

Isolamento in Argentina di un ceppo di leptospira appartenente al serotipo *pyrogenes*

Leptospire appartenenti al serogruppo *pyrogenes* sono state isolate raramente nelle Americhe. È segnalata la presenza dei serotipi *zanoni* e *myocastoris* negli Stati Uniti^{1,2}, *abramis* a Giamaica ed a Panama^{3,4} e *alexii* a Panama ed a Portorico^{5,6}. Nell'America Meridionale questo serogruppo è stato finora del tutto sconosciuto.

Per questa ragione ci è parso interessante segnalare l'isolamento, ottenuto in Argentina, di un ceppo appartenente al serotipo *pyrogenes*, che fa parte appunto di tale serogruppo.

Il ceppo, da noi denominato «Juanes», è stato isolato in terreno di Korthof insemizzato con il sangue prelevato da un cane ammalato, che era stato portato, per accertamenti diagnostici, alla Cattedra di Clinica medica e chirurgica dei piccoli animali della Facoltà di Scienze Veterinarie dell'Università di La Plata. Si trattava di un animale bastardo, di sesso maschile, di circa 7 anni d'età. L'animale, che aveva frequentato di recente località ricche di acqua stagnante, si era ammalato con la seguente sintomatologia: vomito, inappetenza da circa tre giorni, pelame opaco, disidratazione, congiuntivite, andatura inceppata, iperestesia nella regione renale, dermatite prepuziale, evidente tonsillite, alitosi, temperatura di 38,3°C.

Il siero dell'animale ha agglutinato ad 1:100 il ceppo Salinem (serotipo *pyrogenes*). Alcuni giorni più tardi la prova fu ripetuta ed il titolo risultò più elevato.

L'urina del cane, inocolata in cavia, non ha dato risultato positivo. Gli esami di laboratorio hanno dato i seguenti risultati:

Urina: reazione acida

albumina: 0,80 g ‰

pigmenti biliari: assenti

sedimento microscopico: alcune cellule renali, abbondanti cilindri granulosi, numerosi spermatozoi

Sangue: Emoglobina: 40 ‰

Eritrosedimentazione: 1/2 ora 30 mm

1 ora 60 mm

Emazie: 6.550.000 per mm³

Leucociti: 12.000 per mm³

Formula leucocitaria: neutrofilii 81 ‰, eosinotili 2 ‰, basofili 1 ‰, linfociti 14 ‰, monociti 2 ‰.

Con il ceppo isolato è stato preparato nel coniglio un siero immune che è stato saggiato con i ceppi di riferimento di numerosi serotipi della collezione del Centro di Riferenza per le leptospire dell'OMS/FAO, presso l'Istituto Superiore di Sanità. Il siero immune, che aveva per il ceppo omologo il titolo di 1:30.000, ha agglutinato a valori elevati (1:10.000) i ceppi Salinem e Zanoni. Alcuni altri ceppi sono stati

agglutinanti soltanto a basso titolo (1:100-1:500). Prove di adsorbimento crociato delle agglutinine sono state eseguite tra i ceppi « Juanes » e quelli « Salinem » (sero tipo *pyrogenes*) e « Zanoni » (serotipo Zanoni), impiegando la tecnica suggerita dal Gruppo di studio delle leptospire dell'OMS/FAO.

I risultati ottenuti sono esposti nella Tab. 1, e dimostrano con evidenza che il ceppo « Juanes » appartiene al serotipo *pyrogenes*.

TABELLA 1

Titoli di agglutinazione nelle prove di adsorbimento crociato delle agglutinine anti Juanes, anti Salinem e anti Zanoni.

CEPPI	S I E R I						
	Anti Juanes			Anti Salinem		Anti Zanoni	
	Non adsorbito	Adsorbito con		Non adsorbito	Adsorbito con Juanes	Non adsorbito	Adsorbito con Juanes
		Salinem	Zanoni				
Juanes	1:1000	< 1:10	1:320	1:1000	< 1:10	1:1000	< 1:10
Salinem	1:1000	< 1:10	—	1:1000	< 1:10	—	—
Zanoni	1:1000	—	1:10	—	—	1:1000	1:320

Questo isolamento è interessante non soltanto perchè si tratta del primo reperto del serotipo *salinem* nelle Americhe ed il primo del serogruppo *pyrogenes* nell'America Meridionale, ma anche perchè leptospire del tipo *salinem* sono state finora isolate soltanto dall'uomo o da animali selvatici, ma mai dal cane o da altri animali domestici. È possibile che in Argentina il serotipo *pyrogenes* sia abbastanza diffuso nel cane. Infatti ricerche serologiche eseguite colà da AGUIRRE, DORTA & DE GRIECO⁶ su 54 sieri di cani sospetti, hanno mostrato in 10 casi, a pari titolo, la presenza di anticorpi sierici per i tipi *canicola* e *pyrogenes*.

Summary (*Isolation in Argentina of a leptospira strain belonging to the serotype pyrogenes*). The isolation, from the blood of a sick dog, of a leptospira strain belonging to the serotype *salinem*, was reported. This is the first finding of this serotype in America and the first report of leptospirae belonging to the serogroup *pyrogenes* in Southern America (La Plata).

13 maggio 1969.

