

Significato e limiti delle prove tassonomiche

CLARA FRONTALI

Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia

1. PREMESSA

Le biotecnologie implicanti l'uso su scala industriale di processi di fermentazione, al di là di quelle tradizionalmente usate per la produzione di alimenti, farmaci, antibiotici, ecc., stanno ricevendo oggi notevole impulso in campi diversi ed appaiono promettenti sotto molti aspetti. Il loro uso pone tuttavia il problema della caratterizzazione dei ceppi di microorganismi usati, sia dal punto di vista della loro stabilità (importante soprattutto ai fini della produzione), sia dal punto di vista di possibili effetti patogeni per i lavoratori, le popolazioni circostanti o i consumatori del prodotto.

Con un'impostazione Linneana, i ceppi vengono normalmente definiti per la loro appartenenza ad una data specie, denominata dal nome di un archetipo (*type strain*). L'opera del tassonomo è spesso richiesta per accertare la correttezza dell'assegnazione della specie. La presenza nello stesso raggruppamento di ceppi noti o sospetti come patogeni per l'uomo, le piante o gli animali, può portare, caso per caso, alla prescrizione di cautele, o alla decisione dell'inopportunità di utilizzare su scala industriale il ceppo in questione.

Si vuole qui analizzare criticamente, alla luce delle conoscenze attuali, il significato ed i limiti dell'approccio tassonomico, che vale, ammesso (e non concesso), che la classificazione riproduca « fedelmente » gli effettivi rapporti evolutivi e genetici tra le diverse specie. Saranno quindi discussi i diversi metodi utilizzati per la classificazione, dedicando maggior attenzione al caso dei lieviti (cui è limitata la bibliografia) e prefiggendosi un'analisi che permetta di valutare se i diversi metodi portino coerentemente all'individuazione di raggruppamenti costituenti delle « unità naturali » della classificazione.

È noto che per organismi per i quali la riproduzione in natura è essenzialmente agamica, o per i quali una riproduzione sessuata è ottenibile in laboratorio, ma ha una rilevanza difficilmente accertabile in natura, sfuma il concetto biologico di specie « naturale », basato sull'interfecondità; di

conseguenza i sistemi di classificazione non possono essere basati che su somiglianze o differenze di caratteri osservabili sperimentalmente, siano questi caratteri fenotipici [1] o caratteri legati alla composizione genica [2-4].

Come sarà meglio chiarito nel seguito, entrambi i tipi di classificazione (quello fenotipico e quello genotipico) contengono notevoli elementi di arbitrarietà, sia nella scelta delle proprietà da analizzare che delle metodiche da seguire. È pertanto legittimo aspettarsi che essi conducano a raggruppamenti in linea di principio non sovrapponibili, e diversi entrambi da quella suddivisione in gruppi che noi pur continuiamo a ritenere immanente, non pura costruzione del nostro intelletto. La convinzione dell'esistenza di tali unità naturali ci deriva in ultima analisi dalla nozione che un ben determinato (anche se a noi largamente ignoto) cammino evolutivo ha portato ad una divergenza delle specie. Queste possono essersi già sufficientemente allontanate da costituire raggruppamenti identificabili, o possono essere « giovani » ancora in via di diversificazione, nel qual caso si avrà uno spettro continuo di variabilità nei caratteri osservabili.

Ciò premesso, e riservandoci di ritornare più oltre su quello che può essere considerato come un terzo approccio al problema della classificazione, ovvero la ricostruzione dell'albero filogenetico, consideriamo più in dettaglio i due sistemi tassonomici citati.

2. CLASSIFICAZIONE PER CARATTERI FENOTIPICI

Il problema principale della tassonomia « classica », basata su caratteri fenotipici, è nella scelta del numero e del peso da attribuire alle diverse proprietà osservabili. Il principio Adansoniano della classificazione basata su di un gran numero di proprietà *indipendenti* e di *eguale importanza* incontra difficoltà nelle applicazioni pratiche, anche con le più recenti tecniche di tassonomia numerica [5-7]. E ciò non tanto per il problema, superabile nella pratica con diversi metodi, dei caratteri non esprimibili con un'alternativa semplice (ad es. tolleranza di alcool a diversa concentrazione) quanto per il fatto che, nel tentativo di includere il maggior numero di proprietà possibili, è facile includere proprietà non indipendenti oppure proprietà di peso molto diverso.

La tassonomia dei lieviti, originariamente basata principalmente su proprietà morfologiche delle cellule vegetative e delle spore e su pochi tests biochimici, si è successivamente allargata ad un numero considerevole di saggi di assimilazione e fermentazione, di sensibilità a fattori di crescita o ad inibitori, ed infine alla presenza di antigeni [8]. Ma al di là del dibattito, tuttora vivace, sull'importanza relativa dei vari caratteri considerati, va tenuto presente un discorso di carattere generale.

L'adattabilità dei microorganismi in genere a diverse condizioni ambientali è certamente determinata per via genetica; se però in alcuni casi l'adattamento riflette una variazione dell'informazione genetica, o per mutazione, o per acquisizione di materiale genetico da altri organismi (trasduzione, trasferimento di plasmidi, ecc.), in molti casi l'informazione genetica rimane costante, e la risposta alle variazioni ambientali è dovuta al complesso sistema di regolazione della sintesi proteica.

Di fatto è opera inutile definire le proprietà fenotipiche, come la produzione di particolari enzimi o la presenza di particolari antigeni senza definire al tempo stesso le condizioni ambientali in cui tali proprietà si esprimono.

È importante quindi, nella caratterizzazione dei ceppi per uso industriale, tener presente che le condizioni di laboratorio sono certamente diverse, se non altro per fattori di scala, da quelle attuate in fase di produzione. È questo uno dei limiti principali alla significatività di prove tassonomiche basate sull'analisi dei caratteri fenotipici. Questo fatto, insieme all'arbitrarietà esistente, come si è detto, nella scelta e nel peso dei caratteri, ha stimolato la ricerca di sistemi tassonomici diversi.

3. CLASSIFICAZIONE PER CARATTERI LEGATI ALLA COMPOSIZIONE GENICA

La critica fondamentale che viene mossa dai fautori di questo tipo di classificazione a quella fenotipica è che quest'ultima, analizzando solo quei caratteri che sono fenotipicamente espressi, prende in considerazione, in definitiva, una porzione assai ristretta dell'intero genoma, mentre questo contiene una quantità di informazione non espressa, ma potenzialmente esprimibile, assai più elevata.

Le proprietà legate alla composizione genica che in passato sono state utilizzate a fini tassonomici sono essenzialmente la composizione media in basi del DNA totale dell'organismo (espressa solitamente come percentuale di guanina e citosina, o % G + C) e la capacità di ibridazione DNA — DNA tra l'acido desossiribonucleico purificato da diversi ceppi.

Per quanto riguarda la composizione media in basi, questo è certamente un parametro utile a differenziare gruppi di ceppi che presentano valori di % G + C nettamente diversi. La precisione con cui normalmente si determina la composizione media in basi (per via cromatografica, o mediante misure di temperatura di fusione del DNA, o di densità di galleggiamento in gradiente di cloruro di cesio) non permette tuttavia di ridurre l'errore sperimentale su questo parametro al di sotto di $\pm 0,5$ % [9], così che è difficile dire, ad esempio, se vadano considerati diversi sotto questo aspetto due ceppi il cui DNA abbia composizione in basi rispettivamente 30 % G + C e 31 % G + C.

La precisione raggiungibile sperimentalmente, dunque, ma soprattutto il fatto che il parametro in questione deriva da un'operazione di larga media, che ignora la specificità delle sequenze contenute nel DNA, fanno sì che i raggruppamenti ottenuti sulla base di questo parametro siano troppo ampi per una fine analisi tassonomica.

Assai più specifico appare il test di ibridazione DNA — DNA [3. 4. 10. 11]. Alla base di questi test è l'idea di raggruppare tra loro organismi il cui genoma contenga un numero elevato di sequenze omologhe, *indipendentemente dal fatto che tali sequenze vengano o meno espresse nel fenotipo*.

Il test di ibridazione, nelle sue linee essenziali, prevede la purificazione del DNA di un organismo scelto come riferimento (*type strain*) e del DNA, marcato radioattivamente, dell'organismo in esame. Previa frammentazione e denaturazione dei DNA purificati, si fa avvenire l'ibridazione mediante incubazione a temperatura opportuna dei frammenti a singola elica ottenuti, in eccesso di DNA di riferimento «freddo». La frazione riassociata viene trattenuta su opportuni filtri o separata con metodi cromatografici. Poiché solo uno dei due DNA è marcato si misura facilmente la quantità di molecole riassociate «ibride». Il confronto con la quantità di riassociato ottenuto incubando in analoghe condizioni sperimentali il DNA omologo permette di valutare in percentuale il grado di omologia tra il DNA incognito e quello di riferimento.

Questo tipo di test chiaramente non distingue tra frazione ripetitiva e frazione unica del DNA, e poiché la frazione ripetitiva rinatura più prontamente, seleziona per questo tipo di informazione. È pensabile di modificare il test in modo da analizzare specificamente la frazione unica, ma ciò renderebbe il metodo assai più laborioso, e più difficilmente applicabile per la vasta opera necessaria ai fini tassonomici. Resta comunque il fatto che il lavoro tassonomico fin qui svolto riguarda il DNA totale. Ora, considerando in generale gli eucarioti, da un 15 % ad un 60 %, a seconda dell'organismo considerato, può essere costituito da DNA ripetitivo. Nel caso particolare dei lieviti, che non presentano più di un 10 % di informazione ripetuta, il problema è meno importante e, se si pone cura a che almeno l'80-90 % dei frammenti omologhi rinaturati nelle condizioni scelte, la prova può essere ritenuta significativa. A questo scopo attenzione va posta al sistema utilizzato per la separazione della frazione riassociata [12].

Ma, generalmente parlando, si pone a questo punto tutta una serie di interrogativi sul significato del test di ibridazione: saranno considerati appartenenti a specie diverse due organismi perché la stessa informazione genetica è presente nell'uno in un elevatissimo numero di copie, nell'altro in numero ridotto? E viceversa, qual'è la probabilità che vengano considerati nello stesso gruppo ceppi simili per il ripetitivo e diversi per la frazione unica? Riguardo all'informazione contenuta nei plasmidi, essa può rappresentare

una frazione percentualmente non significativa (nei limiti sperimentali dei test di ibridazione) eppure la sua presenza può alterare in modo essenziale le proprietà dell'organismo, conferendogli caratteri come le resistenze a diversi antibiotici.

Non vogliamo toccare in questa sede la problematica sollevata dalla ingegneria genetica, che rischia negli ultimi tempi di sconvolgere la paziente opera del tassonomo, raccorciando distanze filogenetiche e portando alla presenza, nello stesso organismo, di caratteri provenienti da specie diverse. L'eventuale uso industriale di cloni costruiti mediante manipolazioni genetiche pone problemi diversi, che non verranno qui discussi. Tuttavia proprio le nuove acquisizioni scientifiche ottenute tramite l'ingegneria genetica ci forniscono oggi una visione ben diversa da quella valida fino a pochi anni orsono, nella quale il DNA era considerato come un « magazzino » o « memoria » statica di tutte le funzioni potenzialmente svolte dall'organismo. La struttura discontinua del gene, la presenza di sequenze spaziatrici la cui funzione è ancora tutta da chiarire [13-16] gettano altre ombre di incertezza sul significato dei tests di ibridazione ai fini di una classificazione. È probabilmente il modello organizzativo delle sequenze ripetute che si è modificato nel corso dell'evoluzione [17, 18] e che riflette oggi la differenza tra specie. È prevedibile che tra non molti anni si arrivi a decifrare il significato delle sequenze spaziatrici, ed a descrivere, se non a comprendere, l'organizzazione delle sequenze nel genoma di un dato organismo.

4. LA RICOSTRUZIONE DEGLI ALBERI FILOGENETICI

Ci troviamo così ricondotti al problema, precedentemente accennato, della ricostruzione dei cammini evolutivi che hanno portato al differenziarsi delle specie, come unica base per giungere ad una classificazione « naturale », mentre le difficoltà discusse nei precedenti paragrafi esemplificano l'affermazione che i sistemi attuali di classificazione rimangono sì dei sistemi validi per giungere a raggruppamenti utili a fini pratici, ma che, in quanto in larga misura arbitrari, essi forniscono risultati non necessariamente sovrapponibili. Se « a posteriori » un esteso lavoro tassonomico portato avanti secondo ciascuno dei due criteri fondamentali sopra discussi, portasse all'identificazione degli stessi raggruppamenti, si raggiungerebbe un buon livello di confidenza nell'affermare che questi raggruppamenti riproducono fedelmente i rapporti evolutivi tra le specie.

Mentre siamo ancora ben lontani, anche nel ristretto ambito dei lieviti, dal disporre di dati sufficienti (specialmente per ciò che riguarda i tests di ibridazione) per tentare tale confronto, il dato che dimostra che non più del 10 % della porzione unica del genoma codifica per proteine strutturali [17]

non è certo confortante nell'aspettativa di una coincidenza dei risultati forniti dai due metodi.

La via che si prefigge direttamente la ricostruzione dei cammini evolutivi appare sotto diversi aspetti più promettente. Le distanze evolutive possono essere calcolate sulla base del minimo numero di sostituzioni necessarie (a livello della sequenza polinucleotidica codificante per una data proteina) a modificare la sequenza di aminoacidi nel modo osservato [19-21]. Questo procedimento viene applicato a proteine la cui funzione sia essenziale alla vita degli organismi considerati, e quindi siano presenti anche in specie molto distanti tra loro. Le proteine scelte a questo scopo (emoglobine α e β , citocromo C, fibrinopeptidi α e β) hanno la caratteristica di conservare lo stesso tipo di residui in posizioni fisse, evidentemente corrispondenti ai siti responsabili della funzione svolta dalla proteina, mentre presentano in altre zone una grande variabilità nella composizione in aminoacidi. Evidentemente mutazioni che conducono ad alterazioni nelle posizioni legate alla funzionalità della proteina sono controselezionate, mentre mutazioni nelle zone della catena polipeptidica inessenziali ai fini della funzionalità non sono sottoposte a processi selettivi.

È stato dimostrato da Britten e Davidson [17] che, almeno per alcune specie superiori, la velocità di variazione dei residui aminoacidici in queste ultime zone è compatibile con quella dei codoni nella porzione unica del genoma. Ciò conforta nel considerare che le distanze evolutive valutate in base al confronto di opportune sequenze peptidiche siano significative dal punto di vista dell'evoluzione dell'intero genoma, almeno per la sua parte non ripetitiva.

Si tratta naturalmente di un metodo indaginoso, che mal si presta a rapide analisi per l'attribuzione di un ceppo ad una specie piuttosto che ad un'altra. I raggruppamenti cui esso conduce sono troppo larghi per un'analisi abbastanza dettagliata, ad esempio all'interno del genere *Candida*. Tuttavia è questa l'unica via che, estesa all'analisi di altre sequenze a rapida variazione di composizione in aminoacidi, può condurre ad una classificazione in gruppi significativi dal punto di vista filogenetico. Solo quando siano noti tali raggruppamenti sarà possibile scegliere tra i tanti tests fenotipici disponibili quelli che siano di rapida esecuzione e che *diano risposte correlate alle specie « naturali »*.

BIBLIOGRAFIA

1. LODDER, J. 1970. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. North Holland Publ. Co. Amsterdam.
2. NAKASE, T., KOMAGATA, K. 1971. Significance of DNA base composition in the classification of yeast genus *Candida*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17: 259-279.

