



Mix. D. 38.15

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

SULLA

DECOMPOSIZIONE DELL'ACIDO IPPURICO

PER MEZZO DEI MICROORGANISMI

DEL

Dott. GUGLIELMO CRISAPULI

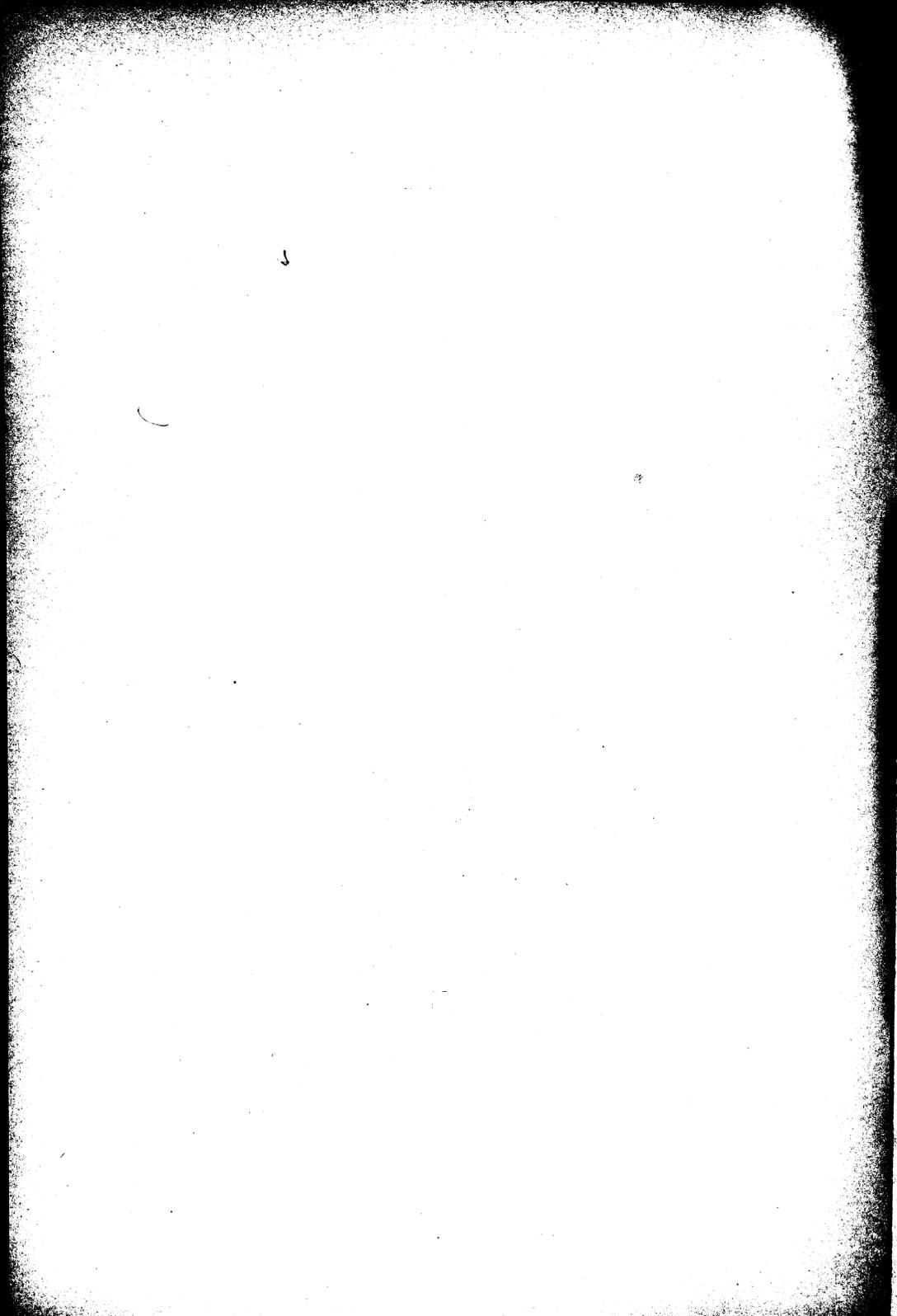
PERITO MEDICO IGIENISTA
ASSISTENTE MEDICO PRESSO I LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ
GIÀ AIUTO DI CLINICA MEDICA GENERALE