WALTER G. AGUIRRE

Catedra de Microbiologia Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, La Plata, Argentina

IRENE SILVA

Ospite dei Laboratori di Microbiologia dell'Istituto Superiore di Sanità

- ROTH, E. E. Rif. da *Leptospiral Serotype Distribution Lists, CDC* 1966.
- ROTH, E. E., W. V. ADAMS, B. GREER, G. E. SANFORD, M. MOORE & K. NEWMAN. *Public Health Rept.*, **78**, 727 (1963).
- GRANT, I. S. Rif. da *Leptospiral Serotype Distribution Lists, CDC* 1966.
- GALE, N. B. Rif. da *Leptospiral Serotype Distribution Lists, CDC* 1966.
- ALEXANDER, A. D. *Bull. World Health Organ.*, **23**, 113 (1960).
- AGUIRRE, W. G., G. T. DORTA & L. P. DE GRIECO. *Rev. Fac. Cien. Vet. La Plata*, **10**, 57 (1968).

Presenza di *Simulium damnosum* Th. (Diptera - Simuliidae) in Yemen (*)

Il problema dei simulidi vettori di oncocercosi in Yemen sorse dopo che Fawdry¹ descrisse nell'ex Protettorato di Aden una dermatite nota localmente con il nome arabo di « Sowda » ed imputabile a microfilarie del genere *Oncocerca*; i malati visitati da Fawdry in Aden provenivano tutti dallo Yemen mentre non era stato riscontrato alcun caso insorto tra la popolazione autoctona dell'ex Protettorato che attualmente costituisce la Repubblica Popolare dello Yemen del Sud. Era presumibile quindi che il Simulide vettore dovesse trovarsi in Yemen.

Una prima inchiesta in merito svolta da GILLIES² permise di segnalare la specie ornitofila *Simulium ruficornis* Macq. in un torrente sulle montagne presso Mukeiras ed in un altro che scorre in una stretta valle e tributario del Wadi Yeshbun, presso Sa'id, località facenti parte entrambe dell'ex Protettorato e situate ai margini dello Yemen.

Successivamente venne pubblicato da GASPARI³ un lavoro riguardante la presenza della « Sowda » in Yemen e dopo una dettagliata ed ampia descrizione della malattia l'A. riferisce che le ricerche di Simulidi da lui effettuate in varie località nei dintorni di Taiz (Yemen) hanno sempre dato esito negativo.

L'anno successivo CROSSKEY & SMITH⁴ scoprirono *Simulium dentulosum* Roub. in un'altra località dell'ex Protettorato di Aden sita anche essa presso i confini dello Yemen. In questo caso trattavasi di una specie ematofaga ma non antropofila, caratteristica della fauna della Regione Etiopica, per cui il suo rinvenimento venne considerato dai due AA. come indicativo della possibilità che all'interno dello Yemen potesse esistere qualche focolaio relitto di *Simulium damnosum*, la specie comunemente nota come vettrice dell'oncocercosi umana in tutta l'Africa. Gli AA. avanzano anche la ipotesi che *Simulium dentulosum* possa essere in qualche modo implicato nella trasmissione dell'oncocercosi nella popolazione araba pur trattandosi di specie non incriminata in Africa come vettrice di *Oncocerca* e concludono affermando che il problema dell'oncocercosi in Yemen si presenta come un autentico enigma.

In un lavoro dedicato essenzialmente al trattamento chirurgico della « Sowda » GASPARI⁵ riferisce l'opinione di NAGATY⁶, il quale due anni prima aveva compiuto una survey per l'oncocercosi in Yemen, che tale malattia non fosse endemica in questo Paese ritenendo che i casi descritti da Fawdry potessero essersi infettati in Africa.

Anche la segnalazione di *Simulium medusaeforme* (s.l.) fatta da LEWIS & BURGESS⁷ sugli esemplari raccolti dal Colonnello Moss-Blondell a Jebel Radfan si riferisce sempre al territorio dell'ex Protettorato di Aden.

(*) La presente ricerca è stata eseguita sotto l'alto Patronato del Ministero della sanità della Repubblica Araba dello Yemen.

Nel corso della pratica quotidiana di due di noi presso l'Ospedale Civile di Taiz (Yemen) sono capitati all'osservazione numerosi pazienti affetti da « Sowda ». Tra tutti ne sono stati selezionati nove che certamente non erano stati precedentemente sottoposti ad alcun trattamento e che sicuramente non erano mai usciti dai confini dello Yemen e ad essi è stato prelevato un frammento di cute con il relativo sottocutaneo. In sette di questi l'esame microscopico del centrifugato della soluzione fisiologica nella quale i frammenti di cute erano stati lasciati per due ore alla temperatura di 37°C ha messo in evidenza la presenza di microfilarie del genere *Onchocerca*.

Accertata così la natura oncocercotica della malattia e confermata la sua esistenza in Yemen si presentava il problema dell'identificazione del Simulide vettore.

Nel corso di ricerche in questo senso, sono stati da noi reperiti nella Regione di Taiz (Yemen) due focolai di *S. damnosum*: uno nello Wadi al Barh poco prima della sua confluenza nello Wadi Resian a 56 Km da Taiz ed alla quota di m 470 sul livello del mare (s.l.m.) e l'altro nello Wadi Hagma a 75 Km ed alla quota di m 520 s.l.m. Nel primo focolaio le acque erano poco profonde e la velocità di corrente relativamente lenta, nel secondo le acque erano poco profonde e la velocità di corrente moderata. In entrambi i casi gli esemplari raccolti erano attaccati ai sassi del fondo e la temperatura dell'acqua era di 31°C alle ore 12,45 nel primo focolaio e di 32°C alle ore 15 nel secondo.

