

44. V. ORTALI e L. CAPOCACCIA. (*) — Una nuova specie di *Corynebacterium*: il *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali e Capocaccia 1956.

Riassunto. — Gli AA. hanno studiato cinque ceppi di un microrganismo isolato da CASTELLANI nel 1942 e considerato l'agente causale di un'ulcera endemica in Africa Settentrionale, ma diffusa anche in altri paesi di Europa e di America, denominata dal CASTELLANI stesso « ulcera tropicaloide ».

La classificazione di questo germe è sempre stata fonte di incertezza e CASTELLANI stesso chiamò il germe prima *Micrococcus mycetoides* e poi *Coccobacillus mycetoides*, richiamando più volte l'attenzione sulla temporaneità di tale denominazione.

In base ai costanti risultati ottenuti dagli AA. su tutti i cinque ceppi, il germe va considerato come una nuova specie di *Corynebacterium*: *Corynebacterium mycetoides* (CASTELLANI) ORTALI e CAPOCACCIA 1956.

I principali caratteri propri al germe sono: bastoncelli spesso claviformi con granuli metacromatici, raramente forme coccoidi; crescita piuttosto scarsa in agar poveri e crescita su Loeffler e agar ricchi con produzione di abbondante pigmento giallo. Fermentazione del glucosio, ma non degli altri zuccheri. Utilizzazione del glucosio, levulosio e trialosio quali fonti di carbonio. Aerobio, microaerofilo.

Résumé. — Les auteurs ont étudié cinq souches d'un micro-organisme, isolé par CASTELLANI en 1942, qui est considéré comme l'agent causal d'un ulcère, endémique en Afrique du Nord et répandue aussi dans plusieurs pays d'Europe et d'Amérique, que CASTELLANI lui-même appelait « ulcère tropicaloïde ».

La classification de ce germe a toujours été la source d'incertitudes et déjà CASTELLANI lui avait d'abord donné le nom de *Micrococcus mycetoides*, puis celui de *Coccobacillus mycetoides*, en insistant à plusieurs reprises sur le caractère provisoire d'une telle dénomination.

En se basant sur les résultats constants obtenus par les auteurs sur les cinq souches étudiées, ce germe doit être considéré comme appartenant à l'espèce *Corynebacterium*: *Corynebacterium mycetoides* (CASTELLANI) ORTALI et CAPOCACCIA 1956.

Les caractères principaux de ce germe sont: bâtonnets souvent en forme de clef avec une granulation métachromatique; de rares formes coccoïdes; croissance plutôt faible sur agar pauvre; bonne croissance sur

(*) Ospite.

Loeffler et agar riche avec production abondante de pigments jaunes. Fermentation du glucose, mais non pas des autres sucres. Utilisation du glucose, lévulose et triose comme sources de carbone. Aerobique, microaérophile.

Summary. — The authors have investigated five strains of a microorganism, isolated by CASTELLANI in 1942 and supposed to be the cause of an ulcer, endemic in Northern Africa, but spread over Europe and America too, named « Tropicaloid ulcer » by CASTELLANI himself.

The taxonomic position of this organism has always been doubtful and CASTELLANI himself named the organism formerly *Micrococcus mycetoides* and then *Coccobacillus mycetoides*, often pointing out the temporariness and unprecision of such a denomination.

From their data the authors come to the conclusion that the germ is to be considered as a new species of the genus *Corynebacterium*: *Corynebacterium mycetoides* (CASTELLANI) ORTALI and CAPOCACCIA 1956.

The peculiar characters of this *Corynebacterium* are: non motile rods, morphologically club-like and seldom round shaped, with metachromatic granules; rather scanty growth on agar media, but luxuriant and yellow pigmented on serum media or on rich agar media. The organism attacks the dextrose, but not the other sugars; it utilizes dextrose, laevulose and triose as sources of C. Aerobic to microaerophilic.