3. MEYER, S.A., & PHAFF, H.J. 1969. Deoxyribonucleic acid base composition. *J. Bacteriol* **97**: 52-56.
4. MEYER, S.A. & PHAFF, H.J. 1972. In: *Yeasts Models in Science and Technics*. A. Kockova-Kratchvilova & E. Minarik (Eds.), pp. 375-387, Slovak Acad. of Sciences, Bratislava.
5. CAMPBELL, I. 1974. Methods of numerical taxonomy for various genera of yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* **17**: 135-156.
6. CAMPBELL, I. 1975. Numerical analysis and computerized identification of the yeast genera. *Candida* and *Thorulopsis*. *J. Gen. Microbiol.* **90**: 125-132.
7. JONES, G.R. 1975. A comparison of analytical methods for the numerical taxonomy of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **89**: 175-181.
8. TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., TAGUCHI, M., NAKASE, T., & SHINODA, T. 1974. Serological aspects on yeast classification. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **53**: 77-91.
9. MEYER, S.A. DNA relatedness between physiologically similar strains and species of yeasts of medical and industrial importance. In: *SCP: Safety for Animal and Human Feeding*. Proc. of the UN System Symp. Milan, March 31-April 1, 1977 pp. 1-12.
10. MEYER, S.A., ANDERSON, K., BROWN, R.E., SMITH, M.Th., YARROW, D., MITCHELL, G., & AHEARN, D.G. 1975. Physiological and DNA characterization of *Candida maltosa*, a hydrocarbon-utilizing yeast. *Arch. Microbiol.* **104**: 225-231.
11. JOHNSON, J.L. & ORDAL, E.J. 1968. DNA homology in bacterial taxonomy. *J. Bacteriol.* **95**: 893-900.
12. PHAFF, H.J. & PRICE, C.W. 1977. Strengths and weaknesses of traditional criteria in the systematics of yeasts as revealed by nuclear genome comparison. In: *SCP: Safety for Animal and Human Feeding* Proc. of the U.N. System Symp. March 31-April 1, Milan, pp. 1-12.
13. BRITTEN, R.J. & KOHNE, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science.* **161**: 529-540.
14. BRITTEN, R.J. & KOHNE, D.E. 1970. Repeated segments of DNA. *Sci. Am.* **24**: 24-31.
15. BRITTEN, R.J. & DAVIDSON, E.H. 1969. Gene regulation for higher cells. *Science.* **165**: 349-357.
16. DAVIDSON, E.H., HOUGH, B.R., AMENSON, C.S. & BRITTEN, R.J. 1973. General interspersed repetitive sequence elements in the DNA of *Xenopus*. *J. Mol. Biol.* **77**: 1-23.
17. BRITTEN, R.J. & DAVIDSON, E.H. 1976. DNA sequence arrangement and preliminary evidence on its evolution. *Fed. Proc.* **35**: 2151-2157.
18. MOORE, G.P., SCHELLER, R.H., DAVIDSON, E.H. & BRITTEN, R.J. 1978. Evolutionary change in the repetition frequency of sea urchin DNA sequences. *Cell.* **15**: 649-660.
19. MARGOLASH, E., FITCH, W.M. & DICKERSON, R.E. 1969. In: *Structure, Function and Evolution in Proteins*. Brookhaven Symp. in Biology n. 21, Brookhaven Natl. Lab.
20. FITCH, W.M. 1972. In: *Evolution of Genetic Systems*. Brookhaven Symp. in Biology, Brookhaven Natl. Lab. n. 23.
21. DAYHOFF, M.O. 1972. In: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5. The Natl. Biomed. Res. Fundn., Washington D.C.

Significato e limiti delle prove di patogenicità delle Candide

LORENZO TUTTOBELLO (a) ed ENNIO PALLIOLA (b)

(a) Servizio Biologico

(b) Laboratorio di Veterinaria

Le Candide sono dei lieviti asporigeni, ubiquitari, che hanno la capacità di produrre pseudomicelio e, più raramente, vero micelio. Per questo genere il nome di *Monilia*, talvolta insieme ad *Oidium*, ha dominato la seconda metà dell'800 e la prima metà del 900; il nome di *Candida* è stato proposto da Berkhout solo nel 1923 [1] e definitivamente accettato nel IX Congresso Internazionale di Botanica a Montreal nel 1959. Per cui può accadere di trovare in testi, anche abbastanza recenti, o comunque di AA. famosi [2], il termine « moniliasi » per indicare le affezioni da *Candida*, mentre è corretto il termine « candidiasi » (e non quello di candidosi) proposto da Winner e Hurley nel 1964 [3] e accettato nel Yeast Symposium di Delft nel 1969 [4].

L'ubiquitarietà del genere *Candida* è stata osservata per tutte le specie, ad eccezione della *C. albicans*, che sembra prediligere come habitat naturale l'uomo e gli animali, anche se saltuariamente è stata isolata dal suolo [5], frutti esotici [6], lieviti di pane [7], fiori, foglie, bevande, aceto di vino [8], aria, formaggi freschi, burro, panna e liquidi zuccherini [9].

Gran parte delle conoscenze sistematiche, cliniche, farmacologiche e patogenetiche delle Candide fino a tutti gli anni '50 riguardavano quasi esclusivamente la *C. albicans*, soprattutto per l'incompletezza delle tecniche diagnostiche differenziali allora in uso. Negli ultimi 25 anni si è, invece, assistito ad un incremento notevole delle candidiasi, con la contemporanea diminuzione di incidenza eziologica da *C. albicans* e la identificazione di altre specie di Candide la cui patogenicità fino al 1960 era dubbia.

La maggior parte delle candidiasi si manifesta in forme superficiali e circoscritte ad andamento clinico subacuto o cronico; meno frequentemente si osservano forme cliniche generalizzate, profonde, sistemiche, acute o mortali. Le Candide vengono isolate con maggiore frequenza, dalle superfici cutanee, dalle rime labiali, dalle regioni di maggior sudorazione e di sfregamento cutaneo, quali ascelle, inguine, pieghe inferiori delle mammelle, spazi interdigitali delle mani e soprattutto dei piedi, onichie e paronichie. Altre

fonti di isolamento sono le feci, le urine e più raramente il sangue, il liquido cefalorachidiano, il liquido amniotico, le ulcere da varici, le ulcere gastriche e duodenali, le appendici asportate. Vengono isolate con frequenza variabile in affezioni localizzate nei più diversi organi.

La natura delle specie isolabili, le percentuali di incidenza nelle varie affezioni, e i dati epidemiologici e clinici sono stati ampiamente riportati da Hurley [10]. Accanto alla *C. albicans*, presente nella maggior parte delle affezioni quasi sempre in percentuale maggiore rispetto alle altre specie, ricorrono spesso la *C. tropicalis*, la *C. krusei*, la *C. guilliermondii*, la *C. parapsilosis*, la *C. stellatoidea*, la *C. pseudotropicalis* e talvolta la *C. viswanathii*, la *C. zeylanoides*, la *C. humicola*, la *C. intermedia*, la *C. slooffii*, la *C. bovina*, la *C. pelliculosa* (queste tre ultime in animali).

Nonostante la gran mole di osservazioni disponibili una serie di interrogativi permangono sul ruolo svolto dalle Candide nei fenomeni morbosi. È comunque noto che i rapporti tra Candide e l'organismo ospite possono essere di tre tipi:

a) *puro saprofitismo* sotto forma di presenza nel canale digerente e nelle mucose, ove le Candide si nutrono di sostanze organiche in decomposizione, di succhi organici, ecc.; questo commensalismo è confermato da assenza di danni e di reazioni immunitarie;

b) *parassitismo senza manifestazioni patologiche* clinicamente rilevabili; di questo stato morboso inapparente per segni clinici, si ha indicazione attraverso successive manifestazioni di reazioni immunitarie;

c) *parassitismo con manifestazioni patologiche* e chiari segni clinici, generalmente con specifiche reazioni immunitarie; ciò avviene raramente e in questo caso si parla di candidiasi.

Da quanto detto risulta chiaro che il problema principale che si presenta in micologia medica quando un lievito viene isolato da un reperto umano o animale è di stabilire, anche con l'ausilio di dati anamnestici, clinici ed epidemiologici, in quale di queste tre condizioni si trova la Candida e, nel caso di accertata candidiasi, se questa è una infezione primaria o secondaria. In altre parole si deve sapere se la Candida insorge primitivamente in soggetti apparentemente sani, essendo provvista di patogenicità propria, oppure, come avviene nella grande maggioranza dei casi, se è un microrganismo «opportunista» in quanto approfitta di tutte le condizioni di diminuzione o di assenza dei poteri di difesa dell'organismo per provocare la candidiasi, che sotto questo aspetto è da considerare malattia condizionata da fattori organici e secondariamente da fattori ambientali.

Questi «fattori di opportunismo» possono essere individuati in:

1) deficienze congenite o acquisite del sistema reticolo-endoteliale;

- 2) tumori del sistema reticolo-endoteliale (emolinfopatie maligne, leucosi, leucemie, morbo di Hodkins, ecc.);
- 3) chemioterapie antitumorali;
- 4) sostanze immunosoppressive;
- 5) mobilitazione e sovraccarico di fagociti per inalazioni prolungate di particelle di carbone o di amianto;
- 6) allergie;
- 7) diabete;
- 8) obesità;
- 9) esposizione prolungata a radiazioni come risultati di terapie, incidenti, ecc.;
- 10) terapie più o meno prolungate a base di corticosteroidi e di antibiotici, specialmente tetracicline e aminoglicosidi;
- 11) pillole contraccettive;
- 12) varie cause iatrogene;
- 13) stress da trauma, incidenti, forme morbose o particolari farmaci che inibiscono le normali resistenze dell'ospite o il sistema reticolo-endoteliale;
- 14) tossine batteriche, specialmente esotossine da *Pseudomonas*;
- 15) terapie parenterali, e in particolare iperalimentazione per via endovenosa;
- 16) cateterismi cardiaco, venoso, vescicale;
- 17) emodialisi;
- 18) nuove tecniche chirurgiche (trapianti, protesi valvolari, innesti, ecc.);
- 19) ustioni.

Riprendendo il discorso precedentemente avviato si deve dimostrare che la *Candida repertata* non è un germe saprobo, bensì un microrganismo opportunisto dotato, in particolari condizioni, di una certa patogenicità. Partendo dal ceppo isolato si deve perciò rispondere al 3° postulato di Koch, che richiede la riproduzione sperimentale della malattia in animali di laboratorio.

A tal proposito val la pena di ricordare che in passato per la riprova della patogenicità delle *Candide* si è ricorsi spesso a infezioni sperimentali umane, principalmente con *C. albicans*. Hausmann [11] con un tampone boccale di un lattante, malato di mugugno infettò per via vaginale una donna incinta provocandole una vaginite. Marwin [12] scarificò in più zone della pelle 200 soggetti ottenendo alcuni risultati positivi. Karcher [13] produsse reazioni vescicolo-pustolose in pelle umana con lieviti vivi. Hesseltine e Coll. [14]

produssero mughetto in bambini appena nati. Maibach e Kligman [15] ottennero, con semplice deposizione di *C. albicans* sotto cerotto oclusivo, placche eritematose ricoperte da papule, trasformatesi in pustole che furono interpretate come « archetypal lesions » di candidiasi cutanee. Riscontrarono inoltre con questo metodo una diversa risposta all'infezione della pelle a seconda delle regioni del corpo trattate.

Molti altri AA. hanno prodotto paronichie sperimentali [16]. Ma per fortuna le risposte positive che moltissimi AA. hanno avuto infettando sperimentalmente vari animali (*), hanno fatto abbandonare queste pericolose quanto immorali procedure.

Il Redaelli [17] con una serie di lavori iniziati nel 1924, ha portato un contributo fondamentale nella ricerca di un modello di patogenicità sperimentale per le *Candide* attraverso esperienze condotte su diverse specie di animali di laboratorio utilizzando diverse vie di inoculazione: endovenosa, endoarteriosa, sottocutanea, endoperitoneale, endocorneale, intrapleurica.

Altri AA. hanno contribuito, con alterna fortuna, alla ricerca di modelli sperimentali di patogenicità rilevabili in animali di laboratorio. Spesso sono stati usati dosaggi non definiti, spesso inoculi troppo alti, per cui si è manifestata una malattia acuta a decorso letale [18-19]; altre volte si è provocata la malattia in forma acuta abbassando le difese organiche dell'animale ospite con una serie di farmaci (prevalentemente antibiotici e cortisonici [20]) e con radiazioni [21] o mucina [22].

Infezioni protratte nel tempo, per studiare la patogenesi o l'effetto di farmaci antimicotici, furono ottenute in topi iniettando *C. albicans* per via endoperitoneale [23] o per via endovenosa [24]. Hasenclever [25] studiò la virulenza di *C. albicans* iniettandola e.v. in topini e conigli e dimostrò la uguale, e talvolta migliore suscettibilità all'infezione del topino rispetto al coniglio.

Un buon modello di studio della patogenicità di *C. albicans* in topini è quello di Mourad e Friedman [26]: inoculo standardizzato con colture agitate in condizioni definite, cellule contate in emocitometro, somministrazioni scalari (da 10^8 a 10^4 cellule) per via endovenosa, endoperitoneale, periorale, sottocutanea, intramuscolare, intranasale, intracerebrale. La via più efficace di inoculazione è risultata essere quella endovenosa, seguita dall'intracerebrale e, con una diminuzione di efficacia di 10-100 volte, dall'endoperitoneale. Le altre vie sono risultate praticamente inefficaci.

Fino a 20 anni fa parlare di candidiasi significava chiamare in causa la *C. albicans*. Del resto tutti i riferimenti finora riportati si riferiscono a tale specie, se si eccettua il lavoro di Mankowski [24] che osservò la patogenicità nel topino di *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*. È solo negli anni '60 che l'attenzione

(*) Si veda il cap. 19° *Experimental candidosis* dell'op. cit. [3].

dei ricercatori si sposta anche verso altri lieviti. Può aver contribuito, in maniera decisiva, il lavoro di Mackenzie [27]: contro i vecchi dati epidemiologici, la *C. albicans* rappresenta solo il 56% dei lieviti isolati dai più svariati reperti umani, la *C. tropicalis* il 5%; inoltre compaiono in percentuali significative due « nuovi » lieviti: *Torulopsis glabrata* (12,4%) e *Rhodotorula mucilaginosa* (6,1%). Hasenclever e Mitchell [28] studiano la patogenicità di *C. albicans* e di vari ceppi di *C. tropicalis* partendo da inoculi e.v. rispettivamente di 10^7 e 10^8 cellule; viene confermato che la *C. tropicalis* è poco patogena verso il coniglio, ma alcuni stipiti hanno la stessa virulenza della *C. albicans* verso il topino. Per la prima volta si determina istologicamente per le due specie la moltiplicazione nel rene, cervello, polmoni, milza e viene contemporaneamente seguito istochimicamente per rene e cervello il processo patogenetico colorando le reazioni col metodo di Bauer modificato da Lillie [29].

Hurley e Winner [30], dopo attenta revisione bibliografica affermano che pur risultando negative le prove biologiche del coniglio di Redaelli [17], non si deve guardare più a *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. parakrusei* (sin. *C. parapsilosis*), *C. guilliermondii*, come a saprofiti, ma come a potenziali agenti patogeni. Inoculando topini per via intradermica, endoperitoneale, endopolmonare, endovenosa con *C. tropicalis* cresciuta in agar, dimostrano inequivocabilmente, specialmente attraverso l'inoculazione e.v., la sua considerevole patogenicità evidenziata in sezioni istologiche di rene e cervello colorate con ematosilina e P.A.S. Contemporaneamente Hasenclever e Mitchell [31] compiono uno studio sulla patogenesi della *Torulopsis glabrata*, un lievito anascosporigeno che viene isolato sempre più frequentemente, specialmente in affezioni dell'apparato genito-urinario femminile e in pazienti sottoposti a terapie con antibiotici o con corticosteroidi. In topini normalmente non produce infezioni progressive, anche se permane in alcuni organi per più settimane, solo in forma Y.