Una successiva ricerca eseguita negli stessi focolai a distanza di circa tre mesi ha dato esito al ritrovamento di una pupa di *S. damnosum* nello Wadi al Barh.

Nello Wadi Hagma, invece, numerose pupe di *S. damnosum* sono state ritrovate sia attaccate ai sassi del fondo che a foglie sommerse.

Nel primo focolaio le pupe di *S. damnosum* erano associate a quelle di *S. ruficornis* e di *Simulium urundiense* Fain. Nel secondo focolaio invece le pupe di *S. damnosum* erano associate con quelle di *S. ruficornis*, di *Simulium hargreavesi* Gibbins e di *S. urundiense*.

In entrambi i focolai le pupe di *S. damnosum* si presentavano con le caratteristiche di una specie « non dominante » ma semplicemente « accompagnatrice » delle altre.

Attualmente si tende a considerare *S. damnosum* come un complesso di specie biologiche con differenti abitudini trofiche⁸ e noi non sappiamo se gli esemplari collezionati nella Regione di Taiz appartengano o meno ad una forma antropofila. Tuttavia l'ipotesi che *S. damnosum* sia il vettore dell'oncocercosi detta « Sowda » appare, fino a questo momento, la più plausibile; il fatto che entrambi i focolai dove sono state reperite le pupe di *S. damnosum* si trovino in zone nelle quali la « Sowda » si presenta in forma endemica ci sembra essere una convalida di questa ipotesi.

Non si può escludere però che possa avere una certa importanza anche *S. hargreavesi*. Questa specie, il cui riconoscimento allo stadio pupale è molto semplice a causa della caratteristica biforcazione di un filamento respiratorio (cfr. FREEMAN & DE MEILLON⁹, Fig. 58 a pag. 192), sembra infatti estremamente abbondante in taluni focolai della Regione di Taiz. Quanto a *S. urundiense* non se ne conoscono le preferenze alimentari, mentre una specie ad essa strettamente affine: *Simulium adersi* Pomeroy, antropofila secondo FREEMAN & DE MEILLON⁹, sarebbe invece ornitofila secondo le recenti osservazioni di DISNEY & BOREHAN¹⁰.

Il problema della specie vetrica richiede comunque ulteriori indagini che ci ripromettiamo di svolgere successivamente come pure è nostra intenzione di fornire una illustrazione quanto più completa possibile di tutti i Simulidi collezionati nella

regione di Taiz. Ci limitiamo per il momento a riportare un'illustrazione dei filamenti respiratori pupali (Fig. 1).

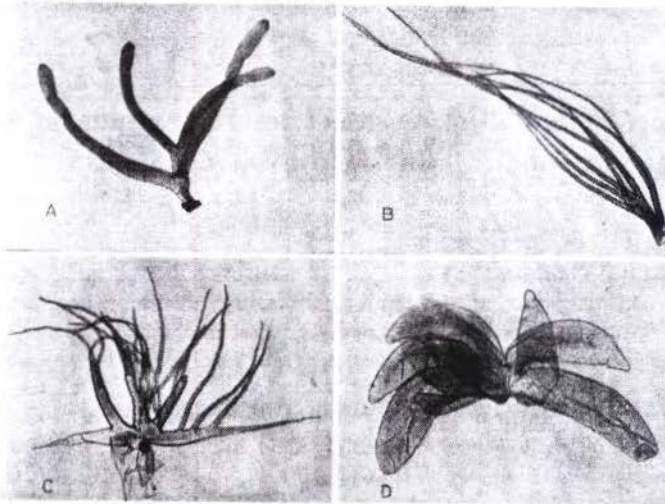


Fig. 1. — Filamenti respiratori pupali di *Simulium ruficorne* (A), *Simulium urundiense* (B), *Simulium hargreavesi* (C), *Simulium damnosum* (D).

A quanto ci consta è questa la prima segnalazione di Simulidi in Yemen ed in particolare la prima circa la presenza di *S. damnosum* in tutta la Penisola Arabica.

Summary (*Presence of Simulium damnosum* Th. (Diptera-Simuliidae) in Yemen). — *Simulium damnosum* Th. was collected in two localities of Yemen: Wadi al Barh and Wadi Hagma (56-75 Km from Taiz-city). In both localities «Sowda» is an endemic disease. *S. damnosum* was associated with *Simulium ruficorne* Macq., *Simulium hargreavesi* Gibb. and *Simulium urundiense* Fain.

26 maggio 1969.

BRUNO MERIGHI e ANTONINO E. PARRINELLO
Ministero degli Affari Esteri - Direzione Generale Relazioni
culturali con l'estero - Assistenza Tecnica Italiana in Yemen
LEO RIVOCSECCI
Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Parasitologia

- ¹ FAWDRY, A. L. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **51**, 253 (1957).
- ² GILLIES, M. T. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **52**, 475 (1958).
- ³ GASPARINI, G. *Arch. It. Sci. Med. Trop. Parasitol.*, **43**, 635 (1962).
- ⁴ CROSSKEY, R. N. & S. A. SMITH. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **57**, 234 (1963).
- ⁵ GASPARINI, G. *Dermatologia Tropica*, **3**, 43 (1964).
- ⁶ NAGATY, H. T. *A Survey of malaria, bilharziasis, onchocerciasis and other parasitic infection in Yemen*. WHO/EM/EPID. 9. III. 1963.
- ⁷ LEWIS, D. J. & R. H. BURGESS. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **61**, 465 (1967).
- ⁸ LEWIS, D. J. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **62**, 19 (1968).
- ⁹ FREEMAN, A. L. & B. DE MEILLON (1953). *The Simuliidae of the Ethiopian Region*. British Museum of Natural History, London 1953.
- ¹⁰ DISNEY, R. H. & P. F. BOREHAN. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **63**, 286 (1969).