Zusammenfassung. — Die Verfasser haben fünf Stämme eines von CASTELLANI 1942 isolierten Mikroorganismus untersucht, den sie für den ursächlichen Erreger eines endemischen Geschwürs halten, das hauptsächlich in Nordafrika auftritt, aber auch in einigen Ländern Europas und Amerikas verbreitet ist und von CASTELLANI selbst als Tropikaloidgeschwür bezeichnet wird.

Die Einordnung dieses Bakteriums war niemals ganz sicher. CASTELLANI selbst nannte es zunächst *Micrococcus mycetoides* und später *Coccobacillus mycetoides*, wobei er mehrmals darauf hinwies, dass diese Bezeichnungen nur vorübergehenden Charakter hätten.

Aufgrund der gleichbleibenden Ergebnisse, die die Verfasser mit allen fünf Stämmen erhalten haben, handelt es sich hier um eine Art *Corynebacterium*, und zwar *Corynebacterium mycetoides* (CASTELLANI) ORTALI und CAPOCACCIA 1956, dessen wesentliche Eigenschaften sich wie folgt zusammenfassen lassen: häufig claviforme Stäbchen mit metachromatischen Granuli, selten kokkenartige Formen; eher geringes Wachstum in armen Agarböden und Wachstum auf Loeffler'schem oder reichen

Agarböden unter reichlicher Produktion von gelbem Pigment; Gärung der Glukose, aber nicht der anderen Zucker. Ausnutzung der Glukose, Levulose und Trihalose als Kohlenstoffquellen. Aerobe, mikroaerophil.

I. PREMESSE STORICHE

1) PREMESSE CLINICHE

Nel 1942 CASTELLANI descrisse una varietà di ulcera che colpiva le gambe dei soldati operanti nelle regioni desertiche dell'Africa Settentrionale. I soldati la chiamavano « ulcera del deserto » mentre i medici l'identificavano con l'« ulcera tropicale ». CASTELLANI ⁽¹⁻²⁾ la distinse, invece, dalla vera ulcera tropicale (*Ulcus tropicum*) con il nome di ulcera tropicaloide (*Ulcus tropicaloides*): l'ulcera tropicale, infatti, è solitamente unica, profonda e tendente al fagedenismo, mentre l'ulcera tropicaloide è multipla e superficiale. CASTELLANI la descrive come « un'ulcera rotondeggiante, superficiale, con margine regolare, non sottominata e con un fondo rossastro, ove si vedono piccole masserelle di pus o piccole membrane fibrinose; solitamente, attorno all'ulcera vi è un alone infiammatorio; le stazioni linfoghiandolari satelliti sono raramente interessate ». Sempre secondo CASTELLANI, l'ulcera tropicaloide si può presentare con numerose varietà cliniche, tra cui la forma superficiale, la forma infiltrata, la forma nodulare, la forma piodermoide e la forma crostosa diffusa.

Dall'ulcera tropicale vera si osservano spirochete e bacilli fusiformi, dall'ulcera tropicaloide CASTELLANI isolò, invece, un piccolo cocco Gram negativo, di difficile coltivabilità, e che, nei successivi trapianti, assumeva una forma a catenella, con presenza di forme coccobacillari o addirittura bacillari, Gram positive o Gram dubbie e di rare forme clavate.

Secondo CASTELLANI ⁽³⁾, l'ulcera del deserto sarebbe una entità distinta anche dall'ulcera del VELD, sotto il cui nome venivano raccolte le lesioni più varie, comprese le leishmaniche, le follicoliti purulente, le piodermi, etc. e sotto cui, oggi, si vuol riunire le sole ulcere dovute al *Corynebacterium diphtheriae* vero. Questa ulcera guarisce rapidamente con il siero antidifterico, al contrario delle ulcere tropicaloidi e tropicali.

