



MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

DI UN RAPIDO PROCESSO

PER LA

COLORAZIONE DELLE CIGLIA

DI

ALCUNI MICRORGANISMI

NOTA

del

DOTT. ACHILLE SCLAVO

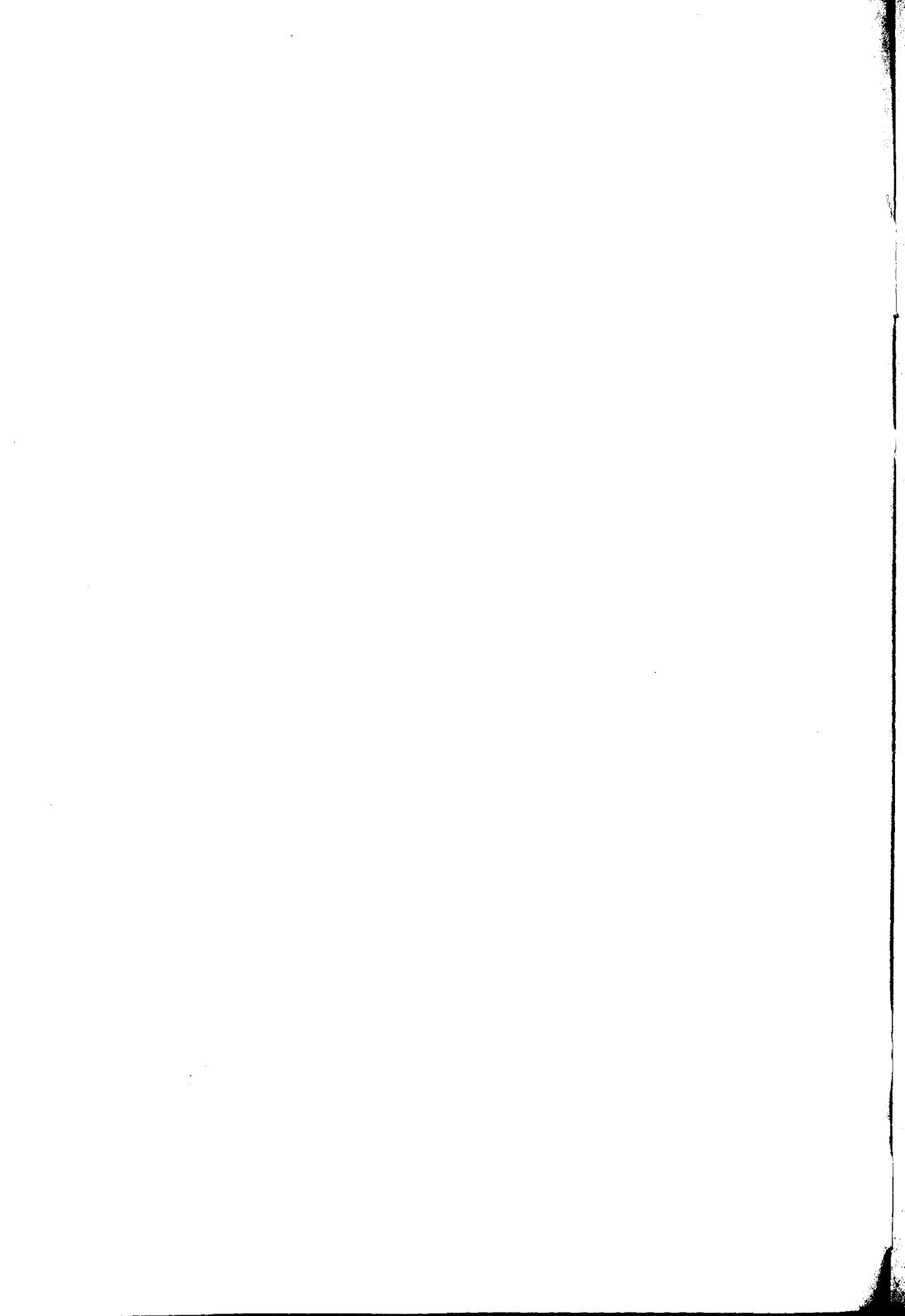
Reggente Capo del Laboratorio bacteriologico della Direzione di Sanità.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1893



MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

DI UN RAPIDO PROCESSO

PER LA

COLORAZIONE DELLE CIGLIA

DI

ALCUNI MICRORGANISMI

NOTA

da

DOTT. ACHILLE SCLAVO

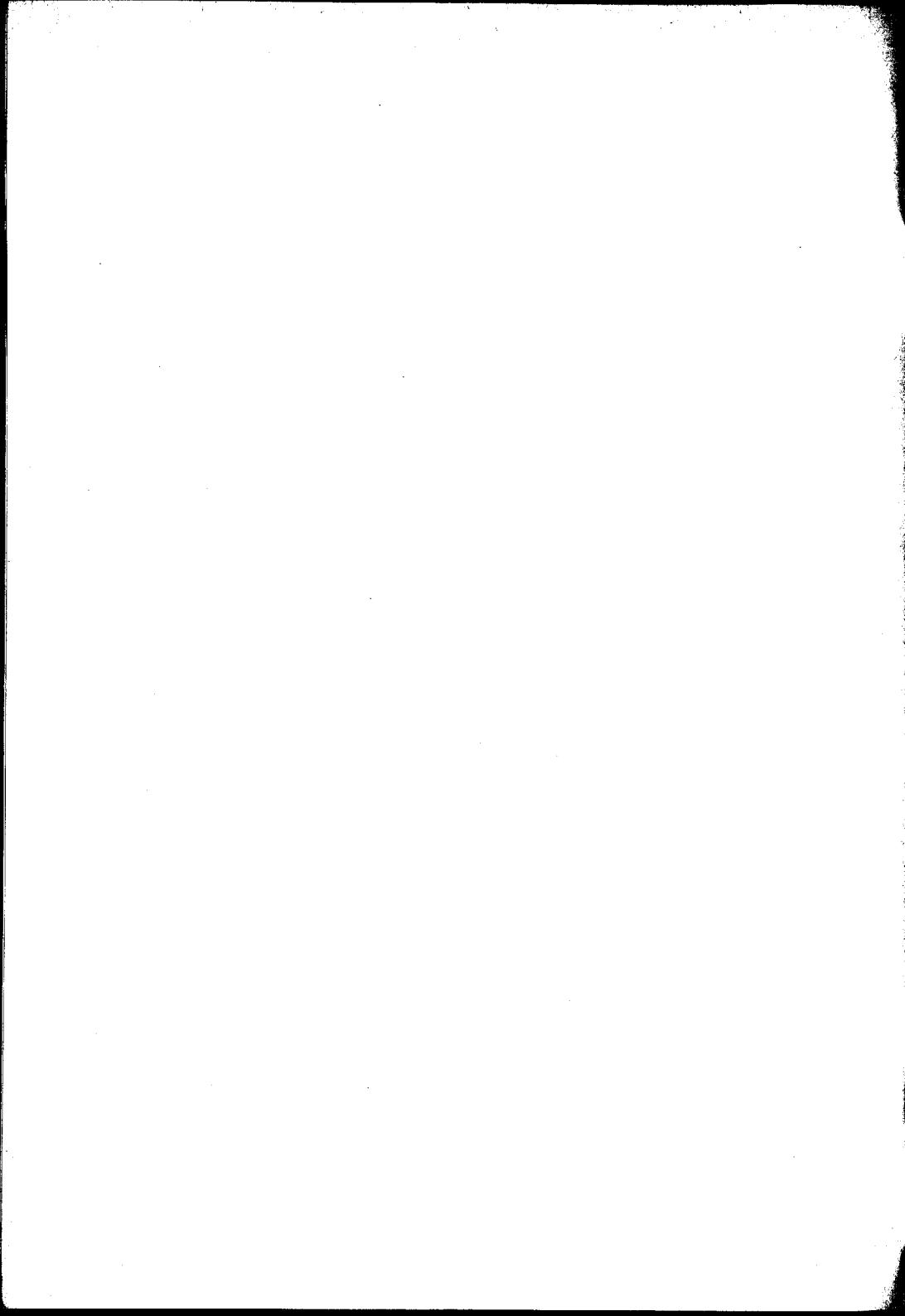
Reggente Capo del Laboratorio bacteriologico della Direzione di Sanità.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1893