Nerve Growth Factor effect on fatty acids in mouse sympathetic ganglia during development

Morphological studies have shown to LEVI-MONTALCINI¹ a striking hyperplastic and hypertrophic response of the sympathetic ganglia after injection of the *nerve growth factor* into newborn mice. However, no biochemical indication for the mode of action of this protein could be obtained from this particular and unique phenomenon. In previous experiments D'AGNOLO, FOPPEN & LIUZZI² have shown that the *nerve growth factor* induces *in vitro* remarkable changes in the lipid pattern and metabolism of embryonic sensory ganglia. After 4 hr of incubation in presence of NGF there is a marked increase of the triglycerides; moreover gaschromatographic analysis of the fatty acids has shown that the NGF leads to a relative shift of long-chain fatty acids towards shorter fatty acids, like myristic acid³. Since long-chain fatty acids play an important role in the nervous system⁴ a thorough investigation on the *in vivo* effects of NGF on the fatty acid pattern of sympathetic ganglia of growing mice was carried out.

One-day-old Swiss albino mice were treated daily with subcutaneous injections of 20 μ g of NGF (*) till the tenth day, followed by intraperitoneal injections of 20 μ g each day till the end of the experiments. Control animals were injected daily with the same volume of saline. For each experiment treated and control animals were chosen from the same litter. After sacrifice the sympathetic ganglia were immediately explanted and washed in cold saline solution. Homogenizations were carried out on samples of a couple of ganglia in 1 ml of a chloroform-methanol (2 : 1, v/v) mixture. Lipid material was extracted according to FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY⁵. Fatty acids after hydrolysis and extractions according to LIPSKY & LANDOWNE⁷ were methylated in methanol containing 3% (v/v) of concentrated sulphuric acid, refluxing the reaction mixture for 3 hr. The methylated fatty acid esters were separated by gas-liquid chromatography on a column, 300 cm long and 2.5 mm of internal diameter, packed with Chromosorb W (80-100 mesh). The apparatus used was a Perkin-Elmer 800 gas-chromatograph; the column temperature was 210°C and the nitrogen flux was 40 ml/min.; a flame ionisation detector was utilised. The chromatographic column was calibrated with a mixture of known fatty acid methyl esters.

In control experiments (Table 1) the relative ratios of short-chain fatty acids (C_{12} to C_{16}) decreased slowly during development, while on the contrary long-chain fatty acids increased; C_{20} -acids and C_{22} -acids increased from 13% at ten days to 28% at 60 days, while C_{24} -acids increased from 2% to 9%. Especially the high percentages of C_{24} -acids are very interesting, as these compounds are present in sphin-

(*) NGF was prepared by the Wellcome Research Foundation (Beckenham, Kent, England) as batch no. VII/12 with a biological activity⁸ of approximately 1.5×10^7 BU/ μ g.

TABLE I.

Total fatty acid composition of mouse cervical ganglia.

Days	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Fatty acid											
12:0	1.3	1.5	1.8	2.8	3.1	1.2	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
14:0	7.5	6.8	5.0	4.2	5.0	4.0	3.1	4.2	4.3	3.0	3.4
14:1	1.8	2.6	3.7	1.6	2.3	1.8	0.8	1.5	1.2	1.0	—
16:0	30.5	19.4	22.2	22.2	14.7	18.7	14.4	10.8	12.0	16.5	15.2
16:1	7.5	4.0	3.7	3.5	5.5	3.5	5.0	4.0	3.1	2.5	1.5
18:0	18.4	22.2	16.7	16.0	11.5	11.2	12.3	12.3	16.2	15.0	13.0
18:1	18.1	18.7	17.0	14.5	10.4	14.4	15.8	18.1	17.3	14.8	13.5
18:2	1.2	3.3	2.9	4.2	8.3	4.8	6.2	4.4	4.5	5.7	9.6
18:3	—	3.2	3.7	3.8	4.6	3.4	2.7	3.7	3.0	3.9	5.5
20:1	2.5	5.0	9.9	8.5	8.0	10.4	13.5	9.6	11.2	9.7	12.9
20:2	3.4	2.6	6.3	5.5	7.7	5.5	6.2	6.5	3.9	4.3	3.0
22:0	1.2	1.9	—	2.0	1.5	2.0	0.5	—	—	—	—
22:1	3.3	1.0	1.5	2.3	1.6	2.4	2.0	1.3	1.2	0.9	0.6
22:2	2.7	1.9	1.2	2.2	8.2	8.4	10.0	15.6	11.7	12.5	11.4
24:0	1.5	4.9	3.1	5.6	3.7	4.2	3.9	5.3	7.0	6.0	5.9
24:1	0.6	1.0	0.7	0.6	2.5	2.4	2.4	1.9	1.1	2.0	1.7
24:2	—	—	1.0	0.9	1.2	0.6	0.6	0.8	0.5	0.7	0.9

The values, expressed in % of total fatty acid methyl esters, are the average of three analyses. Unreported values account for less than 0.5%.

gomyelin, cerebrosides and sulphatides: the complex lipids which are formed in the cells and axon membranes during this period of development.

