

20. UN NUOVO GRUPPO DI TERRENI PER LA CULTURA DEL BACILLO TUBERCOLARE.

Per la cultura del bacillo tubercolare oggi si usano specialmente i terreni al latte uovo, per le culture su substrato solido; e i terreni sintetici, per le culture in ambiente liquido; si tratta, però, sempre di terreni costosi e spesso di lunga e complessa preparazione.

Per ovviare a questi inconvenienti ho voluto ricercare un terreno per la cultura del bacillo tubercolare che rispondesse ai seguenti requisiti: fosse elettivo, di facile e rapida preparazione, economico.

Fra le sostanze di facile acquisto e di basso costo su cui il bacillo tubercolare più facilmente cresce è la patata; alla patata, dunque, rivolsi la mia attenzione e mi diedi con essa a sperimentare per allestire un terreno che rispondesse ai requisiti sopra enunciati.

Non starò qui ad enumerare tutte le tappe percorse per raggiungere la meta prefissa o i tentativi compiuti, dirò soltanto che la mia attenzione si polarizzò sul brodo di patata allestito con la tecnica di cui tra poco dirò.

Due tipi di brodo di patata furono tentati nel passato nella cultura del bacillo tubercolare e precisamente: uno dal Sander ⁽¹⁾ e uno dal Jurewitch ⁽²⁾. Il terreno del Sander, però, è di lunga e complessa preparazione — occorrono più giorni (cinque) e lunghe manipolazioni per farlo — e in ultima analisi non offre particolari vantaggi di elettività. Quello del Jurewitch è anch'esso di complessa preparazione e per di più costoso, perchè per il suo allestimento oltre alle patate, occorre anche la carne.

Sia il terreno del Sander che quello del Jurewitch non hanno avuto alcun seguito pratico, tanto che del primo nessun trattato ne dà più nemmeno la formula, del secondo soltanto il Besson ne fa un breve accenno.

Ecco la formula di preparazione del brodo che considero l'optimum del genere.

Prendere delle patate di qualsiasi qualità — ho potuto convincermi che tutte le patate si equivalgono fra loro e che non ha nessuna importanza che la loro pasta sia bianca o gialla o che la loro grana sia compatta o farinosa — sbucciarle, tagliarle a piccoli dadi di circa 1 cc., lavarle rapidamente in acqua corrente, pesarle e immergerle in un grande pallone, aggiungere la stessa quantità in peso di acqua di fonte e far

bollire per un quarto d'ora. Alla fine della cottura agitare bene il pallone e versare il liquido in un altro recipiente, aggiungere il 5 % di glicerina e l'1 % di peptone neutro (io ho adoperato il Witte).

Se si desidera il terreno liquido, si sterilizzerà il brodo così ottenuto — non c'è bisogno nè di filtrarlo nè di decantarlo — in autoclave: dopo la sterilizzazione il terreno sarà pronto per l'uso.

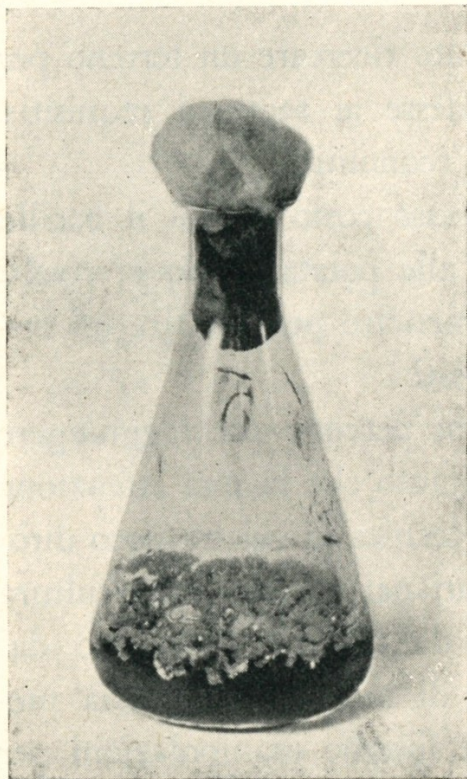


FIG. 1. - Cultura in brodo patata di bacillo tubercolare umano.

Se si desidera, invece, il terreno solido, dopo l'aggiunta della glicerina e del peptone si aggiunge in esso il 2 % di agar che si farà sciogliere con la solita tecnica, si verserà quindi in provette o provettoni che si sterilizzeranno in autoclave e si faranno poi rapprendere a becco di clarino.

Adoperando peptone neutro si ha un terreno che avrà un pH variante tra 5,8 e 6: su di esso il bacillo tubercolare si sviluppa a meraviglia.