Inoculando 10^8 cellule in topini pretrattati con cortisone, gli stessi AA. in 3 settimane hanno ottenuto il 50% di mortalità con evidenti lesioni a focolai submicroscopici nel rene.

Correggendo le conclusioni finali di Mourad [26], Sandula e Coll. [32] trovano che tutti i 95 ceppi di *C. albicans* saggiati sono patogeni per il topino. Hurley [33] conferma sperimentalmente la patogenicità della *C. stellatoidea*; Andriole e Hasenclever [34] ottengono il 40% di mortalità in topini inoculati endovena con *C. parapsilosis* (sin. *C. parakrusei* e *C. brumptii*); esperienze controverse sulla dimostrazione di patogenicità sperimentale di *C. krusei*, che più volte ha mostrato di avere rilevanza clinica, sono ricordate nella monografia della Hurley [10]. Goldstein e Coll. [35] osservano formazioni ascessuali in topini infettati con *C. guilliermondii* pretrattati con cortisone; Sandhu e Coll. [36] dimostrano la patogenicità per topini e conigli di *C. viswanathii*;

Hurley [37] afferma che *C. pseudotropicalis* produce una candidiasi mortale se iniettata endovena in topini.

In conclusione si è oggi abbastanza d'accordo nel considerare patogene, compatibilmente con le condizioni dell'ospite più volte discusse, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. viswanathii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*. Si è anche visto che la patogenicità non è sempre facilmente dimostrabile, che le idee ed i risultati degli studiosi raramente concordano, che per poterla evidenziare si deve ricorrere ad una serie di accorgimenti, non da tutti condivisi: altissimi inoculi; trattamenti dell'animale in esperimento con antibiotici, cortisonici, allossana, immunosoppressori, radiazioni, ecc.

Attualmente vengono isolate saltuariamente in affezioni umane o animali altre specie di *Candide* in precedenza poco considerate. Recentemente ad esempio abbiamo evidenziato la netta patogenicità per il topino di *C. clausenii* (dati non pubblicati), mentre al XII Congresso Internazionale di Microbiologia di Monaco di Baviera (3-8 settembre 1978) Hurley ha comunicato di aver ottenuto per la prima volta, dopo numerosi passaggi su animali, una evidente patogenicità con *C. blankii*.

Circa 4 anni fa cominciammo ad interessarci del problema della patogenicità delle *Candide*, non solo per verificare l'eventuale ruolo patogeno di *Candide* provenienti da reperti clinici, ma anche per valutare, per quanto possibile in anticipo, il grado di affidabilità di *Candide* da prodursi per l'alimentazione animale in forma di farine essiccate. È vero che tali farine ad alto contenuto proteico, ottenute da *Candide* sviluppate su n-alcani, subiscono un processo di sterilizzazione veloce nell'essiccamento *spray-dry*, ma è anche vero che la possibilità di sopravvivenza dei microrganismi dipende dal numero delle cellule, dalla temperatura e dal tempo di trattamento a cui sono sottoposte. Riportando graficamente in ordinata il numero delle cellule ed in ascissa i tempi, per una determinata temperatura si ottiene una curva di sopravvivenza che è comunque asintotica, per cui qualche grumo di cellule vive, in processi che prevedono la produzione di 300-400 tonnellate al giorno di lieviti secchi, è ragionevole prevederlo. Quindi cellule vive andranno a contatto degli operatori e potranno riprodursi negli animali che le ingeriscono, nelle stalle, nel terreno e, secondo il ciclo dei lieviti in natura, nei fiori e nei frutti. Prescindendo dalle motivazioni ecologiche, pur importanti, ci sembra che lieviti di così prevedibile diffusione capillare debbano dare le massime garanzie nei confronti della salute umana e animale, mentre la diffusione dovrebbe essere la più scarsa possibile.

Abbiamo dunque affrontato questo studio per definire la possibile patogenicità di ceppi di *Candida* nuovi o poco conosciuti sotto tale profilo, consapevoli delle notevoli difficoltà di un approccio metodologico, che era esattamente l'opposto di quello sviluppato dai micologi medici.

Dopo prove preliminari su conigli, cavie [38], topini, gerbilli, polli, inoculati per via endovenosa ed endoperitoneale, con *C. albicans*, *C. tropicalis* ed altre specie di *Candida* [39], si è optato per la via di inoculazione endovenosa, in quanto offre segni di patogenicità più marcati, e per il topino come animale routinario da esperimento poiché oltre alla sua nota recettività alle *Candide* opportunistiche, offre tutta una serie di vantaggi operativi.

Un'altra scelta è stata fatta contemporaneamente alle prime due: quella relativa al tipo di cellule da inoculare. È noto che la *Candida* è un genere dimorfico, che può presentarsi sotto forma di cellule abbastanza regolari, più o meno ovoidali, in gemmazione (questa è chiamata forma Y da yeast = lievito); oppure in forme variamente ramificate, di tipo pseudoifale, o addirittura, e più raramente, con un aspetto tipico a micelio (questa è chiamata forma M da mycelium = micelio). Abbiamo optato per l'inoculo in forma Y non solo per l'uniformità di sviluppo, per la facilità di conta e quindi di replicabilità sperimentale, ma anche perché è prevalente la bibliografia che individua la forma Y come iniziatrice del processo patologico [40]. Alcune forme di lievito « resistenti » all'attacco delle cellule del sistema reticolo-endoteliale, germinano e penetrano con le pseudoife nei tubuli renali, o li attraversano, o « perforano » la membrana dei polimorfonucleati che le hanno fagocitate [41].

Per ottenere la forma Y si parte da colture in agar malto di 48 h a 28 °C, che vengono trasferite in beute di brodo nutritivo glucosato, moderatamente agitate in shaker a 200 giri/min in cella termostatica a 28 °C per 20 h. Anche se gli animali da esperimento hanno una temperatura corporea tra i 37 °C ed i 38 °C, si è preferito preparare le colture da inoculare a 28 °C poiché, con la tecnica descritta, si hanno colture in forma Y molto uniformi ed abbondanti, in avanzata fase logaritmica; infatti la temperatura di 37 °C, usata da alcuni AA., è talvolta la temperatura massima, o molto vicina alla massima, di sviluppo di un lievito da esaminare. Con questo sistema abbiamo approntato colture di *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. viswanathii*, *C. clausenii*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. macedoniensis*, *C. cloacae*, *C. subtropicalis*, *C. novellus*, *C. sake*, *C. vanriji*, *C. maltosa*, *C. humicola*, *C. melibiosi*, *C. intermedia*, e inoltre di altri lieviti isolati da reperti clinici come *Rhodotorula rubra* e *Torulopsis glabrata*. Tutte le colture sviluppano benissimo in forma Y; *C. cloacae* talvolta forma gemme piuttosto tubulari; *C. humicola*, forma agglomerati pseudomiceliali, per cui rimane difficile l'inoculazione endovena. La conta in camera di Thoma-Zeiss della diluizione delle colture è stata più volte confrontata con la conta microbiologica mediante diluizioni seriali e piastramenti in agar malto (generalmente in triplicato). Con la conta microscopica si commette un errore che non è mai superiore al 5%; generalmente è tra il 2 e il 3%, con eccedenza del numero di cellule contate al microscopio rispetto al numero delle colonie contate in piastra.

Negli studi di patogenicità sperimentale abbiamo sempre seguito il criterio di abbinare alle nuove specie di *Candida* da esaminare, specie di lieviti patogene e non patogene (o finora ritenute tali), in modo da avere contemporaneamente due termini di paragone.

In più sedi [42, 43], si è molto dibattuto su questo criterio perché, a seconda dei termini di paragone usati, il giudizio di patogenicità su uno stesso ceppo in esame può essere diverso, così come può risultare diverso quando si modificano i dosaggi, le vie di inoculo, le specie animali, i tipi di modificazioni delle specie animali.

Abbiamo ritenuto opportuno escludere, dopo diverse esperienze, la *C. albicans* quale ceppo di raffronto patogeno poiché per la sua marcata atipia tra le *Candide* opportuniste (la più diffusa, la più virulenta, ad ecologia prevalentemente umana o animale, con peculiari caratteristiche morfologiche, come i tubuli, le clamidospore, le forme M nei tessuti invasivi) poteva condizionare o distorcere i giudizi di patogenicità rispetto ad altre *Candide*, che non avessero dato manifestazioni simili.

Abbiamo, pertanto, preferito usare come ceppo patogeno un ceppo a virulenza attenuata di *C. tropicalis*, rivelatasi, indipendentemente dal suo habitat, patogena per il topino se inoculata ad alte dosi [44]. Avviene infatti che *Candide* sicuramente patogene dal punto di vista clinico, responsabili di endocarditi e di setticemie, come la *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, inoculate endovena in topini, raramente producono malattie progressive, come pure è difficile dimostrare per queste specie la produzione di forme M e la conseguente penetrazione nei tubuli renali e in zone circostanti [35]. Anche noi, in esperienze comprendenti tali specie, abbiamo ottenuto risultati discordanti [45], con evidenze istologiche particolari e in organi diversi (per es. *C. krusei* mostra, in assenza di mortalità, processi infiammatori non localizzati, ma diffusi nel fegato e nel cervello). Quindi *Candide* patogene per l'uomo possono risultare ad una prima analisi non patogene per gli animali e viceversa. Risultati di questo tipo inducono ovviamente a tentare altre vie sperimentali. Una prima via è quella di maggiorare la dose dell'inoculo. Come già altri AA. [26, 31], abbiamo infatti più volte usato inoculi fino a 10^8 cellule; se l'inoculo è fatto con cellule in forma Y, un topino di 20 g sopporta benissimo tali dosi elevate senza che si verifichino forme infartuali o tromboemboliche, che del resto si evidenziano subito o dopo qualche ora dall'inoculazione. Un'altra via da seguire è quella della « modificazione dell'ospite » che, come si è già detto, può essere ottenuta con vari mezzi e che sembra valida e corretta, trattandosi di microrganismi opportunisti che estrinsecano la loro potenziale patogenicità proprio in organismi defedati o fisiologicamente squilibrati.

Per quanto riguarda i cortisonici, pur usufruendo di precisi dati bibliografici [31, 46-49] si sono dovuti stabilire tipo, quantità, modalità e tempi di

inoculazione. Le migliori risposte le abbiamo ottenute iniettando per via intramuscolare topini maschi albini con cortisonici ritardo (4 mg prednisone) 4 giorni prima e 3 giorni dopo l'inoculo con *Candida*. Per il forte abbassamento delle difese immunitarie si sono avuti sporadici casi mortali anche in topini cortisonizzati e non inoculati con *Candida* [50]. Ciò ha portato a suggerire per questo tipo di prove l'uso di ceppi animali « pathogen free ».

Ulteriori esperienze [51] condotte trattando topini con allossana e tetraciclina (2 mg di allossana per via e.v. 5 giorni prima dell'inoculo con *Candida* e somministrazione *per os* di 10 mg/g di ossitetraciclina cloridrato per 15 giorni) hanno evidenziato, rispetto ai controlli, una più accentuata moltiplicazione, specialmente nei reni, di *C. tropicalis* (ceppo attenuato) e di *C. maltosa* var. *subtropicalis*, mentre il *Saccharomyces cerevisiae*, usato come ceppo di controllo non patogeno, non si è mai moltiplicato negli animali trattati ed è scomparso dal circolo e dagli organi entro qualche giorno. Tale moltiplicazione di *Candida* in un organo fondamentale, con o senza danni, riparati o no, sembra da ritenersi un elemento di virulenza e comunque un elemento da prendere in considerazione ai fini della valutazione di patogenicità da parte del microrganismo. Appare necessario, pertanto, seguire l'evolversi dell'invasione e della malattia provocata dal lievito, mediante una numerosa serie di abbattimenti da eseguirsi, non dopo settimane, come alcuni suggeriscono, ma ad intervalli di ore, seguiti da conta microbica e da esami istologici ed istochimici dei principali organi. Pochi AA. hanno tuttavia studiato il problema seguendo questo modello [28, 31, 52, 53]. In un recente studio di patogenesi con *C. tropicalis* [54] abbiamo trovato, contando le cellule in rene e cervello (organi maggiormente invasi) e controllando microbiologicamente fegato, milza, polmoni, sangue ed urine, che dei 25 milioni di cellule inoculate, fino alla 9^a ora nel rene se ne trovavano meno di 10^4 e nel cervello meno di 10^3 .

Dopo 24 ore si è giunti a valori di centinaia di migliaia di colonie; in tempi successivi, specialmente nel cervello, il numero può diminuire. Tali risultati appaiono in accordo con quanto rilevato da Stone [55] per cui su 10.000 *Candida* che vanno alla « trincea epatica », su 1.000 che vanno al « filtro renale », su 100 che vanno ad altri tessuti solo una sopravvive, quando il sistema reticolo endoteliale è normalmente funzionante. Mentre *Saccharomyces cerevisiae* e *C. lipolytica*, per es. diminuiscono nel tempo, *C. tropicalis* e in minor misura *C. maltosa* var. *subtropicalis* si moltiplicano, specialmente nel rene e nel cervello dei topini sensibilizzati. Comunque la moltiplicazione aumenta da 10 a 100 volte a seconda della specie animale che si sceglie, delle sostanze che si inoculano, dell'organo che si esamina, dei tempi di abbattimento dall'inoculo, ecc. La moltiplicazione intesa in questo senso, confermata istologicamente da colonizzazione, e/o da richiami linfoistocitari si può considerare manifestazione di una malattia indotta. Il grado di moltiplica-

zione può quindi essere utilizzato come indice di maggiore o minore virulenza di un ceppo di *Candida*.

Altri sistemi, oltre a quelli della patogenicità diretta su animali, sono stati indicati da vari AA.: colture monostrato, intradermo-reazione, prove su embrione di pollo, ecc. L'embrione di pollo è stato studiato mediante inoculazione, in tempi diversi dello sviluppo embrionale, per via corion-allantoidea [56], per via endovenosa, per via amniotica [57], per via vitellina [58]. Visco ha riesaminato in modo globale [59] i diversi sistemi proposti ed ha concluso che: a) l'inoculo per via amniotica è da escludere perché tutti gli embrioni muoiono; b) l'inoculo per via corion-allantoidea dà scarse indicazioni di patogenicità, scarsa diffusione, mortalità non proporzionale agli inoculi scalari; c) l'inoculo in sacco vitellino eseguito entro la prima metà del ciclo embrionale, è da preferire per la gradualità delle risposte patogenetiche.

Sulla base di tali indicazioni abbiamo compiuto una serie di esperimenti [60] inoculando con varie *Candide*, a varie dosi, oltre 1.000 embrioni di pollo, dapprima a 6 giorni di età, poi per l'eccessiva sensibilità osservata, a 8 giorni; infatti dopo il nono giorno sembra che comincino a formarsi le gammaglobuline [61]. Le nostre esperienze ci inducono a ritenere che le prove su embrione di pollo, inoculato per via vitellina all'8° giorno di vita embrionale, possano surrogare le prove con conigli o con topi per *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*. I parametri della percentuale di mortalità e del tempo di sopravvivenza correlati alle dosi permettono di valutare per questi ceppi il grado di patogenicità e di virulenza. Per *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. utilis* e *C. maltosa* var. *subtropicalis* (che di questo secondo gruppo ha dato le maggiori percentuali di mortalità nei tempi più ristretti) non c'è stata relazione tra la patogenicità clinica accertata (o saltuaria patogenicità sperimentale sugli animali) e le risposte con gli embrioni di pollo [62].