No clear changes of the short-chain fatty acids were observed in NGF-treated mice (Table 2), but it was possible to demonstrate the typical growth effect caused by this protein¹: total values of about 40% were found for these acids from the tenth till the 60th day of treatment, while C₁₈-, C₂₀-acids and C₂₂-acids showed only slight fluctuations and the C₂₄-acids were almost completely absent. This last result was the most impressive and repeats exactly in 60-days-old differentiated cells the results which were obtained with embryonic cells cultured *in vitro*³.

Other interesting observations for the study on the mode of action of NGF can be made if one compares the fatty acid pattern of growing mice during NGF-treatment. Generally, the C₁₂- and C₁₄-fatty acids in NGF-experiments are higher than in control experiments, whereas the C₁₆-acids are equal or only slightly lower. Other differences can be observed in the C₂₀-, C₂₂-group of fatty acids. During the first 25 days of growth the sympathetic ganglia of NGF-treated animals contain relatively more of these fatty acids than their normal brothers, but after that the situation changes. Another result was that during the whole period of growth there was a general trend towards a higher level of saturation of the fatty acids in the ganglia upon NGF-treatment.

It is quite significant that long-chain fatty acids were not detected beginning from the early stages of mouse growth. Such a result might be explained as a NGF-

TABLE 2

Total fatty acid composition of mouse cervical ganglia after NGF treatment.

Days	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Fatty acid											
12:0	3.6	3.4	2.8	1.9	1.1	1.0	1.9	1.7	1.6	2.9	3.4
14:0	15.8	8.9	5.7	5.5	6.0	6.0	7.7	9.8	7.4	5.4	11.4
14:1	0.8	2.3	1.4	1.0	1.4	1.9	2.2	1.3	1.1	2.1	2.2
16:0	30.8	27.9	24.8	24.0	23.4	21.5	20.7	21.2	22.7	21.8	20.9
16:1	7.5	6.5	4.7	6.9	6.8	6.3	6.2	5.3	4.0	8.4	6.0
18:0	13.1	12.6	13.5	13.8	15.7	18.0	19.3	19.5	19.8	16.3	19.8
18:1	9.6	5.4	6.3	5.8	8.9	12.2	9.6	7.1	10.4	13.8	8.8
18:2	2.0	1.5	1.9	4.4	5.1	3.2	4.9	5.4	3.2	3.1	6.8
18:3	0.8	1.2	3.3	1.4	5.2	4.4	4.0	4.3	5.6	3.8	1.8
20:1	10.2	15.6	15.7	18.3	11.0	12.0	14.7	18.1	16.5	15.6	13.4
20:2	0.6	5.1	5.0	3.6	5.8	4.6	3.3	1.6	3.9	3.7	2.7
22:0	1.0	1.5	2.5	1.5	—	—	—	—	—	—	—
22:1	—	2.0	2.3	2.4	1.9	2.2	1.0	2.6	0.8	1.0	—
22:2	5.0	5.5	7.8	7.4	6.6	5.7	3.6	1.9	1.9	1.9	1.7
24:0	—	1.5	2.2	1.7	—	—	—	—	—	—	—
24:1	—	0.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24:2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

The values, expressed in % of total fatty acid methyl esters, are the average of three analyses. Unreported values account for less than 0.5%.

inhibition on the chain lengthening of fatty acids, which fact however is rather unexplainable from the physiological point of view. But, even if a functional explanation for the long-chain fatty acid pattern changes provoked by this protein could not be inferred from the present data, unquestionably the fatty acid composition of the sympathetic ganglia obtained with the *nerve growth factor* is significantly different from that obtained in the normal ganglia³.

The authors are indebted to Prof. L. Boniforti, who has permitted them to make use of the GLC-apparatus. This work was supported in part by the Consiglio Nazionale delle Ricerche.

June 27, 1969.

ANTONIA LIUZZI, GIULIANO D'AGNOLO
and FREDRIK H. FOPPEN
*Department of Biological Chemistry
and Center of Neurobiology*

¹ LEVI-MONTALCINI, R., *Harvey Lectures*, **60**, 217 (1966).

² D'AGNOLO, G., F. H. FOPPEN & A. LIUZZI, *Biochem. J.*, **112**, 541 (1969).

³ D'AGNOLO, G., F. H. FOPPEN & A. LIUZZI, *Brain Res.*, **13**, 620 (1969).

⁴ O'BRIEN, J. S. & E. L. SAMPSON, *J. Lipid Res.*, **6**, 545 (1965).

⁵ COHEN, S., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1129 (1959).

⁶ FOLCH, J., M. LEES & G. H. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).

⁷ LIPSKY, S. R. & R. A. LANDOWNE, *Methods in Enzymology*, Vol. VI, Academic Press, New York 1963, p. 513.

Osservazioni sul ciclo di sviluppo di *Miyagawanella abortus ovis*

L'agente causale dell'aborto della pecora venne isolato per la prima volta da STAMP¹ in Scozia nel 1950 e in seguito da vari ricercatori²⁻⁴. Il virus che appartiene al gruppo psittacosi-linfogranuloma è stato molto studiato dal punto di vista della patologia, della trasmissione, della immunità e profilassi. Oltre che nella pecora, determina l'aborto nel coniglio e nel ratto; inoculato sperimentalmente per via nasale nel topo, causa una polmonite. STAMP⁵ ha descritto lo sviluppo del virus nella membrana corioallantoidea di uovo embrionato di pollo; poichè il sacco vitellino dell'uovo rappresenta la via di elezione per l'isolamento e la coltura del virus, ne abbiamo studiato il ciclo di sviluppo in questo substrato.