CASTELLANI, che in un primo tempo aveva chiamato il microrganismo *Micrococcus mycetoides*, successivamente (1949) lo chiamò *Coccobacillus mycetoides* ⁽⁴⁾. Fin d'allora, comunque, egli si rese conto che la estrema variabilità dei caratteri del micrococco avrebbe richiesto ulte-

riori studi, per cui avvertiva che la classificazione da lui suggerita doveva essere considerata *temporanea*. Più recentemente NEGRO ⁽⁵⁾ ha concluso per la natura streptococcica del germe che ha denominato *Streptococcus mycetoides*.

Da vari casi di ulcera tropicaloide CASTELLANI ed altri ^(1, 2, 3, 4) riuscirono ad isolare ceppi di microrganismi con caratteri morfologici e colturali strettamente analoghi fra loro.

Con questi ceppi CASTELLANI e altri ⁽⁴⁻⁶⁾ riuscirono a riprodurre su volontari un'ulcera superficiale con margine regolare, con fondo granuleggiante e rossastro e con piccole membrane fibrinose e lieve indurimento purulento; un'ulcera cioè identica all'ulcera tropicaloide. L'agente isolato dai casi di ulcera del deserto era dunque l'agente etiologico dell'ulcera stessa, la quale costituiva perciò una entità nosologica ben definita: l'*Ulcera tropicaloide*, che CASTELLANI riscontrò, oltre che in Africa, anche in Estremo Oriente e nell'America Centrale. Negli ultimi anni, ne sono stati riscontrati casi anche in Spagna, in Portogallo, in Italia (Lazio e Abruzzi) ^(3, 7, 8).

L'ulcera tropicaloide è conosciuta anche con molti altri nomi che debbono considerarsi come sinonimi: ulcera tropicale plurima, ulcera tropicale purulenta, ulcera tropicale ectimatoide, ulcera dell'oasi, ulcera tropicale superficiale, ulcera tropicale micetoidea, ulcera della sabbia micetoidea, ulcera della Marmarica, ulcera che dura, dermatite ulcerosa di CASTELLANI, ulcera tropicaloide del deserto.

2) PREMESSE MICROBIOLOGICHE

I ceppi isolati dai casi di ulcere tropicaloidi vengono costantemente descritti ^(3, 4, 11) come dotati di un estremo polimorfismo. Il germe risulta coccoide, ma può dare forme bastoncellari corte e forme clavate in funzione sia del terreno che della fase di crescita.

Per quanto riguarda la colorabilità, CASTELLANI descrive il suo germe come nettamente Gram negativo all'atto dell'isolamento; venne, poi, descritto come Gram incerto e anche Gram positivo da CASTELLANI, SERVINO e TARIZZO ⁽⁴⁾, URSO e TRIPODI ⁽⁹⁾, CAPOCACCIA e CAO PINNA ⁽¹⁰⁻¹¹⁾. CAPOCACCIA e CAO PINNA ⁽¹¹⁾ trovarono la prevalenza di forme Gram positive, bacillari o clavate, quando si coltivavano i ceppi su terreni particolarmente ricchi, quali il Loeffler e l'agar caseina.

Dall'esame della bibliografia si trova spesso l'accento alla presenza nel germe di granuli metacromatici ⁽⁴⁻¹¹⁾ ma l'unico a mettere in rapporto tra loro l'estremo polimorfismo del germe, la possibilità di riscontrare forme clavate e la presenza di granuli metacromatici, è stato PERGO-

LA ⁽¹²⁾ che, in base all'insieme di questi caratteri, concluse assegnando questo germe al genere *Corynebacterium*.

Il germe è difficilmente coltivabile su agar semplice, ove si presenta con colonie piccole, opache, tendenti a confluire. Sugli agar ricchi e su terreno di Loeffler cresce rigoglioso, con patina fortemente pigmentata in giallo, filante, umida ^(4, 11, 9, 10).

I ceppi di *Micrococcus mycetoides* sinora descritti fermenterebbero, con formazione di acido, il glucosio, il levulosio, il maltosio, e darebbero una lieve fermentazione su lattosio, saccarosio, galattosio e arabinosio. Su xilosio e glicerina si avrebbe lieve o nulla fermentazione. Non si avrebbero alcuna azione sulla mannite, dulcite, ramnosio, amigdalina, adacite, sorbite, inulina, raffiniosio, eritrite, ^(3, 4, 9).