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1895



MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

SULLA

DECOMPOSIZIONE DELL'ACIDO IPPURICO

PER MEZZO DEI MICROORGANISMI

DEL

Dott. GUGLIELMO CRISAPULI

PERITO MEDICO IGIENISTA

ASSISTENTE MEDICO PRESSO I LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ
GIÀ AIUTO DI CLINICA MEDICA GENERALE

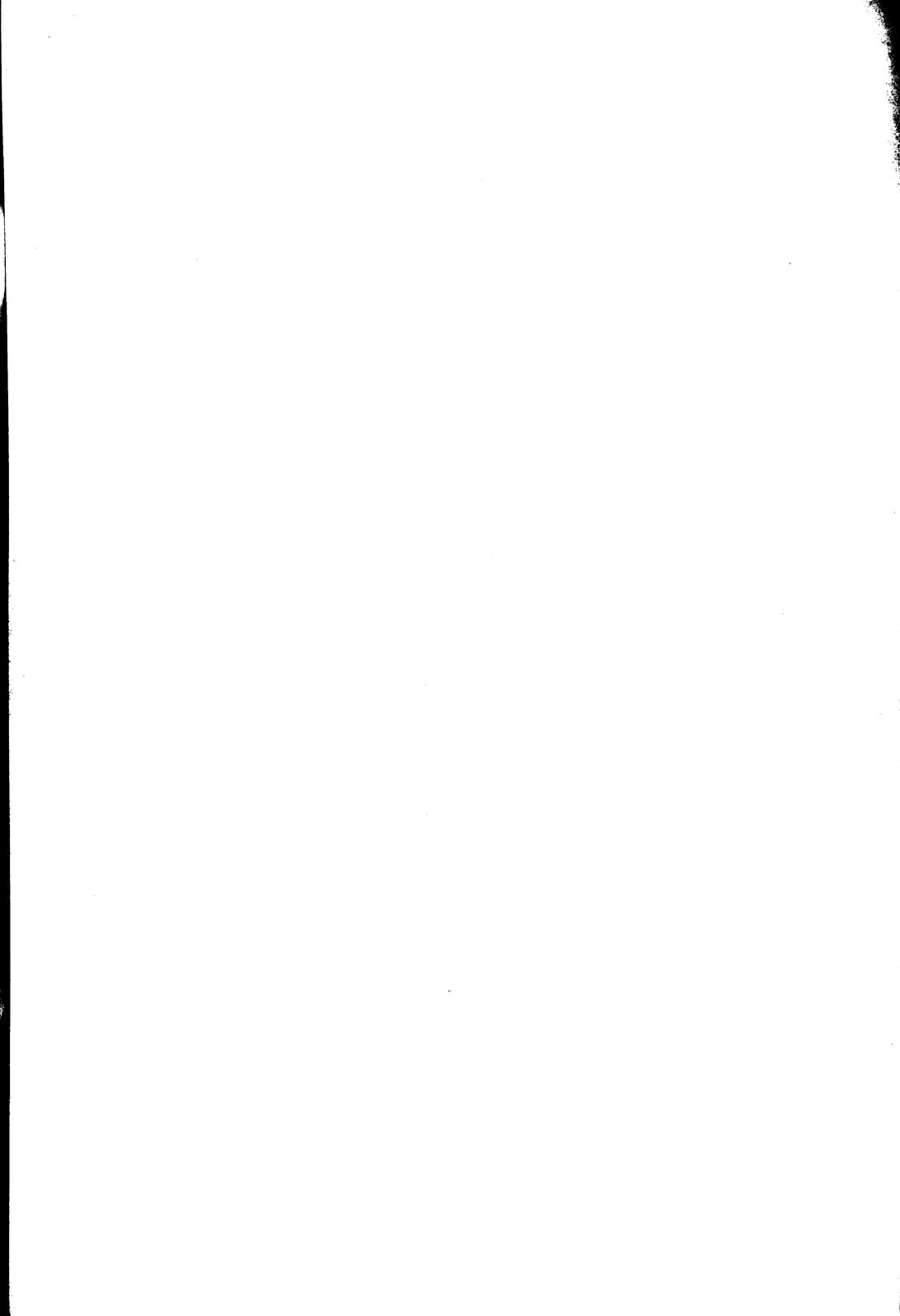


ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1895

Albi



SULLA DECOMPOSIZIONE DELL'ACIDO IPPURICO PER MEZZO DEI MICROORGANISMI

DEL

Dott. GUGLIELMO CRISAFULLI

Perito medico igienista

Assistente medico presso i Laboratori scientifici della Direzione di Sanità
già Aiuto di Clinica medica generale

Il Von Tieghen (*Compt. Rend.*, t. LVIII) che si occupò della decomposizione dell'acido ippurico delle urine fermentate degli erbivori cercò di indagare se questo fenomeno che si vedeva produrre contemporaneamente alla decomposizione dell'urea avesse luogo per opera di fermenti comuni.