DI UN RAPIDO PROCESSO
PER LA
COLORAZIONE DELLE CIGLIA DI ALCUNI MICRORGANISMI

NOTA

del

DOTT. ACHILLE SCLAVO

Reggente Capo del Laboratorio batteriologico della Direzione di Sanità

Già nelle opere dei primi studiosi di batteriologia si trovano accenni alla esistenza di ciglia in alcune specie di batteri.

Numerosi sono stati i tentativi per mettere bene in evidenza questi organi di locomozione dei batteri, e la bibliografia su tale argomento, raccolta con cura, può leggersi in una memoria che il dott. Alessandro Messea ha pubblicato su questa stessa *Rivista* (1).

Fra i diversi metodi proposti in questi ultimi anni per rendere visibili mediante colorazione le ciglia è stato specialmente il metodo di Loeffler quello che più venne apprezzato dai tecnici.

Il principio sul quale si fondava tale metodo, quale fu reso noto in una pubblicazione del 1887 (2), consisteva essenzialmente nel trattamento dei preparati con uno speciale mordente ferroso-tannico, il quale permetteva poi alle ciglia di tingersi quando veni-

(1) Contribuzione allo studio delle ciglia dei batteri e proposta di una classificazione per ALESSANDRO MESSEA. *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*. Vol. I, pag. 515.

(2) Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen im besondere ihrer Wimperhaare und Geisseln, LOEFFLER. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*. Vol. VI, pag. 209.

vano sottoposte all'azione di un liquido colorante a base di metil-violetto, o di bleu di metilene, o di fucsina, sciolti in acqua satura di anilina.

Se però questo metodo dava buoni risultati con alcuni batteri, non riusciva a tingere le ciglia di altri, donde una serie di nuove esperienze che condussero Loeffler a modificare il metodo primitivo (1).

Tale modifica consiste nell'adattare, mediante una soluzione allungata di idrato sodico o di acido solforico, la reazione del mordente alle diverse specie batteriche a seconda che esse producono nelle culture acidi od alcali.

Questo metodo di colorazione di Loeffler se si raccomanda per l'eccellenza dei risultati, richiede però, per la esecuzione, molta pratica ed abilità tecnica. Inoltre importa lungo tempo per la preparazione dei liquidi mordente e colorante, i quali poi facilmente si alterano.

Quali modificazioni del metodo di Loeffler furono da Trenkmann (2) raccomandati alcuni nuovi processi, mediante i quali la colorazione delle ciglia si otteneva ancora sottponendo per alcune ore i preparati all'azione dei mordenti prima che a quella dei bagni coloranti.

I mordenti adoperati erano tutti a base di tannini (acido tannico, infuso di catechù, soluzione di estratto di campeccio) e la loro azione veniva accresciuta con l'aggiunta di acido cloridrico, di fenolo, o di acido gallico. Subita la mordenzatura i preparati erano tinti con le soluzioni idro-alcooliche di alcuni colori di anilina.

Sarebbe pregiò di questi processi, a detta dell'autore, il non dar luogo a quei precipitati sui vetrini, che spesso tanto nuociono alla chiarezza dei preparati coloriti con il metodo di Loeffler.

Non riusci però a Trenkmann, con i suoi diversi processi, che di tingere le ciglia di alcuni batteri acquatici, mentre gli fallì del tutto, o quasi, la colorazione delle ciglia per quegli altri batteri mobili, che vivono sugli ordinari mezzi solidi di cultura nei laboratori.

(1) Weitere Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln bei den Bakterien. LOEFFLER. *Centraiblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*. Vol. VII, pag. 625.

(2) Die Farbung der Geisseln von Spirillen und Bacillen. TRENKMANN. *Centraiblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*. Vol. VI, pag. 433.

In una seconda comunicazione del settembre 1890 Trenkmann riferì sopra un altro processo, che egli crede possa servire per tingere le ciglia di tutti i batteri (1).