I ceppi provati non avrebbero alcuna azione sulla gelatina, sul siero coagulato; acidificherebbero il latte senza coagularlo. Non produrrebbero indolo, nè idrogeno solforato, sarebbero Voges Proskauer e rosso metile negativi; non utilizzerebbero coagulasi, nè emolisine, nè ureasi ⁽¹²⁾. Produrrebbero fosfatasi ⁽¹³⁾.

Tutti i dati morfologici e biochimici pubblicati presentano una certa variabilità, giacchè, secondo gli AA., i ceppi studiati presenterebbero difficoltà di coltura sugli usuali terreni e specialmente sui terreni per la fermentazione degli zuccheri, tanto da lasciare il dubbio che, in caso di reazione negativa, la negatività sarebbe dovuta più a mancata crescita che a mancata fermentazione.

II. RICERCHE MICROBIOLOGICHE

Da quanto abbiamo esposto nella premessa bibliografica, risulta come la classificazione dell'agente etiologico dell'ulcera tropicaloide sia tutt'altro che certa.

Per questo motivo abbiamo voluto studiare la morfologia e la biologia del germe in questione, tentando di giungere ad una sua precisa sistemazione tassonomica.

1) CEPPI E LORO ORIGINE.

I ceppi sui quali abbiamo eseguito le nostre ricerche sono stati i seguenti:

Ceppi 1 e 2, rispettivamente Servino e Lisbona, conservati presso la Collezione dell'Istituto Superiore di Sanità e provenienti dalla Clinica delle Malattie Tropicali di Roma.

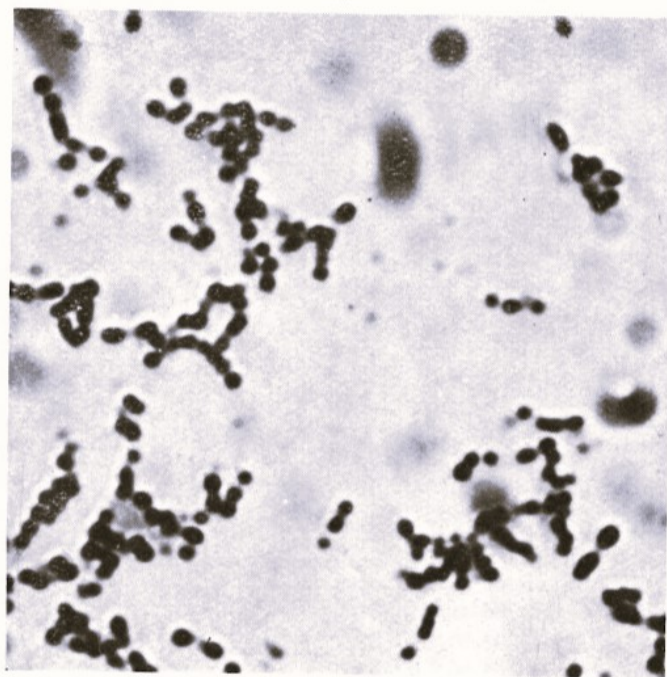


Fig. 1. - Ceppo Capocaccia, coltura di 48 ore su Loeffler. Colorazione di Albert. Si mettono in evidenza i granuli metacromatici; si intravede il corpo batterico, colorato leggermente.

