate con idrato di sodio allo 0,5%, addizionate di tiomersalato (1:10.000); filtrate per Seitz e conservate a 4°C.

REAZIONE DI PRECIPITAZIONE.

La reazione di precipitazione era eseguita a t. a. in provette coniche da sierologia (diametro mm 6). Centimetri cubici 0,3 di antigene precipitante veniva stratificato su cm^3 0,3 di siero; le letture erano eseguite a intervalli di 5'. Le letture non venivano protratte oltre la seconda ora, poichè i risultati ottenuti dopo questo periodo non sono probativi. La lettura delle reazioni positive era ancora possibile dopo 24 ore dall'avvenuta formazione dell'anello.

I sieri liofilizzati venivano utilizzati riprendendo il contenuto della fiala con cm^3 0,3 o cm^3 0,15 di acqua distillata e la reazione di precipitazione veniva eseguita stratificando, sul siero, l'antigene precipitante sempre nella proporzione di 1:1.

I controlli erano eseguiti con siero normale di coniglio raccolto e conservato con la stessa tecnica usata per i sieri precipitanti.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le tecniche di preparazione dei sieri e antigeni precipitanti, usate nel corso di queste ricerche, sono fondamentalmente analoghe a quelle impiegate da altri autori che si sono interessati dell'argomento [SHARPE (⁴); MATTICK (⁹)].

Tuttavia, a tali tecniche, sono state apportate modifiche relative all'impiego di un idoneo terreno colturale, alla filtrazione per Seitz dei sieri ed antigeni precipitanti e alla durata del tempo di estrazione degli antigeni precipitanti.

I maggiori inconvenienti, rilevati in precedenza dai diversi autori, sono quelli relativi alle interferenze aspecifiche, nella reazione di precipitazione, dovute alla presenza di apteni nei reattivi.

Tali apteni derivano dall'impiego di terreni colturali a base di estratto di pomodoro [WHEATER (⁷)] che promuovono, di per se stessi, una risposta anticorpale. La eliminazione di tali antigeni incompleti comportava l'impiego di complesse tecniche che, pertanto, non rendevano agevole la reazione.

L'impiego del terreno brodo carota-fegato, ha invece, eliminato tale inconveniente. L'introduzione della tecnica di filtrazione per Seitz, dei sieri e degli antigeni precipitanti, che ha permesso di ottenere reattivi molto limpidi, ha reso agevole e sicura la lettura di ogni reazione eseguita. Inoltre, per quanto riguarda la preparazione degli estratti precipitanti, in base alle numerose prove preliminari eseguite, si è potuto sta-

bilire che il tempo di estrazione ottimale era da considerarsi quello di 30'. Per quanto si riferisce all'impiego dei sieri liofilizzati, si è notato che questi mantengono inalterate le proprietà precipitanti anche dopo tre anni dalla preparazione. Prove analoghe, eseguite dopo lo stesso periodo di tempo e con la stessa partita di sieri non liofilizzati, ma infialati e conservati a 4°C, dimostrano che il potere precipitante permane anche in questi sieri; la reazione però è risultata più tardiva in quanto la formazione dell'anello avveniva entro un periodo di tempo variabile da 40' a 90', anzichè entro 5'-10'.

La preparazione dei sieri precipitanti è stata possibile per il *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus lactis*.

Il *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus* non hanno mai dato sieri precipitanti in grado di reagire con il ceppo specifico, anche dopo ripetute inoculazioni in diversi animali.

Onde meglio accertare la loro completa negatività, i sieri ottenuti con il *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bifidus*, sono stati liofilizzati, indi ripresi con acqua distillata e riportati a un volume minore (cm³ 0,15) di quello iniziale (cm³ 0,30); ciò per concentrare gli eventuali anticorpi presenti nel siero ed evidenziare, con la reazione di precipitazione, anche una debole risposta anticorpale. Tale artificio di tecnica non ha dato risultati positivi.

Come si rileva dalla tabella I, l'impiego dei sieri precipitanti *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, ha permesso di confermare solo in parte la classificazione di collezione degli stipiti batterici esaminati.

Di 9 ceppi inclusi in collezione come *Lactobacillus acidophilus*, 6 hanno confermato la loro denominazione precedente, 1 ha reagito soltanto con il siero precipitante *Lactobacillus casei*, ed i 2 rimanenti non hanno reagito con nessuno dei sieri da noi preparati.

Di 15 ceppi di *Lactobacillus casei* solo 3 hanno confermato la precedente classificazione; 11 hanno reagito soltanto col siero precipitante *Lactobacillus acidophilus*, ed 1 ceppo non ha reagito con nessuno dei nostri sieri.