Le manifestazioni di patogenicità delle *Candide* sono state attribuite a più cause: secondo Seelig [63] a probabile formazione di tossine; secondo altri AA. [64, 65] a glicoproteine; secondo Iwata e Coll. [66] alla candidossina, una profosfatasi letale per i topini; secondo Zaikina ed Elinov [67] ad una plasmacoagulasi; infine secondo Reinold e Coll. [68] ad una peptidasi esocellulare isolata da un ceppo di *C. albicans* in cui Staib [69] aveva evidenziato una attività proteolitica con agar-albumina umana. Staib [70] ha poi dimostrato che l'intensità della proteolisi *in vitro* è in sufficiente accordo con la patogenicità sui topini. Saltarelli e Coll. [71] al contrario non trovano una correlazione diretta tra patogenicità e proteolisi in ceppi di *C. albicans*: Budtz-Jørgensen [72] rileva che i ceppi patogeni sono proteolitici, ma che non c'è correlazione tra patogenicità clinica e aloni di proteolisi in agar albumina umana. Modificando non sostanzialmente la tecnica di Staib ab-

biamo condotto una serie di ricerche in tal senso [73], saggiando un buon numero di specie di *Candida*; si è constatato che l'ampiezza dell'alone di lisi in agar albumina (umana o bovina) non è strettamente correlata con la patogenicità sperimentale o con la patogenicità clinicamente accertata. La lisi, seppur variabile in intensità, sembra una caratteristica di tutti i ceppi patogeni appartenenti a *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, e di alcuni stipiti delle specie *macedoniensis*, *guilliermondii*, *krusei*. Di tutte le *Candide* del gruppo *sake* e *maltosa*, soltanto la *C. maltosa* var. *subtropicalis*, (sinonimo di *C. novellus* ATCC 20275 *nomen nudum* [74]) mostra una marcata e costante attività proteolitica. Non si è talvolta riscontrata proteolisi con ceppi di dimostrata patogenicità clinica, come non si è riusciti a dimostrare spesso la patogenicità sperimentale di ceppi di *Candida* sicuramente proteolitici. Si rimane ancora nel dubbio se l'attività proteolitica sia un carattere tassonomico utile come « marker » per un ceppo di particolare interesse, oppure una caratteristica legata ad una delle possibili azioni patogene delle *Candide*.

A conclusione quindi di questa lunga disamina che rappresenta una sintesi delle principali esperienze volte a studiare la patogenicità delle *Candide*, possiamo dire che alcuni punti sperimentali riportati nel « protocollo sperimentale di massima per l'accertamento della patogenicità diretta delle *Candide* » sono sviluppati e chiariti, mentre altri richiedono ulteriori approfondimenti. Sulla base degli elementi acquisiti riteniamo che prove di patogenicità delle *Candide* debbano comunque prevedere un « depistage » sul maggior numero possibile di specie animali, inoculando inizialmente il ceppo per via endovenosa, essendo la via più veloce ed efficace. In casi di risultati negativi o di difficile interpretazione, a nostro parere, potrebbe rivelarsi utile saggiare altre vie di inoculazione, quale l'intradermica, l'endoperitoneale, l'intramammaria, l'endovaginale. Se a livelli elevati di inoculo non si ottenessero chiare evidenze di patogenicità sarà opportuno procedere alla cortisonizzazione degli animali per evidenziare le capacità opportunistiche dei ceppi in esame. Le evidenze patologiche che suggeriamo di prendere in considerazione per una candidiasi accertata, saranno, oltre la morte, la presenza istologica di forme M (a somiglianza di ciò che si riscontra in *C. albicans* e *C. tropicalis* in organi fondamentali che per le *Candide* sembrano essere il rene, il cervello, il fegato, i polmoni, la milza, il cuore) accompagnata o meno da varie forme cellulari reattive; la moltiplicazione, dopo l'iniziale « clearance » in forma Y del microrganismo in almeno un organo tra quelli suddetti, ed infine l'accertata diagnosi di una malattia ripetibile sperimentalmente, attraverso il rilievo di dati clinici classici come reazioni febbrili, variazione del tasso glicemico o azotemico, effetti sulla pressione arteriosa, ecc., in altre parole tutto ciò che al clinico veterinario farebbe diagnosticare una malattia in atto o avvenuta. Inoltre sarà opportuno prendere in considerazione ogni lesione ripetuta e ripetibile in qualunque organo, anche se non si evidenziano

Candide, purché non si riscontri negli animali controllo; come pure ogni sintomo generalizzato riscontrato, non facilmente documentabile, ma osservabile clinicamente in più lotti di animali come incoordinazione motoria, torticollis, maneggio rotatorio, ecc.

Nei casi in cui sia difficile dimostrare sperimentalmente una patogenicità clinicamente accertata potrebbero essere di una qualche utilità: a) le prove su embrioni di pollo inoculando i lieviti in sacco vitellino all'8^o-9^o giorno; b) l'accertamento dell'attività proteolitica *in vitro* verso albumina umana o animale; c) le prove su linee cellulari umane, determinando la velocità di filamentazione e la velocità del danno citologico.

BIBLIOGRAFIA

1. BERKHOUT, C.M. 1923. De schimmelgeslachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*. Thesis Univ. of Utrecht.
2. CASTELLANI, A. 1937. *Manuale di Clinica Tropicale*. Ed. Rosenberg e Sellier, Torino.
3. WINNER, H.I. & HURLEY, R. 1964. *Candida albicans*. Ed. J. & A. Churchill Ltd, London.
4. EMMONS, C.W. 1969. Pathogenic yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, **35**: 113-127.
5. AJELLO, L. 1955. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science*, **123**: 876-879.
6. BATISTA, A.C., DE VASCONCELOS, C.T., DE LIMA, J.A. & SHOME, S.K. 1961. Yeast fungi from fruits of *Manaus* and their importance for the human mycopathology. *Publ. Inst. Micol. Univ. Recife* n. 329.
7. REDAELLI, P., CASTELLI, T. & CIFERRI, R. 1938. Presence of *Mycotorula albicans* and *Blastodendron krausii* in Italian home-made bread yeast. *Mycopathologia (Den Haag)*, **6**: 7-14.
8. VAN UDEN, N., DE MATOS, FAIA, M., & ASSIS-LOPES, L. 1956. Isolation of *Candida albicans* from vegetable sources. *J. Gen. Microbiol.* **15**: 151-153.
9. CIFERRI, R. 1959. *Introduzione alla Micologia Medica*. Ed. Cortina-Pavia.
10. HURLEY, R. 1967. The pathogenic *Candida* species: a review. *Rev. Med. Vet. Mycol.* **6**: 159-176.
11. HAUSMANN, D. 1875. Parasites des organes sexuels femelles de l'homme et de quelques animaux, avec une notice sur développement de l'*Oidium albicans* Robin. Translated by P.E. Walker. Paris: J.B. Bailliere.
12. MARWIN, R.M. 1949. Relative incidence of *Candida albicans* on the skins of persons with and without skin disease. *J. Invest. Derm.* **12**: 229-241.
13. KÄNCHER, K.H. 1956. Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenität und biologischen Wirkung der *Candida albicans* an Mensch und Tier. *Arch. Klin. Exp. Derm.* **202**: 424-448.
14. HESSELTINE, H.C., BORTS, I.C. & PLASS, E.D. 1934. Pathogenicity of *Monilia* (Castellani) vaginitis and oral thrush. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **27**: 112-116.

15. MAIBACH, H.I. & KLIGMAN, A.M. 1962. The biology of experimental human cutaneous moniliasis (*Candida albicans*). *Arch. Derm.* **85**: 233-254.
16. Op. citata 3, pag. 196.
17. REDAELLI, P. 1924. Experimental moniliasis. *J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 211-213.
18. BENHAM, R.W. 1931. Certain monilias parasitic to man. *J. Infect. Dis.* **49**: 183-215.
19. SEGRETAİN, G. 1947. Etude de la maladie expérimentale d'un lapin provoquée par la *C. albicans* agent probable d'une mycose pulmonaire. *Ann. Inst. Pasteur.* **73**: 674-676.
20. SELIGMANN, E. 1953. Virulence enhancement of *C. albicans* by antibiotics and cortisone. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **83**: 778-781.
21. ROTH, F.J. Jr., FRIDMAN, J. & SYVERTON, J.T. 1957. Effects of roentgen radiation and cortisone on susceptibility of mice to *C. albicans*. *J. Immunol.* **78**: 122-127.
22. STRAUSS, R.E. & KLIGMAN, A.M. 1951. The use of gastric mucin to lower resistance of laboratory animals to systemic fungus infections. *J. Infect. Dis.* **88**: 151-155.
23. SALVIN, S.B., CORY, J.C. & BEY, M.K. 1952. The enhancement of the virulence of *C. albicans* in mice. *J. Infect., Dis.* **90**: 177-82.
24. MANKOWSKI, Z.T. 1957. The experimental pathogenicity of various species of *Candida* in Swiss mice. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **19**: 548-570.
25. HASENCLEVER, H.F. 1959. Comparative pathogenicity of *C. albicans* for mice und rabbits. *J. Bacteriol.* **78**: 105-109.
26. MOURAD, S. & FRIEDMAN, L. 1961. Pathogenicity of *Candida*. *J. Bacteriol.* **81**: 550-556.
27. MACKENZIE, D.W.R. 1961. Yeasts from human sources. *Sabouraudia*. **1**: 8-15.
28. HASENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. 1961. Pathogenicity of *C. albicans* and *C. tropicalis*. *Sabouraudia*. **1**: 16-21.
29. LILLIE, R.D. 1948. Histopathologic Technic. The Blakiston Company, Philadelphia, pp. 143-145.
30. HURLEY, R. & WINNER, H.I. 1962. The pathogenicity of *C. tropicalis*. *J. Pathol. Bacteriol.* **84**: 33-38.
31. HASENCLEVER, H.F. & MITCHELL, W.O. 1962. Pathogenesis of *Torulopsis glabrata* in physiologically altered mice. *Sabouraudia*. **2**: 87-95.
32. SANDULA, J., KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A. & ZAMECNIKOVA, M. 1963. Genus *Candida* Berkhout II. Pathogenicity of the species *C. albicans* (Robin) Berkhout. *Folia Microbiol. Praha.* **8**: 313-317.
33. HURLEY, R. 1965. The pathogenicity of *C. stellatoidea*. *J. Pathol. Bacteriol.* **90**: 351-354.
34. ANDRIOLE, V.T. & HASENCLEVER, H.F. 1962. Factors influencing experimental candidiasis. I. Alloxan diabetes in mice. *Yale J. Biol. Med.* **35**: 96-112.
35. GOLDSTEIN, E., GRIECO, M.H., FINKEL, G. & LOURIA, D.B. 1965. Studies on the pathogenesis of experimental *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* infections in mice. *J. Infect. Dis.* **115**: 293-302.
36. SANDHU, R.S. & GUPTA, I.M. 1965. Pathogenicity of *C. viswanathii* for laboratory animals. A preliminary study. *Sabouraudia*. **4**: 37-40.
37. HURLEY, R. 1966. Pathogenicity of the genus *Candida*. In: *Symposium on Candida Infections* Winner H.I. and Hurley R. pp. 13-24. Edinburgh and London, E.S. Livingstone Ltd.

38. TUTTOBELLO, L. & PALLIOLA, E. 1976. Esperienze preliminari sulla patogenicità di diverse specie di *Candida*. *Vet. Ital.* **15**: 35-37.
39. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E. & ANTONUCCI, G. 1975. Prove di patogenicità di alcune specie di *Candida*. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **29**: 658-664.
40. MARDON, D.N., GUNN, J.L. & ROBINETTE, E. JR. 1975. Variation in the lethal response in mice to yeast-like and pseudohyphal forms of *C. albicans*. *Can. J. Microbiol.* **21**: 1681-1687.
41. LOURIA, D.B., BLEVINS, A., ARMSTRONG, D., BURDICK, R. & LIEBERMAN, P. 1967. Fungemia caused by «nonpathogenic» yeasts. *Arch. Intern. Med.* **119**: 247-252.
42. HOLZSCHU, D.L., CHANDLER, F.W., AHEARN, D.G. & AJELLO, L. 1977. Studies on potential pathogenicity of industrial yeasts for normal and cortisone treated mice. In: *Single-cell Protein—Safety for Animal and Human Feeding*. Garattini, S., Paglialunga, S. & Scrimshaw, S. (Eds.), Pergamon Press, pp. 20-29, Oxford 1979.
43. GARGANI, G. 1977. Models of pathogenicity for yeasts of the genus *Candida*. In: *Single-cell Protein—Safety for Animal and Human Feeding*. Garattini, S., Paglialunga, S. & Scrimshaw, S. (Eds.), Pergamon Press, pp. 30-38, Oxford 1979.
44. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E. & PESTALOZZA, S., 1977. Patogenicità sperimentale di ceppi di *C. tropicalis* su topini. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* **53**: 158-162.
45. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E., PESTALOZZA, S., & ANTONUCCI, G. 1976. Controllo di patogenicità su topino di *Candida* isolate da reperti umani. *Atti Soc. It. Sc. Vet.* **30**: 660-662.
46. SELIGMANN, E. 1953. Virulence enhancement of *C. albicans* by antibiotics and cortisone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83**: 778-781.
47. HURLEY, R. 1966. Experimental infection with *C. albicans* in modified hosts. *J. Pathol. Bacteriol.* **92**: 57-67.
48. LOURIA, D.B., FALLON, N., PROWNE, H.G. 1960. The influence of cortisone on experimental fungus infections in mice. *J. Clin. Invest.* **39**: 1435-1449.
49. HURLEY, D.L., BALOW, J.E. & FAUCI, A.S. 1975. Experimental disseminated candidiasis. II. Administration of glucocorticosteroides, susceptibility to infection, and immunity. *J. Infect. Dis.* **132**: 393-398.
50. PALLIOLA, E., PESTALOZZA, S., TUTTOBELLO, L., PICCININNO, G. & ANTONUCCI, G. 1977. Infezione sperimentale con *Candida* in topini cortisonizzati. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **31**: 799-801.
51. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E., ANTONUCCI, G. & MACRI, C. 1978. Risposte patogenetiche alle *Candida* in topini sensibilizzati con diversi metodi sperimentali. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **32**: (in stampa).
52. LOURIA, D.B., MARCA BUSE, BRAYTON, R.G. & FINKEL, G. 1966-67. The pathogenesis of *C. tropicalis* infections in mice. *Sabouraudia.* **5**: 14-25.
53. HURLEY, D.L., & FAUCI, S.A. 1975. Disseminated candidiasis. I. An experimental model in the guinea pig. *J. Infect. Dis.* **131**: 516-521.
54. PESTALOZZA, S. & TUTTOBELLO, L. 1978. Pathogenesis of *C. tropicalis* in mice. *Abstracts XII Intern. Congr. Microb. München* pp. 199-205.
55. STONE, H.H. 1976. *Candida* infection ... a growing problem. Guidelines to «Antibiotic therapy», 2, 2-3. The Upjohn Comp.