Egli da ricerche microscopiche eseguite su urine di erbivori e di carnivori, dedusse che le due decomposizioni si devono ad identici fermenti producendosi i noti prodotti di decomposizione, acido carbonico ed ammoniaca in un caso, ed acido benzoico e glicocola nell'altro.

Dopo lui Rattone e Valenti (Sulla scomparsa dell'acido ippurico nelle urine fermentate - *Arch. per le scienz. med.*, v. X, n. 15) avendo isolato il micrococcus ureae, capace di determinare la fermentazione ammoniacale dell'urina, lo innestarono in tubi di gelatina dove avevano introdotto una determinata quantità di acido ippurico. Dopo 24 ore non trovarono più acido ippurico ma acido benzoico nella gelatina; e siccome pareva loro di notare un particolare odore ammoniacale nelle culture in esame, sospettarono

la produzione di ammoniaca, ma non riuscirono a poterne constatare la presenza allo stato gassoso in cui la cercarono.

Il Rattone nel suo trattato sui microorganismi mette la decomposizione dell'acido ippurico tra le fermentazioni alcaline della urina.

Non è a mia conoscenza che altri si sia occupato della decomposizione dell'acido ippurico per opera di speciali fermenti, e mi è parso far cosa non priva del tutto di interesse intraprendere lo studio di questo fenomeno, che quantunque possa venire determinato da microorganismi identici a quelli che possono decomporre l'urea, nulla ha a che fare con la fermentazione alcalina della urina. E di fatti mentre dalla decomposizione dell'urea si ottiene una marcata reazione alcalina, dallo acido ippurico si ha costante reazione nettamente acida.

Ho voluto partire dalla constatazione dello sdoppiamento della urea per opera dei microorganismi ed o potuto confermare quanto dal Bergonzini fu notato lavorando su urine sterilizzate, in quanto cioè alla possibilità di avere decomposta l'urea da vari microorganismi oltre al micrococcus ureae, cioè da alcuni piogeni e dal proteus vulgaris; ora il proteus vulgaris che decompone l'urea, è inerte per l'acido ippurico, e nello stesso modo si comporta lo stafilococco piogene fetido, I brodi, cui veniva aggiunta dell'urea purissima, venivano sterilizzati a temperature basse frazionatamente onde evitare la formazione di carbonato di ammoniaca col calore eccessivo.

Passando all'acido ippurico mi proponevo di vedere: se sotto la forma di ippurato sodico permette la vita e lo sviluppo dei vari batteri e dentro quali limiti. Quali microorganismi lo decompongano con produzione di acido benzoico e se con formazione di reazione acida; ed in fine se i microorganismi che spiegano un azione sdoppiante sull'acido ippurico hanno in tutte le condizioni ugual potere.

Trovai disadatto far agire i microorganismi sullo acido ippurico libero introdotto nel terreno di coltura sia dopo sciolto a caldo che sotto forma cristallina. La reazione fortemente acida che si produce ostacolava la vitalità del germe.

Pensai al brodo ippurico per introduzione in esso di ippurato sodico.

Preparavo una soluzione neutra dell'acido in presenza di idrato sodico. Potevo così ottenere delle soluzioni limpide contenenti una

forte quantità di sostanza allo stato di sale. Univo una data quantità di questa soluzione al brodo di Löffler e tenevo neutra la reazione, quindi distribuivo in provette e sterilizzavo o alla pentola Koch; o all'autoclave.

Il giorno seguente passavo agl'innesti.

Dopo 24 ore di incubazione a 37° C. trovai sviluppo rigoglioso in presenza di g. 1, di acido ippurico per 100 di brodo; per lo stafilococco p. aureo-albo-citreo-fetido, pel proteus vulgaris e zenkeri, pel B. subtilis, B. piocianeus, B. cholii, B. del tifo, B. della pseudo difterite, B. del carbonchio ematico, vibrione del colera e vibrioni simili, B. fluorescens putridus, B. dell'acido lattico, B. radiceforme.

Si svilupparono meno rigogliosamente nel brodo semplice lo streptococco del Pasquale, lo streptococco della respola, il B. prodigioso, il B. del latte bleu, quello della difterite e difterite aviaria e la sarcina lutea.

Non riuscii a poter coltivare nel brodo ippurico il B. della setticemia dei topi ed il mal rosso dei suini.