Il preparato viene doppiamente mordenzato prima per 6-12 ore in una soluzione di tannino al 2 %, contenente l' uno o il due per mille di acido cloridrico a seconda della specie bacterica, quindi per 1 ora circa con una soluzione acquosa satura di jodio; la colorazione è poi data alle ciglia ed ai batteri tenendo il preparato per altra $\frac{1}{2}$ ora in una soluzione di violetto di genziana in acqua di anilina.

Come si vede non si può certamente accusare di soverchia speditezza un tale metodo, che per nessuna ragione mi pare possa sostituire il metodo di Loeffler.

Nella seduta del 18 giugno 1892 della Società di Biologia di Parigi (2) Strauss rese conto di un altro metodo per la colorazione, allo stato vivo, delle ciglia di alcuni batteri mobili (Spirillo del colera, spirillo di Metchnikoff e spirillo di Finkler-Prior).

Si otterrebbe la colorazione delle ciglia nel seguente modo.

Ad una goccia di cultura in brodo di 1-3 giorni si aggiunge sul porta-oggetti un'altra piccola goccia di liquido di Ziehl, diluito con 3-4 parti di acqua. Se, collocato il copri-oggetto, si esamina prontamente e con un buon obbiettivo il preparato, si riuscirebbe, tra i diversi batteri, a scorgerne alcuni mobilissimi con un ciglio ad una estremità tinto in modo ben evidente.

Io non so con quali risultati sia stato da altri provato questo metodo di Strauss, per conto mio debbo dire di averlo applicato ripetutamente invano per la colorazione delle ciglia dei tre spirilli sopra enumerati, sebbene avessi a mia disposizione un eccellente obbiettivo apocromatico di Zeiss e mi servissi sempre di liquido di Ziehl preparato di fresco.

Da quanto ho sopra riferito risulta intanto che ancora fa difetto in batteriologia un metodo, il quale in modo sicuro valga a colorire con facilità e con prontezza le ciglia dei batteri.

Si è per ciò che io mi decido a rendere noto i risultati di alcune mie prove di colorazione rapida delle ciglia, sebbene il processo

(1) Die Färbung der Geisseln von Spirillen und Bacillen. II Mitteilung von TRENKMANN. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*. Vol. VIII, pag. 385.
(2) *Semaine Médicale*, 1892, pag. 252.

che io propongo, non serva che per un certo numero di batteri cigliati.

Il liquido colorante, a cui dopo numerose prove ho dato la preferenza, è a un di presso quello di Ehrlich, ottenuto sciogliendo a saturazione fucsina polverizzata in acqua di anilina e filtrando di volta in volta la quantità necessaria in vetrino da orologio (1).

Tale liquido è facilmente alterabile ed è bene rinnovarlo almeno ogni due giorni.

I preparati, prima di essere portati nel bagno colorante, sono successivamente mordenzati in due liquidi, il primo dei quali è fatto sciogliendo 1 gramma di acido tannico in 100 cme. di alcool al 50 %, ed il secondo è costituito da una soluzione acquosa di acido fosfo-tungstico al 5 %. Entrambi questi mordenti si conservano inallerali per un tempo indefinito.

La colorazione delle ciglia di alcuni batteri (*proteus vulgaris*) si può anche ottenere ricorrendo all'azione di uno solo dei mordenti cioè dell'acido fosfo-tungstico; per altri batteri è invece indispensabile anche il trattamento con il liquido tannico; dallo impiego però di entrambi i mordenti si hanno sempre risultati migliori che non facendo uso del solo acido fosfo-tungstico.

Buone colorazioni non si ottengono se non quando il materiale è disteso con la maggior cura sui vetrini copri-oggetti. Questi, che è bene sieno nuovi, devono essere tenuti per alcuni minuti in un acido minerale concentrato, lavati poi abbondantemente con acqua ordinaria ed in ultimo sciacquati in acqua distillata; si conservano così puliti in alcool assoluto.

Su tali vetrini, bene asciugati, si porta con l'ago di platino una goccia d'acqua distillata della grandezza di una lenticchia, ed in quest'acqua viene poi sospeso il materiale batterico da colorirsi.