56. MOORE, M. 1941. The chorio-allantoic membrane of the developing chick as a medium for the cultivation and histopathologic study of pathogenic fungi. *Amer. J. Pathol.* **17**: 103-120.
57. NORRIS, R.F., SHOREY, W.K. & BONGIOVANNI, A.M. 1948. Lesions produced in chick embryos by *Candida* (*Monilia*) *albicans*. *Arch. Pathol.* **45**: 506-512.
58. NEWCOMER, V.D., WRIGHT, E.T. & TAMBEYN, E.E. 1952. The embryonated egg as a culture medium for the animal phase of *Coccidioides immunitis*. *J. Infect. Dis.* **90**: 258.
59. VISCO, G. 1959. Ricerche sulla candidosi sperimentale dell'embrione di pollo. Nota I. Le caratteristiche generali del processo. *Riv. Ist. Sierot. Ital.* **34**: 29-46.
60. ZAVATTIERO-CASTAGNOLI, O., TUTTOBELLO, L. & PALLIOLA, E. 1976. Patogenicità sperimentale di *Candida* su uova embrionate. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **30**: 663-665.
61. SCHECHTMAN, A.M. 1952. Physical and chemical changes in the circulating blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **55**: 85-98.
62. PARTRIDGE, B.M., ATHAR, M.A. & WINNER, H.I. 1971. Chick embryo inoculation as a pathogenicity test for *Candida* species. *J. Clin. Pathol.* **24**: 645-648.
63. SEELIG, M.N. 1966. Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defences. *Bacteriol. Rev.* **30**: 442-459.
64. MANKOWSKI, Z.T. 1968. Production of glycoprotein by *C. albicans* in a synthetic medium and its influence on the growth of newborn mice. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **34**: 113-118.
65. MASLER, L., SIKL, D., BAUER, S. & SANDULA, J. 1966. Extracellular polysaccharide-protein complexes produced by selected strain of *C. albicans*. *Folia Microbiol.* **11**: 373-378.
66. IWATA, K., UCHIDA, K. & ENDO, H. 1967 «Canditoxin» a new toxin substance isolated from a strain of *C. albicans*. I. Relationship between strains and virulence and condition for the toxic substance production. *Med. Biol. (Tokyo)* **74**: 345-355.
67. ZAIKINA, N.A. & ELINOV, N.P. 1968. Fungal plasmocoagulase. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **35**: 10-16.
68. REINOLD, H., FASOLD, H. & STAIB, G. 1968. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from a strain of *C. albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **167**: 399-406.
69. STAIB, F. 1965. Serum-proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia.* **4**: 185-193.
70. STAIB, F. 1969. Proteolysis and pathogenicity of *C. albicans* strains. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **37**: 345-348.
71. SALTARELLI, C.G., GENTILE, K.A. & MANCUSO, S.C. 1975. Lethality of *Candida* strains as influenced by the host. *Can. J. Microbiol.* **21**: 648-654.
72. BUDTZ-JÖRGENSEN, E. 1971. Proteolytic activity of *Candida* spp. as related to the pathogenesis of denture stomatitis. *Sabouraudia.* **12**: 266-271.
73. TUTTOBELLO, L. & DE BERNARDIS, F., 1978. Correlazione tra attività proteolitica *in vitro* e patogenicità di ceppi diversi di *Candida*. *Atti. Congr. Soc. Ital. Micr. Fuggi.* (In stampa).
74. TUTTOBELLO, L. 1978. Revisione tassonomica di *C. sake* e specie correlate. *Atti. Congr. Soc. Ital. Micr. Fuggi.* (In stampa).

Utilizzazione e significato di metodi immunodiagnostici ai fini della prevenzione e dell'accertamento di manifestazioni allergiche nei lavoratori addetti agli impianti per la produzione di biomasse da n-alcani

CLELIA COLLOTTI, GIULIANO GENTILI e GIUSEPPE VICARI

Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia,

In accordo con la classificazione di Coombs e Gell [1] si distinguono oggi cinque tipi principali di reazioni allergiche o di ipersensibilità: Tipo I (IgE-dipendente); Tipo II (provocata da anticorpi citotossici tessutipecifici); Tipo III (provocata da immunocomplessi); Tipo IV (ipersensibilità ritardata mediata da cellule); Tipo V (ipersensibilità stimolatoria);

Le biomasse ottenute dai derivati del petrolio mediante fermentazione ad opera di ceppi di *Candida* rientrano nella definizione di polveri organiche o biologiche e, in quanto tali, potrebbero potenzialmente provocare nell'uomo, in seguito ad inalazione ripetuta, manifestazioni allergiche. Pertanto, tali fermentazioni industriali rientrano nel campo di interesse della sanità pubblica [2], e in effetti recentemente sono state osservate manifestazioni asmatiche, verosimilmente di tipo immediato, in alcuni lavoratori di una fabbrica francese di tali proteine [3]. Sulla base di quanto oggi è noto si può ragionevolmente ipotizzare che le biomasse da n-alcani potrebbero dare luogo a due distinte categorie di allergopatie respiratorie, differenti per caratteristiche immunologiche, sintomatologia clinica e lesioni istopatologiche, anche se *a priori* non si possono escludere al momento altri tipi possibili di allergopatie, anche a carico di altri distretti, quali ad es. la cute. La prima di esse, tipica dei soggetti atopici, è costituita dalla classica asma bronchiale, mediata da anticorpi reaginici della classe IgE, con meccanismo immunologico di Tipo I. La seconda categoria, più frequente nei soggetti non atopici, è rappresentata dalla cosiddetta alveolite allergica estrinseca, o pneumopatia interstiziale granulomatosa da inalazione di polveri organiche, la cui patogenesi è attribuibile prevalentemente ad un meccanismo immunopatologico di Tipo III.

I principali caratteri distintivi tra le due sindromi allergiche sono indicati nella Tab. 1. In ambedue i tipi di allergopatie sono presenti alterazioni patologiche a carico del distretto polmonare; esse sono diverse e sono provocate dalla liberazione di mediatori chimici differenti. Ciascuna delle due allergopatie inoltre presenta una reattività immunologica di tipo diverso, che può essere messa in evidenza con tecniche immunologiche appropriate che rendono possibile una diagnosi differenziale, anche se va sempre tenuto presente che i differenti tipi di allergia spesso coesistono e possono essere anche interdipendenti. Nei pazienti affetti da asma è stata dimostrata la coesistenza di allergia di Tipo I e di Tipo III, mentre nell'alveolite allergica estrinseca dovuta ad ipersensibilità di Tipo III si può talora avere anche una componente di Tipo IV [4].

Nel presente rapporto verranno presi in esame:

- 1) i meccanismi immunopatologici che sono alla base delle due allergopatie respiratorie;
- 2) gli aspetti clinici delle due allergopatie, ovviamente in relazione a quanto è già noto dallo studio di sindromi similari provocate da altre polveri biologiche;
- 3) i metodi immunodiagnostici per lo studio di queste malattie.

TABELLA 1

**Principali caratteri distintivi tra l'asma allergica estrinseca
e l'alveolite allergica estrinseca**

Carattere	Asma allergica estrinseca	Alveolite allergica estrinseca
Meccanismo immunopatologico	Tipo I (talora anche Tipo II)	Tipo III (e/o Tipo IV ?).
Fattori predisponenti	Fattori genetici - Atopia.	Fattori genetici e ambientali.
Insorgenza dei sintomi dopo esposizione	Immediata (talora, per forme particolari, anche tardiva).	Semi-ritardata (da 4 a 6-8 ore).
Interessamento sistemico	Assente.	Abituale (con sintomatologia generale e febbre).
Reperti sierologici	Valori elevati di IgE. Reperto di IgE specifiche.	Anticorpi specifici precipitanti (IgG, IgM, IgA) a titolo elevato.
Test cutanei	Reattività immediata.	Reattività di tipo Arthus.
Test di provocazione bronchiale specifico	Reazione immediata (talora, per forme particolari, anche tardiva)	Reazione semi-ritardata.

MECCANISMI IMMUNOPATOLOGICI

Ipersensibilità di Tipo I (IgE-dipendente)

È questa la forma di ipersensibilità che si verifica nell'allergia classica o anafilassi. Essa è mediata da anticorpi reaginici della classe IgE specifici per l'allergene. Questi anticorpi si fissano per mezzo della loro porzione Fc ai mastociti, o ai granulociti basofili, e in seguito a combinazione con l'allergene danno luogo ad un processo di degranolazione di queste cellule con conseguente liberazione di istamina e di altre sostanze vasoattive. Nei polmoni la reazione scatta entro pochi minuti dalla combinazione dell'allergene inalato, o circolante, con i mastociti sensibilizzati con i corrispondenti anticorpi specifici della classe IgE. Questa combinazione dà luogo alla degranolazione delle cellule sensibilizzate e alla liberazione di istamina e di altre sostanze vasoattive, quali serotonina, SRS-A (*slow-reacting substance of anaphylaxis*) e varie kinine, con produzione di vasodilatazione, edema, aumento della secrezione mucosa e broncocostrizione. Non si ha distruzione cellulare, né partecipazione del complemento. Gli anticorpi reaginici della classe IgE sono glicoproteine di peso molecolare 200.000, a mobilità elettroforetica gamma I e con coefficiente di sedimentazione 8,2 S. La concentrazione di IgE nel siero varia da 100 a 700 ng per i soggetti normali fino a valori molto elevati, quali 2.600 ng, nei soggetti allergici. La IgE si può riscontrare anche nei secreti nasali, bronchiali e lacrimali, talora in concentrazioni anche superiori a quelle riscontrate nel siero. Questo dato, assieme a quello degli elevati livelli riscontrati in tali secreti nei soggetti allergici e al reperto di linfociti B produttori di IgE nelle stazioni linfatiche del sistema respiratorio e di quello digerente, fanno pensare ad una secrezione locale di tali immunoglobuline e ad un ruolo di queste IgE secretorie nei meccanismi di difesa e di infiammazione.

Ipersensibilità di Tipo III

Questa forma di ipersensibilità è un vero e proprio processo infiammatorio provocato dalla formazione di complessi di antigene e di anticorpo e, talora, di complemento. La fissazione di complemento da parte del complesso determina la produzione di anafilatossine quali prodotti di scissione di C3 e di C5, con conseguente liberazione di istamina e aumento della permeabilità vascolare. Contemporaneamente si ha anche produzione di fattori chemiotattici che attraggono polimorfonucleati, i quali fagocitano il complesso e liberano enzimi proteolitici ed enzimi attivatori di kinine con conseguente ulteriore aumento della permeabilità vascolare. Sia il complesso che il complemento determinano un'aggregazione di piastrine con liberazione

di amine vasoattive e formazione di microtrombi che causano ischemia e necrosi locali.

La formazione di immunocomplessi può dare luogo a quadri patologici diversi a seconda della composizione del complesso. In eccesso di antigene si formeranno dei complessi solubili che persisteranno in circolo fino a quando non verranno bloccati e depositati in particolari distretti dell'organismo, quali reni, articolazioni e cute. In eccesso di anticorpo, invece, l'immunocomplesso tende a precipitare rapidamente nel luogo di introduzione dell'antigene. Sperimentalmente, è stato possibile indurre reazioni da immunocomplessi a livello polmonare in ambedue le situazioni. McKinnon e Coll. [5] hanno provocato lesioni vascolari polmonari in conigli mediante inoculazione endovenosa di immunocomplessi. Tewksbury e Coll. [6] hanno riprodotto un'alveolite allergica estrinseca in cavie presensibilizzate con spore di *Conisporium corticale* mediante inalazione di tali spore.

ASPETTI CLINICI

Asma bronchiale estrinseca;

Le polveri biologiche possono stimolare la produzione di anticorpi IgE, soprattutto in soggetti atopici. L'asma bronchiale estrinseca è dovuta al contatto successivo con l'agente sensibilizzante che scatena una serie di reazioni immunologiche a livello polmonare. L'asma estrinseca si instaura preferenzialmente in soggetti con una predisposizione ereditaria alla sensibilizzazione ad allergeni, probabilmente a causa di difetti a carico della mucosa respiratoria, che determinano la produzione di anticorpi sensibilizzanti della classe IgE i quali si fissano sulla membrana cellulare dei mastociti della stessa mucosa. Il successivo contatto con l'allergene scatena la liberazione di sostanze vasoattive che inducono edema, broncocostrizione e ipersecrezione di muco da parte delle ghiandole mucose.

Il quadro anatomico-patologico dell'asma estrinseca è caratterizzato da ispessimento delle membrane basali dei bronchi, ipertrofia della muscolatura bronchiale, proliferazione delle ghiandole mucose bronchiali e intasamento mucoso dei bronchi. Le lesioni sono anche caratterizzate dalla presenza di un grande numero di eosinofili nei tessuti peribronchiali e nell'essudato bronchiale.

I pazienti sensibilizzati affetti da asma estrinseca presentano una storia di esposizione all'allergene, una risposta di tipo immediato alle prove intradermiche e una diminuzione immediata della capacità vitale con segni di ostruzione bronchiale al test di provocazione bronchiale specifico effettuato con aerosol di allergene. La maggior parte dei pazienti con asma estrinseca hanno valori sierici elevati di IgE. I loro leucociti rilasciano istamina dopo

contatto *in vitro* con l'allergene specifico ed il loro siero è in grado di sensibilizzare passivamente all'allergene specifico la cute di soggetti non allergici (test di Prausnitz-Küstner). I linfociti di questi pazienti inoltre, se coltivati *in vitro* in presenza dell'allergene specifico, vanno incontro a moltiplicazione e trasformazione blastica.

Alveolite allergica estrinseca

Il termine di alveolite allergica estrinseca è stato coniato da Pepys [7] per descrivere casi di malattia allergica di Tipo III (mediata da immunocomplessi) a carico del distretto polmonare provocata dall'esposizione agli antigeni più svariati, ma in genere rappresentati da polveri di microrganismi, quali *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, actinomiceti termofili e spore di miceti vari (Tab. 2). Il quadro clinico di alveolite allergica estrinseca può essere indotto anche da antigeni di origine animale (insetti, volatili, etc.) [8].

TABELLA 2

Principali alveoliti allergiche estrinseche ad etiologia micetica dimostrata

Malattia	Polvere organica	Antigene responsabile
Pneumopatia dell'agricoltore.	Pulviscolo di paglia muffita.	ATTINOMICETI TERMOFILI: <i>Micropolyspora faeni</i> , <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , <i>T. sacharii</i> , <i>T. viridis</i> , o <i>T. candidus</i> .
Pneumopatia da aria condizionata.	Contaminanti dell'aria condizionata.	<i>Idem</i> .
Pneumopatia dei coltivatori di funghi.	Terreni di coltura dei funghi muffiti.	<i>Idem</i> .
Bagassosi	Bagassa umida muffita.	<i>T. sacharii</i> , <i>T. vulgaris</i> .
Pneumopatia dei lavoratori del malto.	Pulviscolo di orzo (malto) muffito.	ASPERGILLI: <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i> .
Pneumopatia degli addetti alle lavorazioni del formaggio.	Pulviscolo di muffe del formaggio.	PENICILLI: <i>Penicillium casei</i> .
Pneumopatia degli addetti alla produzione di acido citrico.	Culture di <i>Aspergillus</i> inquinante.	<i>Penicillium</i> .
Suberosi	Pulviscolo di sughero muffito.	<i>Penicillium frequentans</i> .

La sintomatologia clinica rappresentata da episodi intermittenti di brividi, febbre, tosse e difficoltà respiratoria, si manifesta da 4 a 6 ore dopo l'inalazione della polvere biologica specifica. I pazienti sensibilizzati affetti da alveolite allergica estrinseca presentano una storia di esposizione all'antigene e una risposta di tipo Arthus alle prove intradermiche, anche se tali prove sono inficiate dal fatto che la maggior parte degli antigeni in causa hanno proprietà irritanti. Il siero di questi pazienti contiene quasi sempre anticorpi precipitanti specifici per gli antigeni causanti la malattia che possono venire dimostrati mediante tecniche di immunodiffusione *in vitro*. La conferma della diagnosi viene effettuata mediante il test di provocazione bronchiale specifico; la risposta si verifica in genere dopo alcune ore ed è caratterizzata da diminuzione della funzionalità polmonare, in assenza di segni di ostruzione bronchiale.