Metodi. — Il materiale di partenza era costituito da una membrana di sacco vitellino infetta con *Miyagawanella abortus ovis*. Per le prove descritte nella nota venne allestito uno stock di virus inoculando 0,2 ml di sospensione di membrana infetta al 10 % in saccarosio-glutammato (SPG)⁶, contenente 5000 µg/ml di streptomina, nel sacco vitellino di uova embrionate di pollo in 6^a giornata d'incubazione. Le membrane risultate positive (per la presenza di corpuscoli elementari all'esame microscopico, presenza ulteriormente confermata dalla specificità delle lesioni polmonari ottenute in topini inoculati con lo stesso materiale) venivano fissate in Bouin per circa 30 min e poi incluse in paraffina secondo la normale tecnica istologica. Le sezioni ottenute venivano colorate con il metodo di Giemsa, protraendo il tempo di decolorazione in alcool assoluto, per evidenziare meglio gli stadi di sviluppo del virus.

Risultati. — Da un punto di vista strutturale la membrana vitellina risulta costituita da uno strato di cellule piatte basali su cui s'impiana uno strato di cellule a

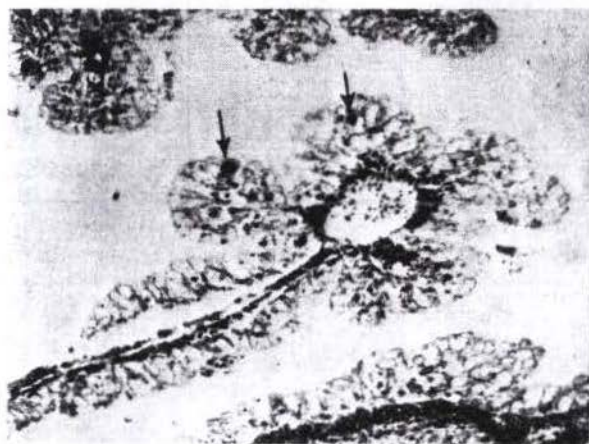


Fig. 1. — Sezione di membrana di sacco vitellino infetta: si scorgono chiaramente i villi di cui è costituita la membrana e sono ben visibili le cellule cilindriche a palizzata dell'entoderma. In alcune di queste cellule (freccia) si notano accumuli di corpi iniziali, 3^a giornata d'infezione. Giemsa X 100.

palizzata, cilindriche. La superficie dell'entoderma è inoltre caratterizzata dalla formazione di villosità⁷ che la rendono pieghettata e frastagliata e che ravvicinando

tratti di cellule ad altri, favoriscono e facilitano il passaggio del virus da una cellula ad un'altra, quando siano state infettate⁸ (Fig. 1-2). Il vitello è inoltre un favorevole terreno per la conservazione ed il mantenimento del virus⁹.

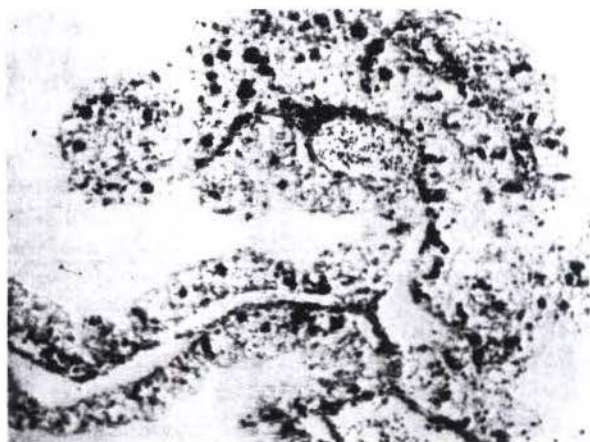


Fig. 2. — Come Fig. 1: membrana infetta in 5ª giornata. Le cellule contenenti i corpi iniziali sono molto più numerose. Giemsa X 100.

È proprio nelle cellule superficiali dell'entoderma che si nota inizialmente la comparsa e successivamente l'accrescimento dei « corpi iniziali ». Questi, costituiti da minuscoli corpiccioli rotondi, intensamente colorati in bleu con il Giemsa, si cominciano ad osservare in terza giornata dall'inizio dell'infezione, sia nelle impronte che nelle sezioni, anche se in queste ultime riesce più difficoltoso evidenziarli nel citoplasma cellulare, date le loro piccole dimensioni e la scarsità nel numero. L'osservazione si fa invece più precisa dalla quarta giornata in poi, in cui si nota un aumento dei corpi iniziali dovuto alla moltiplicazione di questi per scissione binaria. Si originano in questo modo quelle formazioni complesse dell'aspetto di morula, talvolta circondate da membrana, colorate intensamente in bleu, che si possono vedere sia nelle cellule in sezione (Fig. 3), come nella impronte (Fig. 4).



Fig. 3.

Fig. 3. — Sezione di membrana infetta: inclusione citoplasmatica (corpo iniziale) con aspetto di morula (freccia). Giemsa X 1500.



Fig. 4.

Fig. 4. — Impronta da membrana infetta: accumulo di corpi elementari alcuni dei quali sono ben differenziati. Giemsa X 1500.