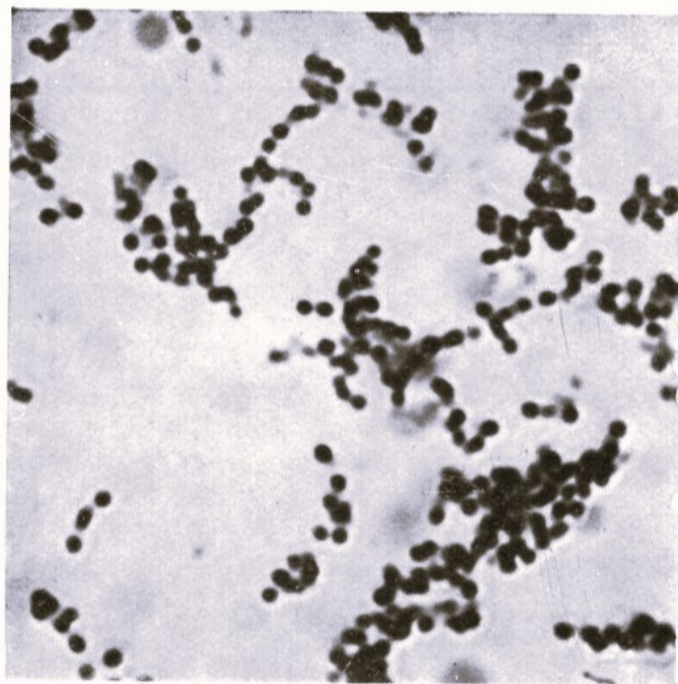


Fig. 2. - Ceppo Stella, coltura di 48 ore su Loeffler. Colorazione di Albert.

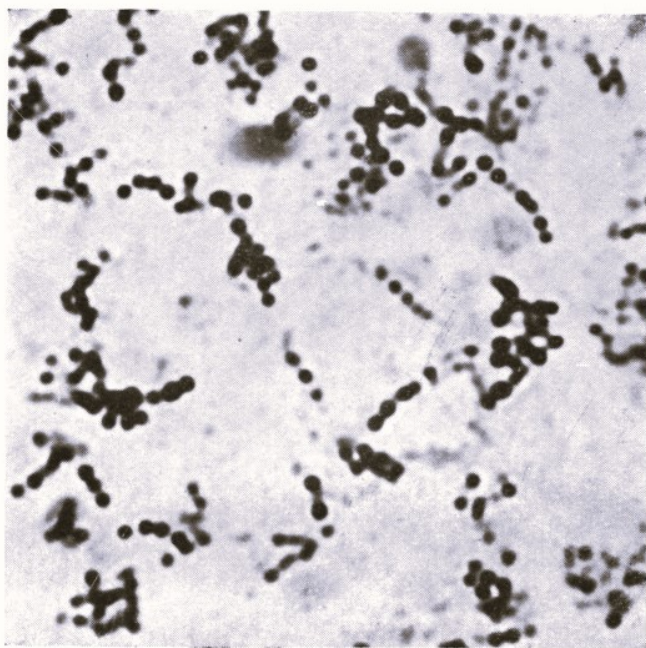


Fig. 3. - Ceppo Servino, coltura di 48 ore su Loeffler. Colorazione di Albert.

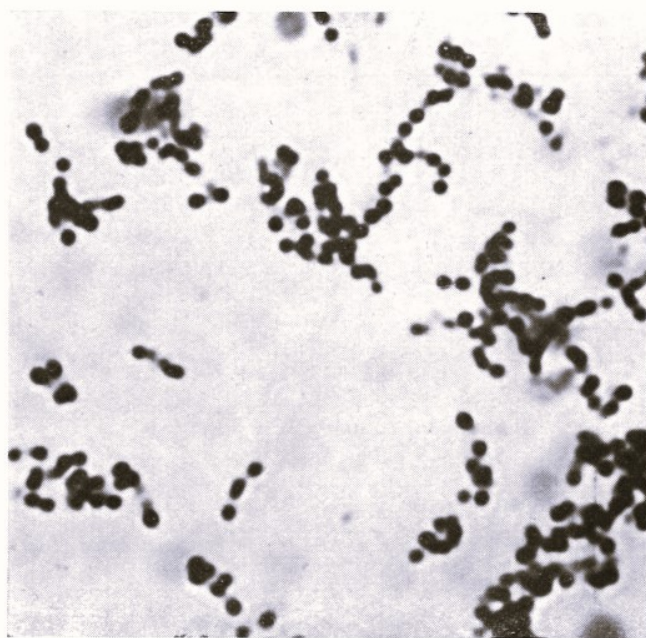


Fig. 4. - Ceppo Lisbona, coltura di 48 ore su Loeffler. Colorazione di Albert.