METODI IMMUNODIAGNOSTICI

La grande diffusione delle sindromi allergiche, soprattutto di quelle di Tipo I, nella popolazione mondiale, per la quale esse rappresentano una delle cause principali di morbidità, ha stimolato un rapido progresso delle conoscenze scientifiche in questo campo negli anni recenti, con la conseguente introduzione di nuove tecniche diagnostiche. Ciononostante, l'impiego di queste tecniche nella pratica clinica è solo agli inizi e una notevole confusione regna nel settore, soprattutto a causa di una carenza di standardizzazione di molte tecniche e dei relativi reattivi. Ad esempio, ciò che viene denominato «allergene» è in realtà costituito da una miscela complessa di molte molecole, delle quali alcune allergeniche ed altre no e comunque scarsamente o affatto caratterizzate chimicamente dal punto di vista sia qualitativo che quantitativo [9].

La tecnica di impiego più antico per la diagnosi di malattie allergiche è rappresentata dal test intradermico; tuttavia tale prova viene quasi sempre utilizzata in maniera errata senza una precedente standardizzazione degli antigeni e senza effettuare una titolazione quantitativa.

Il dosaggio delle IgE totali e quello delle IgE specifiche mediante il metodo RAST (radio-allergo-sorbent test) sono tra i metodi più importanti derivati dagli studi degli anni recenti. Il livello delle IgE totali ha, dal punto di vista diagnostico, un valore solo indicativo, mentre il livello delle IgE specifiche determinate con il RAST può in pratica sostituire le prove intradermiche ed è di grande valore diagnostico.

Nell'eventualità quindi di un'asma allergica estrinseca da polveri biologiche le tecniche diagnostiche di laboratorio comprendono il test intradermico, il RAST e il dosaggio delle IgE totali. Sia per il test intradermico che per il RAST è necessaria un'accurata standardizzazione degli antigeni.

Il test intradermico può avere un certo valore per la diagnosi differenziale tra asma estrinseca e alveolite allergica estrinseca (vedi Tab. 1). Tuttavia, nel caso di questa sindrome clinica la diagnosi di laboratorio viene basata principalmente sulla dimostrazione di anticorpi precipitanti allergene-specifici nel siero del paziente. Tale dimostrazione viene effettuata mediante tecniche di immunodiffusione; anche in questo caso è necessaria un'accurata standardizzazione degli antigeni.

I metodi immunologici su indicati sono metodi diagnostici specifici per l'accertamento delle sindromi allergiche sopra descritte. Tuttavia, nel caso particolare di soggetti addetti a lavorazioni industriali con microrganismi, anche in assenza di patogenicità di tali microrganismi, non può essere trascurato l'accertamento dello stato immunologico di base del soggetto, che si troverà nel corso del suo lavoro esposto a notevoli cariche microbiche. Pertanto, è consigliabile uno studio preventivo della funzione immunitaria di questi lavoratori, sia per quanto riguarda l'immunità cellulare (linfociti *T*), sia per quanto riguarda l'immunità umorale (linfociti *B*).

Tests per i linfociti T.

1) Conta dei linfociti totali del sangue periferico e, se necessario, biopsia dei linfonodi con particolare riguardo alle aree timo-dipendenti.

2) Test intradermico ad antigeni comuni (parotite, candida e streptochinasi-streptodornasi); prova di sensibilizzazione al dinitroclorobenzene (DNCEB).

3) Valutazione quantitativa delle risposte linfoproliferative *in vitro* ai mitogeni (PHA, ConA, linfociti omologhi e antigeni specifici).

4) Conta dei linfociti *T* con il test delle rosette *E*.

5) Valutazione della capacità dei linfociti *T* a produrre fattore di inibizione della migrazione dei macrofagi (MIF) e altre linfocine.

Tests per i linfociti B

1) Elettroforesi delle proteine sieriche, immunoelettroforesi e dosaggio delle immunoglobuline. Se necessario, effettuare anche la tipizzazione delle sottoclassi di IgG.

2) Titolazione delle isoemoagglutinine anti-A e anti-B e valutazione delle risposte primaria e secondaria ad antigeni comuni (morbillo, influenza, etc.).

3) Conta dei linfociti *B* con il metodo dell'immunofluorescenza.

- 4) Esame bioptico dei tessuti linfatici con particolare riguardo alle aree timo-indipendenti e/o alla presenza di plasmacellule nel midollo osseo.
- 5) Valutazione quantitativa della risposta linfoproliferativa *in vitro* al mitogeno di *Phytolacca americana*.

Il risultato di tali prove deve avere la dovuta considerazione nella valutazione dell'idoneità del soggetto esaminato ad una attività lavorativa che per sua natura espone all'inalazione e al contatto con polveri biologiche. Peraltro, nel caso particolare dei lavoratori degli impianti di produzione di biomasse da n-alcani, tale criterio è stato accettato dall'apposita Commissione di esperti nominata dal Ministro della Sanità (D.M. 21 giugno, 1977), la quale ha provveduto alla elaborazione di una scheda clinico-epidemiologica che include molti dei suddetti esami di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. COOMBS, R. R. A. & GELL, P. G. H. 1975. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: *Clinical Aspects of Immunology*. Gell, P. G. H., Coombs, R. R. A. & Lachmann, P. J. (Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 761-781.
2. AJELLO, L. 1979. Public health interest in fungi used in industry. In: *Single-Cell Protein Safety for Animal and Human Feeding*, Garattini, S., Paglialunga, S. & Scrimshaw, N.S. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 186-188.
3. CORNILLON, J., TOURAINE, J. L., BERNARD, J. P., LESTERLIN, P. & TOURAINE, P. 1975. Manifestations asthmatiques chez des ouvriers préparant des protéines alimentaires dérivées du pétrole. *Rev. Franc. Allergol.* 16: 17-23.
4. MCCOOMBS, R. P. 1972. Diseases due to immunologic reactions in the lungs. *New Engl. J. Med.* 286: 1186-1194, 1245-1252.
5. MCKINNON, G. E., ANDREWS, E. C., HEPTINSTALL, R. H. & GERMUTH, F. G. 1957. An immunohistologic study on the occurrence of intravascular antigen-antibody precipitation and its role in anaphylaxis in the rabbit. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 101: 258-271.
6. TEWKSBUURY, D. A., EMANUEL, D. A. & WENZEL, F. J. 1964. Experimental production of maple bark disease. *Clin. Res.* 12: 361.
7. PEPYS, J. 1969. Hypersensitivity diseases of the lungs due to fungi and organic dusts. (*Monographs in Allergy*, vol. 4), Basel. S. Karger.
8. GIULIANO, G. 1978. Alveoliti allergiche estrinseche e pneumopatie da ipersensibilità. In: *Immunologia Clinica e Allergologia*, Serafini, V. (Ed.), USES, Firenze, pp. 532-578.
9. ROSE, N. R. & FRIEDMAN, H. 1976. *Manual of Clinical Immunology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Significato delle prove nutrizionali sulle bioproteine

GIOVANNI SERLUPI CRESCENZI e SERAFINA SALVATI (*)

Laboratorio degli Alimenti

1. - INTRODUZIONE

La qualità nutrizionale delle proteine dovrebbe rispecchiare le loro capacità di soddisfare le esigenze fisiologiche di un organismo rendendo presenti simultaneamente nel luogo della sintesi proteica quantità adeguate di tutti gli amminoacidi.

Le proteine, dal punto di vista nutrizionale, differiscono principalmente per il loro contenuto di amminoacidi essenziali, intendendo come tali quelli che l'organismo non è in grado di sintetizzare e che quindi debbono obbligatoriamente essere introdotti con la dieta.

La valutazione della qualità delle proteine può essere fatta con metodi sia chimici che biologici. I primi sono basati sulla determinazione della composizione in amminoacidi. L'indice chimico («chemical score») viene definito facendo innanzitutto la somma delle quantità di tutti gli amminoacidi essenziali. Per ognuno di essi viene quindi calcolato il rapporto fra il suo contenuto e la somma precedentemente calcolata. Il rapporto così ottenuto viene paragonato a quello di una proteina di riferimento e viene espresso come per cento.

L'amminoacido per il quale tale rapporto è più basso è quello limitante ed il suo rapporto è la misura dell'indice chimico. Tale indice rappresenterebbe quindi la misura della capacità di una proteina di fornire gli amminoacidi essenziali alla sintesi proteica di un organismo riferita a quella di una proteina supposta «perfetta» che viene presa come standard.

Per l'uomo era stata scelta come standard in sede FAO la composizione dell'uovo intero in quanto le proteine in esso contenute sono digerite ed utilizzate completamente nel ratto in accrescimento, in quello adulto, nel cane e nell'uomo. Inoltre, la capacità di promuovere la crescita delle proteine dell'uovo non aumenta in seguito ad integrazione con amminoacidi essenziali. È evidente che quest'ultima considerazione si applicherebbe

(*) Ospite del Laboratorio degli Alimenti.

anche se qualcuno degli amminoacidi essenziali fosse in eccesso. Infatti fu ben presto riconosciuto che la quantità di amminoacidi solforati era eccessiva e fu perciò definito (sempre in sede FAO) un nuovo standard basato sulla valutazione dei presunti fabbisogni giornalieri (Tab. 1). Peraltro il fabbisogno dei diversi amminoacidi essenziali differisce da specie a specie, cambia in relazione alle diverse età e alle diverse condizioni fisiologiche dell'organismo, può essere diverso da individuo a individuo. La sua determinazione è perciò ancora materia di controversia.

Il contenuto dei diversi amminoacidi essenziali non è peraltro sufficiente a definire il valore nutrizionale di una proteina poichè si deve tener conto della digeribilità e della possibilità che i diversi amminoacidi vengano liberati durante la digestione in misura ed a velocità diverse. Inoltre l'indice chimico non tiene conto della presenza degli altri amminoacidi essenziali e dell'influenza di altri componenti non azotati della dieta.

Il metodo ufficiale usato negli Stati Uniti e nel Canada detto PER (Protein Efficiency Ratio) è basato sulla incorporazione della proteina in esame al 10 % in una dieta apteica che viene somministrata a ratti in accrescimento, mentre a un gruppo di ratti di controllo viene somministrata una dieta analoga in cui la proteina in esame viene sostituita dal 10 % di caseina. Per ognuno dei due gruppi viene misurato l'incremento del peso corporeo per grammo di proteina ingerita.

Il PER della proteina è dato dall'incremento di peso prodotto dalla proteina in esame riferito a quello della caseina fatto uguale a 2.5. Esso

TABELLA 1

Standard FAO

AMMINOACIDO	g/16g N ₁
Isoleucina	4,3
Leucina	4,9
Lisina	4,3
Metionina + Cisteina	4,3
Fenil-alanina	2,9
Treonina	2,9
Triptofano	1,4
Valina	4,3
TOTALE	29,3

fornisce risultati variabili, e non riproducibili in differenti laboratori. Inoltre non tiene conto delle variazioni di composizione del corpo che possono verificarsi in conseguenza di fattori diversi e non tiene conto delle quote di proteine necessarie al mantenimento.

Nell'NPR (Net Protein Ratio) per tener conto della quota proteica necessaria al mantenimento, si aggiunge all'incremento di peso misurato la diminuzione di peso che si osserva in un gruppo di ratti alimentati con la stessa dieta priva di proteine e si divide per la quantità di proteina ingerita.

Alcune metodologie, per tener conto delle variazioni di composizione dell'organismo si basano sulla determinazione dell'azoto introdotto con la dieta e di quello eliminato con le feci e le urine. La differenza fra questi due valori costituisce l'azoto fissato. Il rapporto fra l'azoto fissato e quello somministrato costituisce il « valore biologico ». Se corretto per la perdita di azoto in animali a dieta aproteica si ottiene l'NPU (Net Protein Utilization).

Quest'ultimo è probabilmente il parametro più attendibile tra tutti quelli citati, ma non tiene ancora conto del fatto che, variando la quantità di una proteina aggiunta nella dieta, la correlazione fra aumento del peso corporeo o dell'azoto fissato, comunque valutati, e la dose di proteina somministrata è lineare solo entro un certo campo di dosi. Inoltre, anche nel tratto lineare il coefficiente angolare della retta di regressione non è certamente lo stesso per le diverse proteine; infatti la risposta metabolica a variazioni percentuali di amminoacidi diversi non è necessariamente uguale.

Sono stati perciò recentemente proposti per la valutazione del valore biologico delle proteine metodi a dosi multiple basati sul confronto dell'inclinazione della curva dose risposta. Il confronto delle pendenze viene fatto ovviamente nel tratto lineare della curva che corrisponde alle dosi più basse. Infatti aumentando la quantità di proteina somministrata con la dieta si raggiunge il livello corrispondente al fabbisogno anche per gli amminoacidi limitanti e le curve tendono a livellarsi.

Un sommario dei vari metodi è riportato nella Tab. 2, che è stata ripresa dalla rassegna di Spadoni [1] dove i vari metodi sono approfonditamente discussi. Anche questi metodi sono soggetti a critiche perchè sembra che la pendenza della curva dose risposta per l'accrescimento non sia la stessa di quella per il mantenimento.

Sembra di poter concludere che nessun metodo può essere considerato pienamente soddisfacente e che specialmente nel caso dell'introduzione di nuove fonti proteiche la valutazione dovrebbe essere fatta con uno dei metodi a multipla dose che tenga possibilmente conto dell'azoto fissato.

Lo studio comparato dell'andamento, se interpretato mediante il confronto con l'indice chimico e con i dati sulla digeribilità, può dare indicazioni per rilevare la presenza di fattori tossici o comunque anti-nutrizionali presenti

Principali metodi in uso per la valutazione della qualità proteica [1]

1. - Metodi a dose singola di proteine

1.1. - Basati sulla variazione di peso:

PER (indice di efficienza proteica) guadagno in peso per grammo di proteina consumata (Osborne e Mendel - 1917);

NPR (rapporto proteico netto) guadagno in peso più perdita di peso con una dieta priva di proteine per grammo di proteine consumate (Bender e Doel - 1957).

1.2. - Basati sulla ritenzione di azoto:

VB (valore biologico) frazione dell'azoto assorbito trattenuto dall'organismo (Thomas - 1909);

NPU (utilizzazione proteica netta) differenza dell'azoto corporeo finale meno controllo non proteico (Miller e Bender - 1955).

2. - Metodi a dose multipla di proteine

NGI (indice di accrescimento per l'azoto) inclinazione della retta che descrive l'andamento della crescita in funzione del consumo di proteine a partire dal livello zero di proteine (Allison - 1959);

PV (valore proteico) inclinazione della retta che descrive l'andamento della risposta (crescita, H₂O, N) in funzione del consumo di proteine per il solo tratto lineare (Sammonds ed Hegsted - 1977).

RNV (valore nutritivo relativo) rapporto tra inclinazione della retta per la proteina test e inclinazione della retta per la proteina di riferimento determinata come per NGI (Hegsted, Nett e Worcester - 1968).

RPV (valore proteico relativo) come RNV ma l'inclinazione della retta calcolata come per il PV (Sammond ed Hegsted - 1977).

nella proteina in esame. Per la corretta interpretazione dei dati occorre inoltre tenere conto degli apporti non proteici che le nuove fonti proteiche contengono e che cambiando il valore calorico della dieta o comunque variando i rapporti reciproci fra diversi fattori della dieta, ad esempio con apporti vitaminici od ormonici o con l'introduzione di componenti inusuali, possono influire direttamente o indirettamente sull'utilizzazione della quota proteica oltre a dare effetti biologici più o meno desiderabili.

Nel caso delle « bioproteine » solo il 45 % del peso è costituito da proteine, mentre il restante 55 % è formato da grassi, zuccheri semplici e ammino-zuccheri, chitina, fosfolipidi, steroidi, vitamine ecc. Ognuno di questi com-

ponenti presenti insieme alle proteine fornisce un apporto calorico non indifferente e può avere attività fisiologiche che debbono essere rilevate per escludere la presenza di effetti nocivi a lungo termine.