Lo sviluppo del virus continua e gli ammassi si fanno più frequenti e più abbondanti nei giorni successivi; in seno agli accumuli dei corpi iniziali si rendono sempre più visibili granuli violetti, i così detti « corpi elementari » che finiscono per sostituirsi

completamente ai corpi iniziali. A questo punto il citoplasma della cellula risulta quasi completamente invaso dai corpi elementari, che spesso circondano il nucleo assumendo tuttavia il caratteristico aspetto del « casco » o « cappuccio » (Fig. 5),

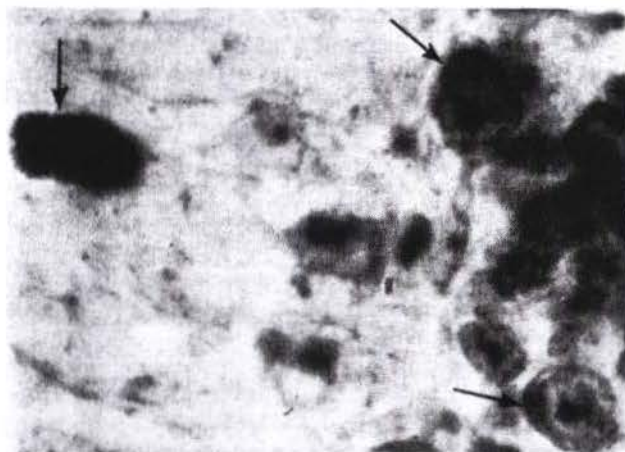


Fig. 5. — Sezione di membrana infetta: inclusione citoplasmatica composta di corpi elementari che circondano il nucleo come un « casco »; in un'altra cellula grosso ammasso di corpi elementari (freccie). Giemsa X 1500.

così come è stato descritto negli strisci di epitelio congiuntivale umano tracomatoso¹⁰). Con la rottura delle morule e la lisi delle cellule infette si mettono in libertà grandi quantità di corpuscoli elementari che a loro volta vanno ad invadere nuove cellule (Fig. 2). Il numero stragrande di questi corpuscoli elementari, sparsi in tutto il preparato, si nota facilmente nelle impronte ottenute con i sacchi vitellini positivi. Lo sviluppo di *Miyagawanella abortus ovis* appare quindi molto simile a quello descritto per gli agenti del gruppo psittacosi-linfogranuloma e particolarmente a quello del virus del tracoma; queste osservazioni morfologiche confermano perciò l'omogeneità del gruppo per quanto riguarda la moltiplicazione degli agenti che ne fanno parte.

12 luglio 1969.

PAOLA BERTINO e GABRIELLA MANGINI
Laboratori di Microbiologia

- ¹ STAMP, J. T., A. D. MC. EWEN, J. A. A. WATT & D. I. NISBET, *Vet. Rec.*, **62**, 251 (1950).
- ² SPANEDDA, A. & A. MEDDA, *Zooprofilassi*, **6**, 263 (1951).
- ³ GIROUD, P., F. ROGER, A. VALLÉE & A. ROGER, *Bull. Acad. Vet. France*, **29**, 393 (1956).
- ⁴ YOUNG, S., H. PARKER & B. D. FIREHAMMER, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **133**, 374 (1958).
- ⁵ STAMP, J. T., *J. Comp. Pathol. Therap.*, **61**, 215 (1951).
- ⁶ BOVARNICK, M. R., J. C. MILLER & J. C. SNYDER, *J. Bacteriol.*, **59**, 509 (1950).
- ⁷ BEVERIDGE, W. I. B. & F. M. BURNET, *La culture des virus et des rickettsies dans l'embrion de poulet*. Editions Médicales Flammarion, Paris 1950, p. 20.
- ⁸ ALLEN, E. G., *J. Bacteriol.*, **63**, 369 (1952).
- ⁹ WEISS, E., *Am. Rev. Microbiol.*, **9**, 227 (1955).
- ¹⁰ SOHIER, R., *Diagnostic des maladies a virus*. Editions Médicales Flammarion, Paris 1964, p. 510.

Sulla produzione di acido micofenolico in coltura sommersa

L'acido micofenolico si può considerare il primo antibiotico caratterizzato chimicamente. Esso venne isolato da Gosio¹ nel 1896; e successivamente venne identificato chimicamente da CLUTTERBUCK *et al.*² mentre le sue proprietà antibiotiche furono dimostrate da FLOREY *et al.*³.

Dopo questa ultima osservazione l'acido micofenolico non fu più oggetto di ulteriori ricerche, fino a quando DENTICE DI ACCADIA⁴ e BALLIO & SERMONTI⁵ lo ripresero in esame dato che dimostrava la capacità di inibire la «back mutation» di alcuni ceppi mutati di *Penicillium chrysogenum*. In questo ultimo anno l'acido micofenolico è stato nuovamente studiato da alcuni autori per le sue capacità antitumorali e antivirali^{6,7}.

In diverse occasioni si è potuto osservare nel nostro laboratorio la presenza di piastre inquinate da un *Penicillium* sp. che dimostrava la capacità di inibire la crescita di colonie di specie diverse di *Claviceps* Tul. Si è isolato tale fungo che è stato classificato come *Penicillium brevicompactum* Dierckx.