Nel brodo si hanno rapidamente veli spessi e granulosi che copriranno in pochi giorni tutta la superficie del liquido e seguiranno an-



FIG. 2. - *Da sinistra a destra*: Culture di bacillo tubercolare umano, bovino e aviario (ceppi di collezione) su agar patata semplice; Cultura di isolamento di bacillo tubercolare umano (da sputo) su agar patata verde di malachite.

cora a crescere sì che il velo apparirà piegheggiato, ondulato. Sotto il velo pendono numerose stalattiti bacillari. Il liquido sottostante rimane limpido e di colore ambrato. In fondo al matraccio si forma un sedimento polverulento, grigiastro, dovuto soprattutto alla sedimentazione dei frustoli di patata rimasti in sospensione al momento della cottura. Le culture in brodo emanano un odore gradevole, quasi di viola mammola.

Se si desidera lavorare su brodo limpido per studiare eventuali prodotti solubili o solubilizzabili del bacillo tubercolare, basterà far decantare il liquido e filtrarlo su carta: il bacillo di Koch vi cresce ugualmente bene.

In agar, già dopo 24 ore dal passaggio, sono visibili le piccole colonie che cominciano a svilupparsi. Nella semina non c'è bisogno di intaccare la superficie dell'agar. Già dopo sei giorni — mantenere le culture orizzontalmente a 38° — si hanno estese patine che si diffondono a velo e mano mano vanno a coprire tutta la superficie dell'agar. Sul velo si hanno escrescenze innumeri, tipicamente a cavolo fiore (il tipo bovino dà escrescenze più rilevate e il tipo aviario più piccole di quelle del tipo umano, altrimenti le tre culture morfologicamente si equivalgono).

Per l'isolamento del bacillo di Koch dagli sputi, ho isolato i nummuli bacilliferi, li ho omogeneizzati con la soda, ho neutralizzato con l'acido cloridrico, seguendo in ciò la tecnica consigliata dal Petragnani (³), e mi sono servito del terreno all'agar con l'aggiunta di un po' di verde di malachite, perchè sull'agar semplice si sviluppano facilmente alcune muffe la cui comparsa si evita, invece, con l'aggiunta del colorante.

Nel terreno da me preparato ho potuto convincermi che la quantità optimum di verde di malachite da aggiungere per 100 cc. di terreno è quella di 1 cc. di una soluzione al 0,5 %. Il verde di malachite ritarda lievemente lo sviluppo del bacillo tubercolare, le colonie che in seguito si formano sono, però, più rigogliose di quelle su agar semplice, pur non avendo tendenza a confluire.

Adoperando una soluzione di verde di malachite all'1 %, il ritardo sarà, invece, maggiore e il rigoglio minore; al 2 % non ho avuto sviluppo.

Caratteristico è l'aspetto che assumono le culture con verde di malachite: mano mano che il bacillo tubercolare cresce, il cono di agar si scolora dall'alto al basso, e il becco di clarino finisce con l'assumere l'aspetto e il colore dei tubi preparati senza verde di malachite.

A conclusione di quanto esposto io consiglio:

1) il brodo di patata, tal quale o filtrato: per le culture in mezzo liquido;

2) l'agar patata: per le culture in mezzo solido;

3) l'agar patata verde di malachite: per le culture d'isolamento.

Questi terreni sono estremamente elettivi, e in essi il bacillo tubercolare si sviluppa in maniera ultrarapida.

RIASSUNTO

Si descrive un nuovo gruppo di terreni per la cultura del bacillo di Koch la cui base è costituita da un brodo di patata preparato facendo bollire per un quarto d'ora ugual quantità in peso di patate tagliate a dadi di 1 cc. e acqua di fonte con l'aggiunta del 5 % di glicerina e l'1 % di peptone neutro. Con la successiva aggiunta del 2 % di agar si può avere un ottimo terreno solido e con l'aggiunta, per ogni 100 cc. di terreno, di 1 cc. di una soluzione di verde di malachite al 0,5 % un ottimo ed economico terreno per le culture di isolamento.

SUMMARIUM

Nova describuntur terreno, ad bacillum Kochii colendum egregie accomodata quorum fundamen est ius solani tuberosi. Quod ius conficitur tuberum tesseris centimetrolibus et aqua fontis pari pondere per quartam horae partem coquendis, additis glycerinae quinque centesimis partibus, peptonis neutri una.

Ad haec si agaris duae centesimae partes adiungantur optimum terrenum fit solidumque. Huic si admixtionis vicensimae (5 %) de viridi malachitidos colore unum centimetrum cubicum addideris, terrenum habebis optimum et minimi sumptus et ad segreges culturas aptissimum.

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

BIBLIOGRAFIA

(¹) SANDER, « Ueber das Wachsthum von Tuberkelbacillen auf pflanzlichen Nährböden », Arch. f. Hyg., 16, 238 (1893).

(²) JUREWITCH W., « Kartoffelnährbouillon zur Züchtung der Tuberkelbacillen », Cntr. f. Bakt. Or., 47, 664 (1908).

(³) PETRAGNANI G., « Alcune utili modificazioni al mio terreno ed alla tecnica per l'isolamento in cultura pura dei bacilli di Koch », Boll. Ist. Sier. Mil., 5, 174 (1926).