Nel caso della tossicologia alimentare, a differenza di quella classica, non è possibile mettere in evidenza effetti di piccola entità con la somministrazione di dosi molto superiori a quelle d'uso. Infatti l'aumento nella dieta di uno dei componenti al di sopra di certi limiti provoca effetti negativi, causati da squilibri nutrizionali, che interferiscono nella valutazione degli effetti tossici. Per le farine di pesce è stato proposto lo studio tossicologico di frazioni estratte con solventi diversi nella previsione di poterne somministrare dosi esagerate che permettono lo studio tossicologico dei vari componenti [2]. Solo dall'integrazione dei risultati di tutti questi studi potrà darsi un giudizio definitivo su qualsiasi nuova fonte alimentare.

La scienza alimentare moderna deve evitare tragedie come le epidemie di pellagra che si ebbero nel XVI secolo con l'introduzione del mais dal Messico in Europa. Infatti in Europa la macinazione grossolana e la diversa alcalinità dell'acqua di cottura non rendevano disponibile la niacina, che veniva invece liberata coi metodi di cottura usati dagli amerindi.

2. - COMPOSIZIONE CHIMICA DELLE BIOPROTEINE

Il contenuto medio di azoto [3, 4] sia per la Toprina che per il Liquipron è del 9,5 %; moltiplicando questo valore per il fattore 6,25 si calcola un contenuto proteico del 60 % e oltre. In realtà il contenuto in amminoacidi ottenuto per idrolisi completa, ammonta al 45 %. Questo è il contenuto proteico reale delle bioproteine.

L'azoto non giustificato dal contenuto di proteina è dovuto alla presenza di acidi nucleici in quantità elevate e di composti azotati legati alla parete cellulare.

Nella Tab. 3 sono riportati gli indici chimici del Liquipron e della Toprina paragonati a quelli di altre fonti proteiche. L'indice delle bioproteine è di 60, leggermente inferiore a quello della caseina che ammonta a 64. Amminoacidi limitanti sono quelli solforati.

Nel valutare le prove nutrizionali si deve, quindi, tener presente che:

- 1) il contenuto proteico è inferiore a quello ottenuto moltiplicando il contenuto di azoto per 6,25;
- 2) insieme alle proteine vengono aggiunti alla dieta acidi nucleici, fosfolipidi, carboidrati con un proprio apporto calorico;
- 3) l'indice chimico è inferiore a quello della caseina.

Indice chimico

AMMINOACIDI ESSENZIALI	Toprina	Liquipron	Farina di soia	Farina di pesce	Caseina	Standard FAO - 1971
Isoleucina	94	105	119	98	104	100
Leucina	92	89	97	98	98	100
Lisina	111	110	104	101	109	100
Metionina + Cisteina .	62	58	70	93	64	100
Fenilalanina + Tirosina	129	120	115	120	114	100
Treonina	101	110	88	93	75	100
Triptofano	102	119	133	99	65	100
Valina	93	90	88	92	125	100

3. - DIGERIBILITÀ IN VIVO

Nella Tab. 4 sono riportati i dati di digeribilità dei vari componenti del prodotto «Toprina» in diverse specie animali. I dati mostrano valori accettabili che vanno dall'80 % al 90 % per le proteine mentre sono più bassi per i grassi.

Esperimenti sul prodotto «Kaneptron» della Kanegafuchi giapponese (Tab. 5) hanno mostrato che nel tratto digestivo di varie specie animali sono presenti enzimi capaci di attaccare anche le pareti cellulari dei lieviti cresciuti su n-paraffine. Tuttavia fotografie del contenuto di varie porzioni dell'intestino hanno mostrato che residui delle pareti cellulari non completamente digeriti sono ancora presenti nel retto [5]. Purtroppo il contenuto di azoto di questi residui è difficilmente determinabile. I dati relativi alla digeribilità *in vitro* della Toprina sono descritti in un altro articolo di questo fascicolo (Morisi e Coll. pag. 491).

4. - PROVE SPERIMENTALI DI NUTRIZIONE

4.1 - Prove nutrizionali.

La determinazione del PER non ha dato maggiori informazioni sulla qualità delle bioproteine data la limitatezza di questo test già precedentemente discusso. La Tab. 6 mostra i risultati rielaborati da noi di un test

TABELLA 4

**Energia metabolizzabile e digeribilità delle SCP
aggiunti a diversi livelli nella dieta di differenti specie animali**

SPECIE ANIMALE	Energia metabolizzante	DIGERIBILITÀ				
		Grassi	Proteine	Materiale organico	Materiale secco	
Polli (1° periodo)	C	2.877	76,7	85,6	80,1	77,6
	15	2.841	79,3	82,2	77,7	75,6
	30	2.750	75,8	80,2	74,4	73,0
Polli (2° periodo)	C	2.968	79,7	86,0	81,8	79,3
	15	2.918	82,2	84,4	79,7	77,8
	30	2.863	81,7	81,7	76,9	75,4
Polli (1° periodo)	C	2.938	83,0	84,5	83,3	—
	15	2.945	82,5	84,0	82,5	—
	30	2.942	79,7	83,9	81,8	—
Polli (2° periodo)	C	—	81,4	85,4	83,4	—
	15	—	82,9	85,1	83,1	—
	30	—	81,2	84,9	82,7	—
Polli (1° periodo)	C	2.896	74,8	80,8	80,0	—
	15	2.983	78,2	85,9	80,4	—
	30	2.970	79,7	86,7	80,4	—
Polli (2° periodo)	C	2.994	80,3	80,5	81,1	—
	15	3.136	84,3	86,8	83,0	—
	30	3.113	84,6	87,5	82,8	—
Maiali (I esperimento)	C	3.084	68,25	82,41	85,44	83,19
	20	3.222	74,80	84,30	86,53	84,51
Maiali (II esperimento - 1° periodo)	C	3.014	60,81	81,18	84,71	82,65
	20	3.169	70,14	84,35	86,08	84,16
Maiali (II esperimento - 2° periodo)	C	3.107	60,78	86,96	86,12	83,87
	20	3.297	72,64	88,92	87,60	85,24
Maiali (1° periodo)	C	3.014	60,8	81,2	84,7	82,6
	20	3.169	70,1	84,4	86,1	84,2
Maiali (2° periodo)	C	3.107	60,8	86,1	86,1	83,9
	20	3.297	72,6	88,9	87,6	85,2
Maiali (1° periodo)	C	3.069	65,3	83,5	85,8	83,5
	20	3.215	71,5	87,0	87,0	84,7
Maiali (2° periodo)	C	3.073	58,3	83,7	85,6	82,9
	20	3.246	69,5	88,1	87,2	84,7
Maiali	C	—	—	88,6	—	90,2
	30	—	—	87,7	—	89,1
Vitelli	C	—	93,5	94,9	96,6	96,3
	20	—	93,4	91,8	93,3	93,1
	20	—	94,1	90,6	94,4	93,9
Vitelli (1° periodo)	C	4.629	89,8	91,3	94,6	94,0
	25	4.238	85,3	82,2	89,0	88,5
Vitelli (2° periodo)	C	4.887	97,4	95,6	97,9	97,4
	25	4.475	93,2	88,1	92,9	92,4

**Distribuzione e localizzazione dell'attività della proteinasi, chitinasi
e β -1-3 glucanasi negli organi digestivi degli animali trattati**

ANIMALE TRATTATO	Organo	Proteinasi	Chitinasi	β -1-3 Glucanasi
Ayu	Stomaco	++	-	-
	Piloro	+++	-	+++
	Intestino	+++	-	+
Carpa	Intestino	+	+	t
	Stomaco	+	+++	t
Trota variegata	Piloro	++	-	t
	Intestino	++	t	+
	Stomaco	++++	++++	-
Anguilla	Intestino	+	t	-
	Stomaco	+++	+++	-
Pollo	Ventriglio	+	+	-
	Pancreas	++++	t	-
	Duodeno	+	+	-
	Piccolo Intestino	++	+	-
	Ceco	+	+	-
	Stomaco	+++	++	t
	Pancreas	++++	+++	-
Maiale	Duodeno	t	t	t
	Ileo	t	t	t
	Ceco	t	t	+-
	Retto	t	t	++
	Colon	t	t	++

++++ : Molto forte. +++ : Forte. ++ : Normale. + : Visibile. t : Tracce. - : Non visibile.

TABELLA 6

**PER ottenuti alimentando ratti con dieta contenente caseina
e con dieta contenente SCP**

% DI PROTEINA NELLA DIETA	CASEINA			SCP			SCP + MET		
	Con- sumo g/die	Au- mento g/die	PER	Con- sumo g/die	Au- mento g/die	PER	Con- sumo g die	Au- mentu g/die	PER
	<i>Maschi</i>								
10	9,5	2,16	2,27	13,2	1,45	1,1	16,4	3,6	2,2
20	13,9	2,6	1,87	15,0	2,4	1,6	—	—	—
	<i>Femmine</i>								
10	8,9	1,8	2	8,15	0,94	1,15	8,19	1,68	2,05
20	—	—	—	14,9	2,2	1,47	—	—	—

eseguito sul ratto col prodotto Liquipron [6]. Aggiunto alla dieta a concentrazione pari al 10 % il materiale mostra un PER che è circa metà di quello della caseina, mentre l'indice chimico è inferiore solo del 10 %. Anche tenendo conto che il contenuto proteico è di circa il 75 % di quello usato per calcolare la preparazione della dieta, il PER del Liquipron risulta troppo basso rispetto a quello della caseina. Le prove eseguite con il 20 % di proteina nella dieta non apportano ulteriori informazioni dato che a queste concentrazioni l'apporto di aminoacidi limitanti è sufficiente ed intervengono caso mai fenomeni di squilibrio dovuti all'eccesso degli altri aminoacidi.

L'aggiunta degli aminoacidi solforati porta il PER del Liquipron a valori confrontabili a quelli della caseina. Tuttavia poichè anche la caseina è carente degli stessi aminoacidi, il paragone doveva essere fatto con diete contenenti caseina e addizionate degli stessi aminoacidi.

Nei ratti usati per queste prove sono stati osservati fenomeni di nefrocalcosi che non venivano eliminati neanche dalla aggiunta degli aminoacidi solforati.

La nefrocalcosi invece non si osservava nei ratti alimentati con diete contenenti al posto del Liquipron lieviti delle specie *T. utilis* e *S. cerevisiae* essiccati.

4.2 - Prove zootecniche

Con i vari tipi di proteine unicellulari (SCP) sono state effettuate decine di prove zootecniche su varie specie di animali da allevamento: vitelli, vacche da latte, polli da carne, galline ovaiole, ovini, suini, pesci, quaglie. Non è possibile riportare in una breve rassegna l'enorme massa di dati ottenuti, metteremo perciò in evidenza solo i dati che potrebbero portare qualche informazione sulla sicurezza d'impiego di questi prodotti. Bisogna tuttavia sottolineare che le prove zootecniche sono da considerare di rilevanza esclusivamente economica e possono perciò dare solo vaghe indicazioni sulla innocuità. Negli esperimenti sul pollo da carne l'incremento ponderale ottenuto con le diete a più alto contenuto di SCP è risultato inferiore a quello ottenuto con le diete di controllo. Ciò è stato visto sia con il Liquipron al Department of Poultry Science dell'Università della Florida [7] che con la Toprina [8].

TABELLA 7

a) Peso medio del corpo a 4 e 7 settimane [8]

	ETÀ 4 settimane		ETÀ 7 settimane	
	Razione data come pellet g	Razione data come pellet %	Razione data come pellet g	Razione data come pellet %
	I Controllo	776	100	1.710
II 28 % Lievito tipo G + Se	714	92,0	1.622	94,9
III 28 % Lievito tipo G + Se + arginina .	743	95,7	1.660	97,1

(b) Conversione nel cibo a 4 e 7 settimane e mortalità a 7 settimane [8]

	Conversione cibo				Numero di uccelli morti 0-7 settimane
	ETÀ 4 settimane		ETÀ 7 settimane		
	Razione data come pellet abs.	Razione data come pellet %	Razione data come pellet abs.	Razione data come pellet %	
I Controllo	1,47	100	1,90	100	6
II 28 % Lievito tipo G + Se	1,56	106,1	1,89	99,5	11
III 28 % Lievito tipo G + Se + arginina	1,52	103,4	1,87	98,4	8

Dati sperimentali (Tab. 7) sembrano indicare che l'incremento ponderale possa essere migliorato, almeno nella Toprina, con l'aggiunta di arginina e di selenio e con una migliore granulazione. Purtroppo l'uso costante di un valore proteico troppo alto perchè calcolato moltiplicando per il fattore 6,25 il contenuto di azoto non permette una corretta interpretazione dei risultati. Alcuni AA. [9] hanno messo in relazione la deficienza in Se con la comparsa di fenomeni di nefrocalcosi. I dati di questa tabella, facendo supporre una deficienza di Se nella dieta, potrebbero far attribuire a questa deficienza i fenomeni osservati sia in alcune prove zootecniche sia nelle prove nutrizionali sui ratti precedentemente accennate.

L'ultima osservazione emersa dalle prove zootecniche è la comparsa nelle carni degli animali alimentati con SCP di componenti caratteristici provenienti da queste. I lieviti durante la fermentazione utilizzano le n-paraffine ossidandone l'atomo di carbonio terminale. Dalle paraffine a numero dispari di atomi di carbonio si formano così acidi grassi dispari. Il prodotto finale contiene perciò alte quantità (50 % degli acidi grassi pari al 3,5 % del peso secco) di acidi grassi a catena dispari. Esso contiene inoltre da 0,3 a 0,5 % di n-paraffine provenienti dal terreno di coltura. Questi composti vengono incorporati nei tessuti degli animali alimentati con SCP. È perciò necessario assicurarsi della innocuità di questa incorporazione.

4.3 - Prove nutrizionali sulla frazione lipidica

La presenza di acidi grassi inusuali, come quelli a numero dispari di atomi di carbonio, la possibilità che i fenomeni di nefrocalcosi siano dovuti alla presenza di sostanze steroidee con attività ormonale, la presenza di n-paraffine hanno focalizzato l'attenzione sulla frazione lipidica. Le bioproteine contengono circa il 12 % di lipidi estraibili con cloroformio-metanolo (2 : 1) v/v. La frazione lipidica contiene il 70 % di fosfolipidi se estratta dalla Toprina e il 50 % se estratta dal Liquipron. Essa contiene circa il 70 % di acidi grassi dei quali approssimativamente la metà è a catena dispari. Il contenuto di steroli è del 3 % nella Toprina e del 6-10 % nel Liquipron.

Secondo il suggerimento di Friedman e Coll. [2] la frazione lipidica è stata incorporata in una dieta che veniva somministrata a ratte femmine durante la gravidanza e l'allattamento ed ai loro figli dallo svezzamento fino a 60 giorni. In esperimenti con diete sintetiche contenenti il 5 % della frazione lipidica estratta dalla Toprina, come sola sorgente di grassi, si è visto che il coefficiente di digeribilità dei lipidi era superiore al 95 %. L'efficienza di diete contenenti questi lipidi nel promuovere la crescita non differiva da quella di diete contenenti la stessa percentuale di margarina. La presenza della frazione lipidica di Toprina non aveva influenza nè sulla

numerosità delle nidiate, nè sulla velocità di crescita dei rattini dopo lo svezzamento, nè sulla composizione della carcassa dei ratti a 60 gg [10]. Acidi grassi dispari venivano incorporati a vari livelli nei diversi tessuti anche in funzione della quantità presente nella dieta. Con diete contenenti il 10 % di frazione lipidica si raggiungevano livelli di acidi grassi dispari nei diversi organi piuttosto elevati, come mostrato nella Tab. 8 [11, 12]. In questi il contenuto di acidi grassi dispari arrivava al 25 % del totale degli acidi grassi, mentre nel cervello tale contenuto, anche nei neonati (cioè prima della formazione della barriera emato encefalica) non superava il 3,2 % contro lo 0,6 % dei controlli. L'incorporazione non era limitata ai grassi di deposito poichè anche nelle membrane mitocondriali e microsomiali di fegato e di cuore il livello di acidi grassi dispari era analogo a quello trovato nello stesso organo. Nei mitocondri la fosforilazione ossidativa e il trasporto attivo del calcio non sembravano alterati [13]. In prove « di comportamento », eseguite sui ratti alimentati con diete contenenti i lipidi della Toprina, si osservava una comparsa precoce di alcuni riflessi (Tab. 9) la cui maturazione viene comunemente attribuita alla mielinizzazione. Anche l'attività elettrocorticografica (Fig. 1) e quella motoria (Fig. 2) mostrano un'accelerazione della maturazione rispetto ai controlli [14]. Anche negli esperimenti con le diete contenenti la sola frazione lipidica estratta dalle SCP si sono osservati fenomeni di nefrocalcosi specialmente nelle madri sacrificate dopo il parto e nei rattini allo svezzamento. Il fenomeno non era osservabile nei controlli alimentati con le stesse diete in cui la margarina sostituiva la frazione lipidica estratta dalla Toprina.