Da questa prima ricerca potei credere che ad eccezione dei due microrganismi che non si svilupparono affatto tutti gli altri possono vivere rigogliosamente nel brodo contenente l'1 per 100 di acido ippurico sotto la forma di ippurato, e le piccole differenze di sviluppo credo piuttosto debbano ascriversi al non essere tutte le culture madri di una stessa data di sviluppo, ed a noi è noto come molti microrganismi si attenuano se vengono lasciati lungamente senza rinnovare il terreno. In tutte le ricerche venivano tenute delle colture testimonio in brodo di Löffler semplice.

* * *

Accertato che tutti i microrganismi che intendevo mettere a prova si sviluppavano rigogliosamente in presenza della sostanza in esame, passavo a vedere quali avevano dato luogo all'acido benzoico.

Qui cominciavo dal saggiare la reazione. Essa fu trovata costantemente acida in tutte le culture in cui poi si potè stabilire lo avvenuto sdoppiamento dell'acido ippurico.

Intanto profittando della proprietà che hanno tanto l'acido benzoico che lo ippurico, di staccarsi in presenza di un acido minerale dalla loro combinazione salina e di precipitare sotto forma cristal-

lina, acidificavo fortemente con HCl e lascio in riposo per 24 ore. Avevo ora un deposito a pagliette bianche e leggiere, ora dei bei cristalli ad aghi più o meno voluminosi ed aggruppati variamente.

Passavo allora all'esame microscopico di questi cristalli e nel maggior numero dei casi potevo ben differenziare i cristalli di acido benzoico da quelli di acido ippurico. Talvolta però non riuscivasi ad avere cristalli molto netti e si restava nel dubbio.

Dopo questo primo esame filtravo e lavavo sul filtro il residuo con acqua acidulata, quindi essiccavo a 100° C. sino a costanza di peso. Facendo allora tesoro della grande solubilità in etere dello acido benzoico di fronte alla quasi insolubilità in esso dello ippurico lavavo il filtro con questo solvente e ripesavo; la perdita di peso addebitavo all'acido benzoico asportato.

Da ripetuti saggi fatti con brodo ippurico senza essere inquinato potei ricavare che una piccola perdita di peso si ha sempre dopo trattamento con etere, ma compresa tra la quarta e la terza decimale; e ciò per tracce di acido ippurico che possono venire sciolte o per impurità che inevitabilmente vengono trasportate.

Svaporando l'etere e sublimando il residuo, se insieme all'acido benzoico veniva trasportato dell'acido ippurico si otteneva, oltre ai vapori di acido benzoico, un odore speciale di mandorle amare costante nella sublimazione dell'acido ippurico.

Dal complesso di questi procedimenti potevo con sicurezza affermare o negare l'avvenuto sdoppiamento e potevo anzi ricavare un criterio approssimativo sulla quantità di acido benzoico prodotta e quindi circa il potere sdoppiante dei microrganismi in esame.

Dopo 24 ore di inoculazione a 37° C., furono trovate tracce di acido benzoico nel brodo con culture di stafilococco piogeno aureo, st. p. albo e st. p. citreo; dopo 48 ore anche nelle culture di streptococco del Pasquale e di uno streptococco isolato da fresco da un ascesso flemmonoso. Dopo quattro giorni fu trovato abbondante acido benzoico anche nelle culture di b. prodigioso da me isolato da una flittene di risipola e da altro streptococco isolato da una placca difterica.

Altri microrganismi non diedero caratteri certi di avvenuta decomposizione dell'acido ippurico fino all'ottavo giorno.

Riporto in una tavola i risultati ottenuti:

Perdita di peso del residuo sul filtro dopo estrazione con etere.

CULTURA IN BRODO IPPURICO	DOPO 24 ORE	DOPO 48 ORE	DOPO 4 GIORNI
Stafilococco piogene aureo	0,0847	0,1242	0,1342
» citreo	0,0891	0,0986	0,1276
» » albo	0,1088	0,1286	0,1285
» » fetido	0,0002	0,0003	0,0002
Streptococco del Pasquale	0,0024	0,0542	0,1256
» isolato da ascesso femmonoso	0,0042	0,0262	0,1024
» » da litene di respola	0,0022	0,0028	0,1986
Proteus vulgaris	0,0020	0,0022	0,0020
» Zenkeri	0,0021	0,0023	0,0022
B. del tifo	0,0001	0,0001	0,0002
B. Cholè	0,0081	0,0081	0,0090
B. Prodigioso	0,0960	0,1016	0,1264
B. piocianico	0,0029	0,0027	0,0022
B. Sicile	0,0029	0,0016	0,0018
B. Radicalforme	0,0020	0,0017	0,0019
B. del carbonchio ematico	0,0019	0,0024	0,0019
B. della difterite difteride	0,0025	0,0026	0,0021
B. della pseudodifteride	0,0016	0,0014	0,0081
B. della difterite aviaria	0,0008	0,0012	0,0017
Spirito di Metchnikoff	0,0009	0,0009	0,0008
» Finkler Prior	0,0008	0,0008	0,0016
» Denike	0,0010	0,0009	0,0019
» del colera di Messaua	0,0012	0,0012	0,0019
» » del colera di Strasburgo	0,0020	0,0022	0,0021
B. dell'acido lattico	0,0019	0,0016	0,0012
B. del latte bleu	0,0020	0,0022	0,0023