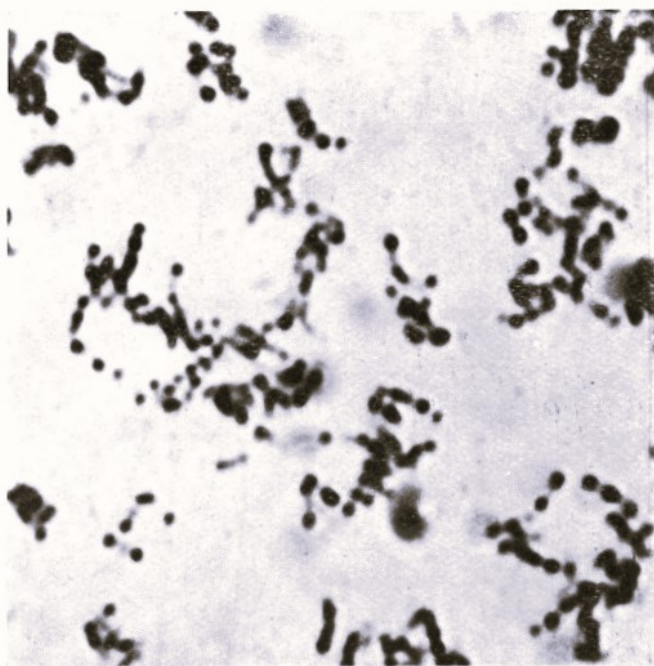


Fig. 5. - Ceppo Castellani, coltura di 48 ore su Loeffler. Colorazione di Albert.

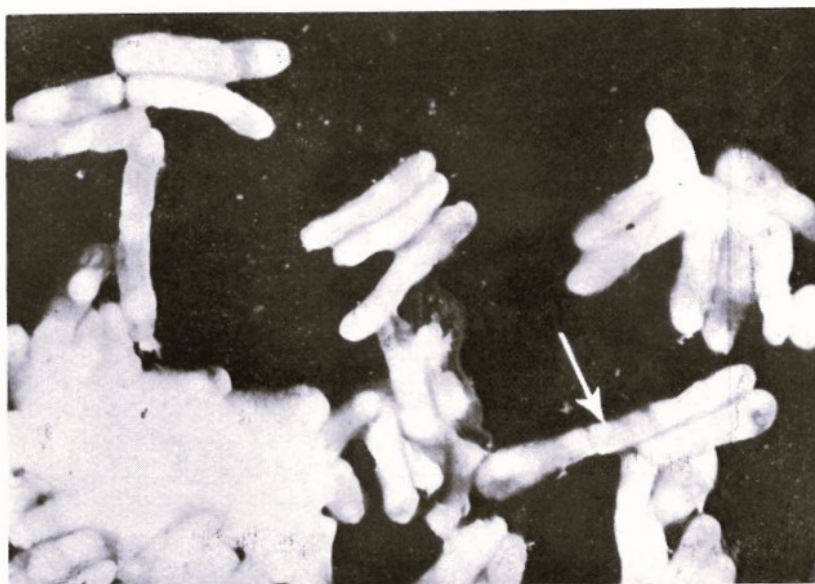


Fig. 6. - Ceppo Lisbona al microscopio elettronico. Preparato metallizzato. Si osservano i granuli e alcune formazioni multicellulari.



Fig. 7. - Ceppo Lisbona al microscopio elettronico. Preparato metallizzato.
Si osservano i granuli.