TABELLA 8

Percentuale degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio negli organi e nei tessuti di ratti alimentati con il 5 % ed il 10 % di lipidi della Toprina e della margarina

ETÀ	FEGATO		CUORE		RENI		CARCASSA O TESSUTO ADIPOSO		CERVELLO		
	5 %	10 %	5 %	10 %	5 %	10 %	5 %	10 %	5 %	10 %	
Nascita . . .	T	—	—	—	—	—	6,3	10,4	1,4	2,4	
	C	—	—	—	—	—	tr	2,7	0,8	0,8	
Svezzamento	T	13,7	13,9	10,8	13,5	12,2	16,5	13,1	25,0	2,0	3,2
	C	1,1	1,1	0,8	0,6	0,5	0,8	0,7	1,7	0,6	0,9
60 giorni dopo lo svezzamento . . .	T	15,0	16,2	13,8	14,4	12,5	14,6	20,8	27,2	1,3	1,9
	C	1,3	1,0	0,6	0,5	0,8	0,6	0,6	0,6	0,4	0,2

TABELLA 9

Misure di riflessi e di comportamento (giorni di comparsa)

COMPORAMENTO	Controlli	Tests
Ricerca capezzolo (<i>rooting</i>)	1,0 ± 0	1,0 ± 0
Avversione del dirupo	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5
Crescita di peli	10,5 ± 1,5	10,5 ± 1,0
Apertura orecchio	14,0 ± 1,5	14,0 ± 2,0
Raddrizzamento	4,5 ± 0,5	3,0 ± 0,5
Riflesso palmare anteriore	5,0 ± 1,0	4,0 ± 0,5
Afferramento anteriore (<i>grasping</i>)	12,0 ± 1,5	(a) 6,0 ± 0,5
Afferramento (<i>holding</i>)	14,5 ± 1,0	(a) 10,5 ± 0,5
Vibrisse (avversione di uno stimolo)	8,0 ± 0,5	(a) 4,0 ± 0,05
Apertura occhi	15,5 ± 2,5	15,5 ± 1,0
Trasalimento acustico	17,0 ± 2,5	(b) 14,5 ± 0,5

(a) P < 0,01.

(b) P < 0,05.

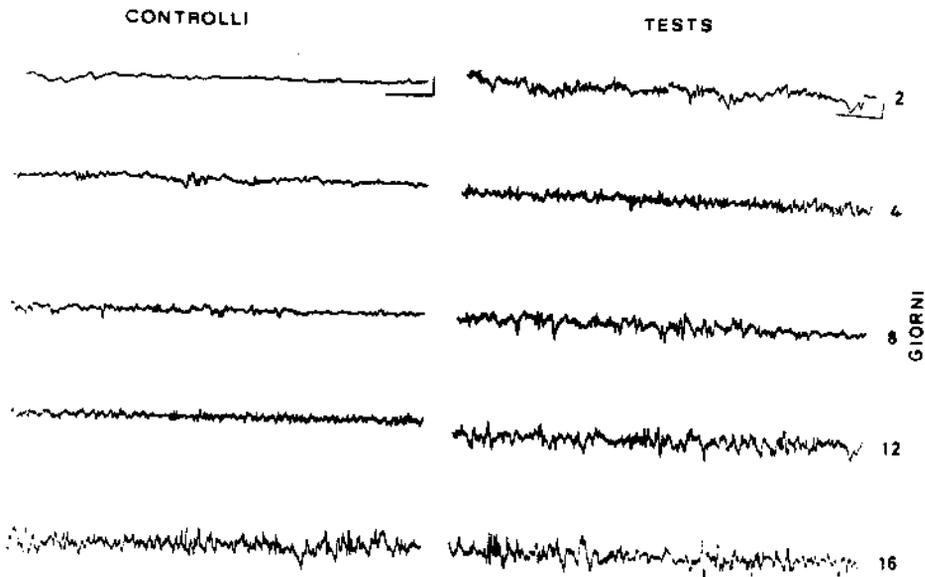


Fig. 1. — Elettrocorticogrammi di ratti alimentati con dieta test e dieta controllo a differenti età dopo la nascita. Scala 1 sec/200 V.

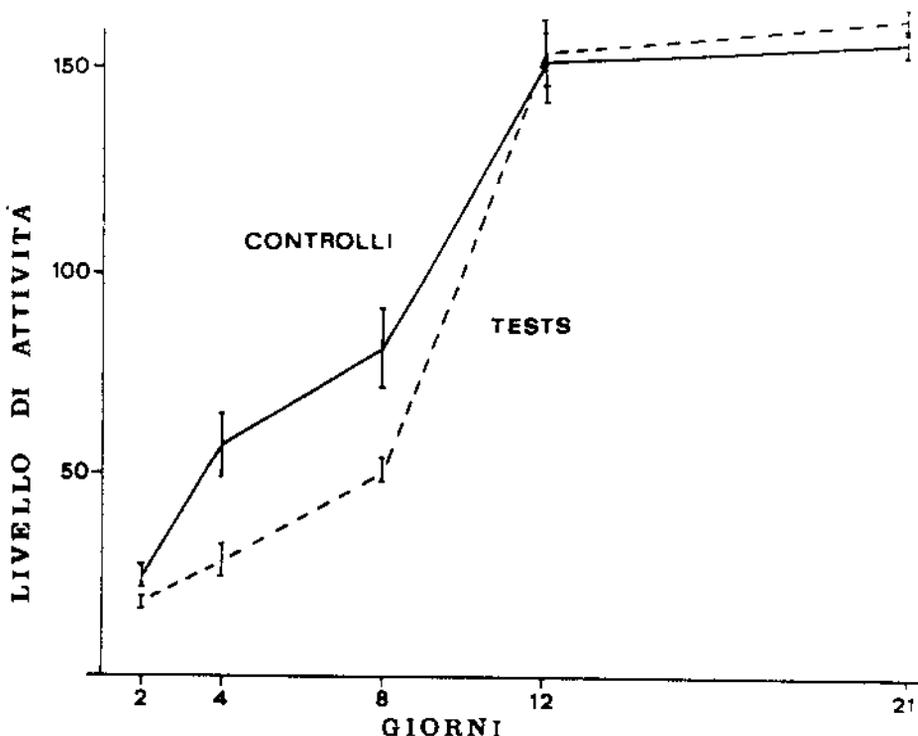


Fig. 2. — Attività motoria di ratti alimentati con dieta test e con dieta di controllo.

5. - DISCUSSIONE

L'introduzione di nuove fonti proteiche richiede un'accurata valutazione delle loro proprietà nutrizionali e tossicologiche. L'ampio ventaglio di prove effettuate sulle SCP ha contribuito a migliorare il modo di affrontare questi problemi mettendo in luce le deficienze di un approccio solamente tossicologico o solamente nutrizionale. Come precedentemente illustrato, non è possibile effettuare studi tossicologici di nuove fonti alimentari somministrando quantità massicce del prodotto e identificando la dose dannosa: infatti ad alti livelli si producono squilibri dietetici con danni difficilmente distinguibili da quelli dovuti alla presenza di componenti tossici. La ammissibilità nella catena alimentare deve perciò essere provata con una serie di prove convergenti che permettano di identificare quei componenti con attività fisiologica tale che la loro presenza, anche in piccole quantità, potrebbe provocare effetti dannosi con la somministrazione a lungo termine. Molti protocolli sono stati suggeriti, ad esempio dal PAG (Gruppo Consultivo sulle Proteine dell'ONU, ora disciolto), dalla CEE, dal Consiglio Superiore

di Sanità ecc. Tutte le linee guida suggeriscono innanzi tutto l'analisi chimica, una serie di prove nutrizionali e dei test preclinici sull'uomo.

Nel caso delle bioproteine è stata eseguita un'analisi chimica assai approfondita ed esauriente i cui dati hanno permesso di indirizzare le successive prove nutrizionali. La estesissima serie di prove zootecniche ha consentito una valutazione del valore economico di questi prodotti. Dall'esame della massa di materiale, una parte della quale abbiamo tentato di riassumere criticamente nei paragrafi precedenti, si evidenziano alcuni punti che vanno ulteriormente chiariti.

5.1 - Prove nutrizionali

Il contenuto proteico è inferiore a quello che è stato preso come base nella valutazione delle prove zootecniche e nutrizionali. Ciò comporterebbe un ricalcolo dei risultati di molte prove ed in particolare della determinazione del PER. Nelle prove per la determinazione del PER i valori trovati sono inferiori a quelli della caseina, benchè l'indice chimico sia simile.

L'aggiunta degli amminoacidi solforati porta il PER delle bioproteine a valori vicini a quelli della caseina benchè l'indice chimico dovrebbe così divenire superiore. Non sappiamo purtroppo l'effetto della stessa aggiunta alle diete di controllo contenenti caseina nelle condizioni sperimentali indicate. I dati così come sono calcolati attualmente non permettono una valutazione effettivamente ragionata del valore nutrizionale in relazione all'innocuità del prodotto. Nelle prove nutrizionali si è tenuto conto solo degli incrementi ponderali. Sarebbe necessario che le prove fossero ripetute con diversi livelli di proteina e con la determinazione del bilancio dell'azoto e quindi dell'RPV.

Mettendo in relazione l'RPV con l'indice chimico e la digeribilità e tenendo conto dell'apporto calorico della porzione non proteica si potrebbero avere utili indicazioni sulla presenza di fattori tossici o antinutrizionali.

5.2 - Studio delle frazioni

Uno studio nutrizionale delle diverse frazioni è stato suggerito dalle linee guida della FAO (PAG *guidelines* n. 12) [15]. Lo studio della frazione lipidica potrebbe chiarire il significato della nefrocalcosi, osservata in diverse condizioni dietetiche e su varie specie animali. La nefrocalcosi può dipendere da vari fattori, quali il rapporto Ca/P, la deficienza di selenio, quella di vitamina E, di amminoacidi solforati e di arginina. Tale fenomeno potrebbe essere attribuito alla presenza di ormoni steroidei.

La deficienza di amminoacidi solforati può essere esclusa dal fatto che la nefrocalcosi è stata osservata anche in ratti alimentati con diete supplementate con cisteina e metionina o con diete addizionate con altri lieviti

come la *T. utilis* o il *S. cerevisiae* [6]. Negli esperimenti effettuati sui ratti con le diete addizionate con le frazioni lipidiche estratte dalla Toprina la composizione delle diete era accuratamente controllata e non presentava deficienze nutrizionali, fenomeni di nefrocalcosi non erano osservati nei gruppi di controllo dove la margarina sostituiva il grasso di Toprina, mentre erano presenti nei ratti test. Ciò sembrerebbe indicare come causa dello squilibrio che conduce alla nefrocalcosi uno dei fattori presenti in tale frazione, restringendo la scelta o all'eccesso di fosfolipidi, o alla presenza degli acidi grassi dispari o alla presenza di particolari ormoni steroidei.

Questi sarebbero però presenti solo nelle *Candidae* e non nei lieviti tipo *Saccaromyces* sp. o *Torula* sp. La scoperta che la frazione lipidica produce anche una anticipazione della maturazione del sistema nervoso centrale potrebbe essere attribuibile agli stessi fattori.

L'attesa dei risultati di ulteriori nuove ricerche volte a chiarire i problemi sollevati sembra quindi necessaria prima che questi prodotti vengano introdotti in dosi massicce nella catena alimentare.

BIBLIOGRAFIA

1. SPADONI, M. A. 1978. Rassegna critica dei metodi di valutazione della qualità delle proteine. *Tecnol. Alim.* 1: 49-60.
2. FRIEDMAN, L., GLASER, C. G. & BROWN, N. L. 1971. The wholesomeness of fish protein concentrate: a new approach to the evaluation of food safety. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 10: 239-252.
3. AA.VV. 1976. Informazioni e dati sulla composizione e salubrità del Liquipron. *Liquichimica Biosintesi Milano* 2: 265.
4. AA.VV. Indagini analitiche e nutrizionali sulla Toprina (lieviti coltivati su n-alcani) Istituto Superiore di Sanità - Rapp. Int.
5. AA.VV. 1976. Informazioni e dati sulla composizione e solubrità del Liquipron. *Liquichimica Biosintesi, Milano* 6: 1625-1660.
6. AA.VV. 1976. Informazioni e dati sulla composizione e salubrità del Liquipron. *Liquichimica Biosintesi, Milano* 6: 1679-1709.
7. AA.VV. 1976. Informazioni e dati sulla composizione e salubrità del Liquipron. *Liquichimica Biosintesi, Milano* 10: 2826-2856.
8. AA.VV. 1976. Documentazione sperimentale per l'ammissibilità della Toprina nella alimentazione animale 3: Rapporto 393.
9. FOOD AND NUTRITION BOARD, NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1976. Special Report. *Nutr. Rev.* 34: 347-348.
10. BERNARDINI, M. P., BONIFORTI, L., SALVATI, S., SERLUPI-CRESCENZI, C., SPADONI, M. A., TOMASSI, G. & TAGLIAMONTE, B. 1976. Effect of feeding odd-chain fatty acids on litter size and composition of fat tissues. *Nutr. Rep. Inter.* 14: 405-413.

11. BERNARDINI, M. P., SALVATI, S., SERLUPI-CRESCENZI, G., TOMASSI, G. & TAGLIAMONTE, B. 1978. Nutritional studies on the lipid fraction of n-alkane grown yeasts; I. Effect of dietary levels on incorporation of odd-chain fatty acids in selected tissues. *Nutr. Rep. Inter.* 17: 125-136.
12. BERNARDINI, M. P., SALVATI, S., SERLUPI-CRESCENZI, G., TOMASSI, G. & TAGLIAMONTE, B. 1978. Nutritional studies of the lipid fraction of n-alkane grown yeasts. II. Effect of different dietary levels on odd-chain fatty acids composition of rat brain. *Nutr. Rep. Inter.* 17: 137-146.
13. BERNARDINI, M. P., SALVATI, S. & SERLUPI-CRESCENZI, G. 1978. Nutritional studies on the lipid fraction of n-alkane grown yeasts. III. Effect on odd-chain fatty acids composition and function of subcellular structures. *Nutr. Rep. Inter.* 17: 147-156.
14. GOZZO, S., OLIVERIO, A., SALVATI, S., SERLUPI-CRESCENZI, G., TOMASSI, G. & TAGLIAMONTE, B. 1978. Nutritional studies of the lipid fraction of n-alkane grown yeasts. IV. Effects on behavioral development. *Nutr. Rep. Inter.* 17: 357-366.
15. PAG guidelines n. 12. Vol 2 (1972).