Esso è stato coltivato in coltura sommersa (bente da 500 ml contenenti 100 ml di terreno, poste su agitatore rotatorio a 200 giri al min con un eccentrico di 2,5 cm) nel seguente terreno nutritivo, a 24° C di temperatura:

Saccarosio g 100; Ca(NO₃)₂ g 1; KH₂PO₄ g 0,250; MgSO₄ · 7H₂O g 0,250; KCl g 0,125; FeSO₄ · 7H₂O g 0,033; ZnSO₄ · 7H₂O g 0,027; L-asparagina g 10;

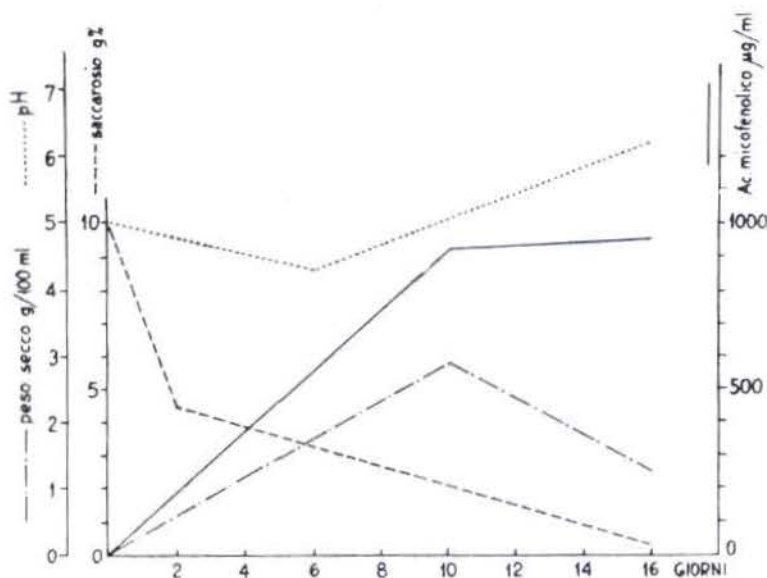


Fig. 1. — Schema di una fermentazione tipica di *Penicillium brevicompactum* Dierckx in coltura sommersa.

Cisteina g 0,010; Estratto di lievito g 0,100; pH = 5; sterilizzazione per 30 min a 100° C.

La quantità di acido micofenolico ottenuto e la curva di fermentazione sono riportate nella Fig. 1.

La produzione massima di acido micofenolico raggiunge dopo 16 giorni di coltura valori medi di 900 µg/ml.

TABELLA I.

Quantità minima inibente di acido micofenolico contro diversi generi e specie di funghi

<i>Aspergillus clavatus</i>	> 50 µg/ml
<i>Candida albicans</i>	10 "
<i>Cephalosporium</i> sp.	10 "
<i>Cladosporium</i> sp.	50 "
<i>Claviceps paspali</i>	10 "
<i>Claviceps purpurea</i>	50 "
<i>Claviceps sesleriae</i>	10 "
<i>Colonectria graminicola</i>	10 "
<i>Curvularia lunata</i>	10 "
<i>Epidermophyton floccosum</i>	50 "
<i>Phytophthora</i> sp.	50 "
<i>Phoma</i> sp.	50 "
<i>Fusarium</i> sp.	50 "
<i>Graphium</i> sp.	> 50 "
<i>Helminthosporium</i> sp.	5 "
<i>Keratinomyces</i> sp.	50 "
<i>Microsporium gypseum</i>	50 "
<i>Microsporium cookei</i>	10 "
<i>Microsporium canis</i>	50 "
<i>Microsporium fulvum</i>	50 "
<i>Microsporium rambreuseghemii</i>	50 "
<i>Mucor</i> sp.	> 50 "
<i>Nectria coccinea</i>	> 50 "
<i>Rhizopus</i> sp.	> 50 "
<i>Sclerotinia</i> sp.	50 "
<i>Streptomyces</i> sp.	50 "
<i>Trichophyton</i> sp.	50 "
<i>Ustilago maydis</i>	50 "

L'antibiotico è stato estratto con cloroformio e successivamente cristallizzato e identificato seguendo la procedura descritta da BALLEO & SERMONTI².

Il prodotto cristallizzato è stato saggiato contro diversi funghi saprofiti, patogeni delle piante e dell'uomo. L'attività minima inibente è riportata nella Tab. I.

30 luglio 1969.

LUIGI GUERRIZIO, RINALDO MERCANTINI,
NICOLA ODDO e ANTONIO TONOLO
Laboratori di Chimica Biologica

- ¹ GOSIO, B., *Riv. Ig. Sanità*, **7**, 825, 869, 961 (1896).
- ² CLUTTERBUCK, P. W., A. E. OXFORD, H. RAISTRICK & G. SMITH, *Biochem. J.*, **26**, 1441 (1932).
- ³ FLOREY, H. V., K. GILLIVER, M. A. JENNINGS & A. G. SANDERS, *Lancet*, **1946-I**, 46.
- ⁴ DENTICE DI ACCADIA, F., *Abstracts V Intern. Congr. Biochem.*, Mosca, 1961, p. 273.
- ⁵ BALLO, A. & G. SERMONTI, *Sci. Repts. Ist. Super. Sanità*, **1**, 8 (1961).
- ⁶ WILLIAMS, R. H., D. H. LIVELY, D. C. DELONG, J. C. CLINE, M. S. SWENEY, G. A. POORE & S. H. LARSEN, *J. Antibiotics*, **21**, 649 (1968).
- ⁷ ANDO, K., S. SUZUKI, G. TAMURA & K. ARIMA, *J. Antibiotics*, **21**, 649 (1968).