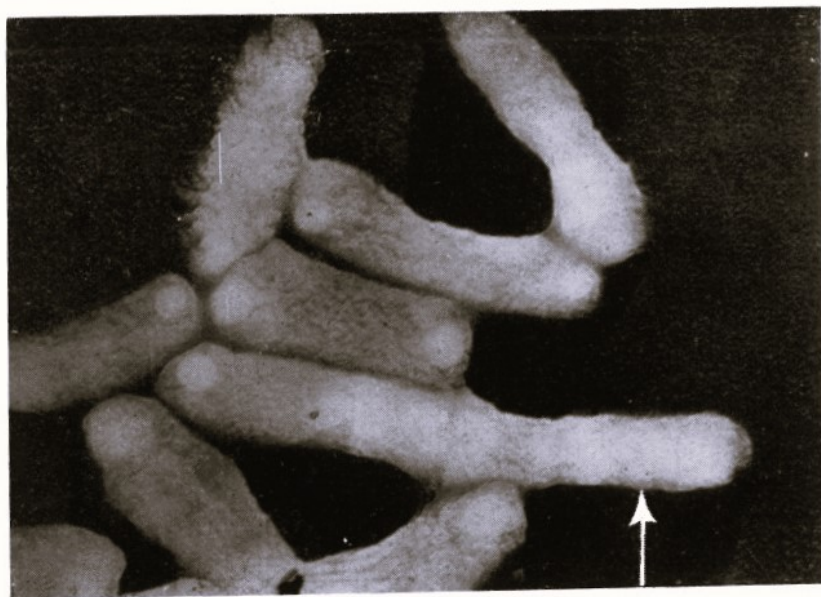


Fig. 8. - Ceppo Lisbona al microscopio elettronico. Preparato metallizzato.
Si osserva al centro, una formazione multicellulare,

Ceppi 3 e 4, rispettivamente Capocaccia e Stella, conservati presso la Clinica delle Malattie Tropicali di Roma.

Ceppo 5, Castellani, proveniente dalla *School of Tropical Medicine* di Londra.

TABELLA 1.

	Nome del ceppo	Provenienza	Isolata da	Anno d'isolamento
Ceppo n. 1 .	Servino	Africa sett.	Castellani	1942
Ceppo n. 2 .	Lisbona	Lisbona	Castellani	1947
Ceppo n. 3 .	Capocaccia	Africa sett.	Capocaccia	1949
Ceppo n. 4 .	Stella	Africa sett.	Castellani	1942
Ceppo n. 5 .	Castellani	Lisbona	Castellani	1949

2) CARATTERI MORFOLOGICI.

I cinque ceppi da noi raccolti hanno caratteri morfologici comuni; si presentano, infatti, indistintamente come bastoncelli asporigeni, immobili, spesso con un rigonfiamento alle estremità. Il germe è molto variabile di grandezza, ma la massima parte degli individui è compresa nei seguenti valori: lunghezza circa 1 o 2 micron per 0,3-0,5 di larghezza. La morfologia è estremamente variabile, prevalgono decisamente le forme clavate e coccoidi. Il microrganismo risulta Gram positivo ma si riscontrano numerosi elementi Gram incerti e qualcuno Gram negativo; coltivato su terreni particolarmente ricchi, quali il Loeffler, si può mettere in evidenza qualche elemento con un lievissimo grado di acido resistenza, distribuito a fascia e, in nessun caso, totale. Con la colorazione di Albert per i granuli metacromatici, si evidenziano spesso all'interno dei germi due grossi granuli, colorati in nero mogano, e disposti ai poli: talvolta le granulazioni sono tre e, anche quattro; in tal caso, il microrganismo è notevolmente più lungo del normale (forme in divisione). Il corpo bacillare è poco visibile e si colora in malva chiaro (figg. 1, 2, 3, 4, 5).

Al microscopio elettronico si evidenziano nettamente le granulazioni e vengono chiariti i loro rapporti con la rimanente struttura cellulare.

Quando i granuli hanno una posizione nettamente polare, il germe presenta caratteristici rigonfiamenti che gli fanno assumere una forma a

clava o a manubrio; quando i granuli sono subterminali il rigonfiamento è unico (figg. 6 e 7).