Reazione della cultura

Reazione della cultura

Reazione della cultura

Reazione della cultura

Lasciando delle culture di B. del tifo e B. choli in brodo ippurico per più di un mese, nella cultura del choli fu riscontrata reazione acida e presenza di tracce di acido benzoico, nulla nella cultura di tifo.

Mi riserbo vedere se tale fatto può essere confermato impiegando culture recenti e se può aversi in un tempo più breve non parendomi di utilità pratica per la tanto quistionata diagnosi differenziale dei due bacilli di Erbert ed Enscherich, un fenomeno che abbisogna di più di un mese per prodursi.

Partendo dai microrganismi di cui aveva confermato la facoltà di decomporre l'acido ippurico ho voluto vedere se si avevano delle differenze dipendenti dalla virulenza, all'uopo adoperai culture di germi da poco isolati e saggiati su animali streptococchi della respola - stafilococchi - B. prodigioso. Ebbi:

	Dopo 24 ore	Dopo 48 ore	Dopo 56 ore	Dopo 96 ore
Stafilococco piogene aureo . . .	0.0102	0.1192	0.1980	0.1982
» » albo	0.0692	0.1082	0.1091	0.1092
» » citreo	0.0110	0.0806	0.1981	0.1984
Streptococco del Pasquale . . .	0.0082	0.0990	0.1020	0.1026
B. Prodigioso	0.0926	0.1482	0.1485	0.1492
Streptococco respola	0.0096	0.0220	0.0826	0.0842
» isolato da ascesso.	0.0019	0.0092	0.0896	0.0882

Dunque con culture virulenti si ottiene già dopo 24 ore una discreta quantità di acido benzoico e dopo 52 ore si è raggiunto il massimo di potere decomponente.

Partendo da vecchie culture in agar attenuate ed impiegando lo stesso brodo ippurico con lo stesso titolo ebbi:

	Dopo 24 ore	Dopo 48 ore	Dopo 52 ore	Dopo 96 ore
Stafilococco piogeno aureo . . .	0.0102	0.0102	0.1080	0.1820
» » albo	0.0092	0.0098	0.1092	0.1094
» » citreo	0.0010	0.0026	0.0696	0.0184
Streptococco del Pasquale. . . .	0.0072	0.0080	0.0142	0.1468
B. prodigioso	0.0074	0.0092	0.0128	0.1028
Streptococco di respola	0.0019	0.0026	0.0092	0.0098
Streptococco isolato da tempo da ascesso flemmonoso	0.0008	0.0024	0.0094	0.0092

Come si vede impiegando culture secche il potere decomponente del microorganismo viene ad essere attenuato e già dopo 96 ore non si è raggiunto il massimo di decomposizione e per gli stafilococchi della resipola anche dopo 96 ore la quantità di acido benzoico è minima e quasi trascurabile.

In fine ho voluto saggiare se l'ippurato sodico in quantità forte nel brodo ostacolasse lo sviluppo dei germi. Sino ad una quantità rispondente al 5 per 100 di acido ippurico i microorganismi si sviluppano rigogliosamente, purchè la reazione del mezzo di cultura al momento dello innesto si trovi neutra o leggermente alcalina.

* *

Dal complesso delle su esposte indagini parmi essere autorizzato a ritenere:

che la decomposizione dell'acido ippurico per mezzo dei microorganismi è da considerarsi come un fatto che non ha nulla a vedere colle fermentazioni alcaline, benchè possa essere prodotta da alcuni germi anche capaci di sdoppiare l'urea;

che dalla decomposizione si ottiene acido benzoico ed altri prodotti che non abbiamo curato di rintracciare, essendo stato nostro scopo di studiare quali microorganismi danno lo sdoppiamento della molecola della sostanza;

che i microorganismi capaci di scomporre l'acido ippurico appartengono ai cocci stafilococco piogene aureo, albo, citreo, streptococchi *creyepelatis*, streptococco del Pasquale, ed ai bacilli solo il *B. prodigioso*;

che il potere di sdoppiamento è più energico per culture fresche ed il massimo di sviluppo si ottiene al terzo giorno circa.