Nelle mie ricerche mi sono sempre servito di culture su agar e di età non superiore alle 24 ore. Con l'ago di platino, ben raffreddato, toccavo la cultura superficialmente e portando poscia la punta dell'ago a contatto di alcune gocce di acqua riunite su di un solo copri-oggetto, con dolci movimenti favorivo il distacco dei batteri e l'uniforme distribuzione loro nel liquido.

(1) Per alcuni batteri acquatili la colorazione delle ciglia si può pure avere con il liquido di Ziehl.

Trasportavo un'ansa di tale prima diluzione di batteri in un'altra grossa goccia di acqua, e da questa prendevo poi, pure con l'ansa, il materiale per le diverse gocce già poste sui copri-oggetti.

Mentre avviene l'evaporazione dell'acqua i vetrini devono essere riparati dal pulviscolo atmosferico tenendoli sotto una campana; che se in queste condizioni il prosciugamento si facesse con soverchia lentezza è conveniente collocare pure sotto la campana una vaschetta con acido solforico concentrato.

Essiccati completamente i vetrini, senza passarli alla fiamma per la fissazione del preparato, procedevo alla colorazione sottoponendoli al trattamento che si può brevemente così riassumere:

1.^o Il vetrino sia tenuto per un minuto primo nel mordente tannico;

2.^o Si lavi con acqua distillata;

3.^o Si lasci un minuto primo nella soluzione fosfo-tungstica;

4.^o Si lavi *diligentemente* in acqua distillata;

5.^o Si porti nel bagno colorante leggermente riscaldato, dove deve rimanere per 3-5 minuti primi;

6.^o Si lavi con acqua distillata;

7.^o Si asciughi fra carta, si spolveri con un pennellino e si monti in balsamo sciolto in xilolo.

La ricerca delle ciglia nel campo del microscopio va fatta con un buon obiettivo ad immersione, e l'osservazione deve essere specialmente diretta al margine della goccia essiccata, dove specialmente si sono raccolti, sin dall'inizio del prosciugamento, i batteri mobili.

Tale margine nei preparati di alcuni batteri (*proteus vulgaris*) è segnato dalla presenza di numerose ciglia distaccate e talora riunite in piccoli fascetti, simili a quelli che p. es. si vedono nel 5^o fotogramma annesso alla seconda memoria di Loefller sulla colorazione delle ciglia.

Mi pare degno di speciale rimarcò il fatto che con il processo sovraesposto si ottengono preparati liberi d'ogni precipitato, purchè si seguano tutte le prescrizioni nella distribuzione dei batteri sui vetrini.

I batteri coi quali ebbi le migliori colorazioni di ciglia sono: il *bacillus cyanogenus* (del latte bleu), il *proteus vulgaris*, il *proteus mirabilis*, il *bacillus megalérium*, il *bacillus mesentericus vulgaris*.

Con il bacillo del tifo ottenni risultati incostanti, riusci cioè talora a tingere le ciglia in modo evidentissimo, altre volte non ebbi che colorazioni estremamente pallide.

Di cinque bacilli tifo-simili mobilissimi, sui quali ho esperimentato, tre soli si mostrarono forniti di ciglia bene colorabili con il mio processo; non mi riusci di scorgere ciglia nei preparati degli spirilli di Koch, di Metchnikoff, di Finkler-Prior, di Deneke, e del *bacterium coli commune*.

Bellissime ciglia si vedono invece nei preparati fatti con acqua, nella quale per alcuni giorni sia stato lasciato in infusione del materiale organico vegetale (fieno, paglia, cavoli ecc.); qui, oltre alle ciglia dello *Spirillum Undula*, quasi sempre presente, e di altri moltissimi batteri, spiccano coloratissimi nel campo del microscopio i flagelli e le ciglia di alcuni infusori.

Per ciò che concerne infine la durabilità dei preparati, posso dire che in quelli, che io conservo da più di 4 mesi, nulla si è perduto della primitiva tinta delle ciglia.

Roma, 13 novembre 1892.