Il *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* non hanno provocato una risposta anticorpale e pertanto non è stato possibile confermare sierologicamente la denominazione degli stipiti classificati in collezione come tali. E' stata confermata la loro de-

TABELLA I

Estratti precipitanti stipite batterico N°	Sieri precipitanti		Siero norm. di coniglio	Classificazione di collezione	Classificazione sierologica
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	Controllo		
1	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
2	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
3	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
4	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
6	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
8	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
9	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
10	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
22	—	+	—	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
23	—	+	—	<i>L. lactis</i>	<i>L. casei</i>
24	—	+	—	<i>L. lactis</i>	<i>L. casei</i>
27	—	+	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
28	—	—	—	<i>L. casei</i>	non classific.
32	—	—	—	<i>L. bifidus</i>	<i>L. bifidus</i> (1)
33	—	—	—	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i> (1)
54	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
62	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
68	—	+	—	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
69	—	—	—	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i> (1)
70	—	—	—	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> (1)
73	—	+	—	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
74	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
75	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
77	—	—	—	<i>L. acidophilus</i>	non classific.
84	+	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
85	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
86	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
87	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
88	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
93	+	—	—	<i>L. acidophilus</i>	non classific.

Leggenda:

(1) Per tali stipiti batterici non è stato possibile eseguire la classificazione sierologica per mancanza di siero omologo precipitante. E' stata confermata la classificazione di collezione, in base alle caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche, non avendo tali stipiti reagito positivamente ai sieri precipitanti eterologhi (*L. acidophilus* e *L. casei*).

nominazione in base alle caratteristiche morfologiche, colturali e biochimiche; inoltre tali ceppi non hanno reagito positivamente con i sieri capaci di precipitare *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*.

I due stipiti denominati in collezione *Lactobacillus lactis*, hanno reagito positivamente con il siero precipitante *Lactobacillus casei*, e negativamente con il siero precipitante *Lactobacillus acidophilus*, pertanto la loro denominazione è stata modificata.

In ogni caso le prove di precipitazione non hanno evidenziato interazioni tra le diverse specie batteriche prese in considerazione e il *Lactobacillus acidophilus* e il *Lactobacillus casei* (vedi tabella II); infatti i sieri

TABELLA II

Estratti precipitanti stipite batterico N°	Sieri precipitanti		Siero norm. di coniglio	Controllo classificazione di collezione
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>		
94	+	—	—	<i>L. acidophilus</i> ATCC 7469
95	—	+	—	<i>L. casei</i> C9 NIRD
96	—	—	—	<i>L. lactis</i> L3 NIRD
97	—	—	—	<i>L. bulgaricus</i> 09 ATCC 10812
88	—	—	—	<i>L. helveticus</i> H21 NIRD
99	—	—	—	<i>L. bifidus</i> NCIB 2797
100	—	—	—	<i>Strept. lactis</i> R ATCC 8043
101	—	—	—	<i>Strept. faecalis</i> ATCC 10341

precipitanti *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* non hanno dato luogo a reazioni crociate, dimostrandosi così specie-specifici.

La differenziazione sierologica dello *Streptococcus lactis* dallo *Streptococcus faecalis*, mediante i sieri precipitanti, non è stata possibile, in quanto tali stipiti hanno dimostrato di possedere comunanza antigenica anche dopo le prove di assorbimento.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WILLIAMS N. B. - J. Infect. Dis., 82: 34 (1948).
 - (²) ORLAND F. J. - J. Infect. Dis., 86: 63 (1950).
 - (³) BRIGGS M. - J. Gen. Microb., 9: 284 (1953).
 - (⁴) SHARPE M. E. - J. Gen. Microb., 12: 407 (1955).
 - (⁵) DAVIS G. H. - J. Gen. Microb., 13: 481 (1955).
 - (⁶) WHEATER D. M. - J. Gen. Microb., 12: 423 (1955).
 - (⁷) WHEATER D. M. - J. Gen. Microb., 12: 433 (1955).
 - (⁸) DAVIS G., BISSET K. e HALE C. - J. Gen. Microb., 13: 68 (1955).
 - (⁹) MATTICK A. T., MABBITT L. A. - II Convegno Internaz. Standardizzazione Immuno-microbiologica - Roma, Istituto Sup. Sanità, (1956).
 - (¹⁰) SHARPE M. E., WHEATER D. M. - J. Gen. Microb., 16: 676 (1957).
 - (¹¹) NAYLOR G., SHARPE M. E. - J. Dairy Res., 25: 92 (1958).
 - (¹²) SHARPE M. E. - J. Gen. Microb., 13/1: 498 (1955).
-