La presenza di più granuli si osserva con una certa costanza nei microrganismi in divisione: in tal caso si riesce spesso ad osservare all'interno del germe una parete trasversale divisoria (figg. 8, 9, 10 e 11).

Quando questo fenomeno si avvera in formazioni batteriche notevolmente lunghe si osservano allora due e persino tre pareti divisorie, il che lascia pensare alle formazioni multicellulari di BISSET⁽¹⁵⁾ (fig. 8 e fig. 10).

Al microscopio elettronico non si osservano ciglia e non è evidenziabile alcuna struttura riferibile a capsula o a strato mucoso pericellulare (figg. 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

3) CARATTERISTICHE COLTURALI.

Colturalmente il germe, appena isolato dalla lesione, cresce stentatamente sui mezzi colturali usuali, ma in seguito vi si adatta crescendo in patina rigogliosa sui terreni particolarmente ricchi, come il Löffler, l'agar tripsina, l'agar caseina, etc. Su questi terreni il germe forma una patina decisamente giallastra, patina che si stacca facilmente dal terreno e si emulsiona bene in soluzione fisiologica.

Le colonie isolate sono rotondeggianti, opache, lievemente filanti, giallastre; arrivano a un diametro di circa 1 mm e non tendono a ingrandire dopo la terza giornata.

In acqua peptonata la crescita è poco abbondante, con intorbidamento diffuso. In brodo semplice o glucosato si ha invece una crescita molto abbondante, sempre diffusa, con la formazione, dopo qualche giorno di coltura, di un sedimento giallastro.

4) METABOLISMO.

La fermentazione degli zuccheri è stata da noi controllata utilizzando un terreno capace di dare un buono sviluppo dei ceppi in esame.

Da un confronto tra i terreni usuali degli zuccheri (acqua peptonata, brodo, etc.) e quelli in uso per i *Corynebacteri* (terreno di Hiss e terreno al proteose peptone) abbiamo ottenuto un risultato chiaro solo con quest'ultimo: il terreno al proteose peptone.

Il terreno ha la seguente composizione:

Estratto di carne g 1; Proteose peptone N.ro 3 (Difco) g 10; Cloruro di Sodio g 5; Rosso fenolo g 0,02; portare a 1 litro con acqua distillata; correggere il pH a 7,4. La base va sterilizzata in autoclave a 115°C per 20'.

A parte sterilizzare una soluzione degli zuccheri occorrenti al 10% in acqua distillata, mediante filtrazione per Seitz.

Aggiungere la soluzione sterile di zuccheri alla base, in ragione del 10%, ottenendo, in tal modo, una concentrazione finale dell'1% dello zucchero. Tale terreno va distribuito in tubi Wasserman sterili, in ragione di 3 cm³ per tubo.

Su questo terreno il germe cresce bene dando delle nette reazioni di acidificazione (giallo).

Sono state saggiate le seguenti fonti di carbonio: adonite, amido, arabinosio, arbutina, cellobiosio, destrina, dulcite, eritrite, esculina, galattosio, glicogene, inosite, lattosio, levulosio, maltosio, mannosio, mannite, melibiosio, mutosio, raffiniosio, l-ramnosio, d-ribosio- saccarosio, l-sorbosio, trialosio, xilosio.

Tutti i ceppi fermentano soltanto il glucosio, mentre si sono mostrati negativi su tutti gli altri zuccheri.

Utilizzazione delle fonti di carbonio e di azoto.

Data la scarsa attività metabolica dei ceppi in nostro possesso, abbiamo cercato, per stabilire una identità di caratteri, oltre alla fermentazione degli zuccheri, di cui al paragrafo precedente, di controllare la loro utilizzazione, con il metodo auxanografico di Beijerinck.

Molti microrganismi, infatti, pur utilizzando alcune fonti di carbonio sono incapaci di accumulare nel terreno una quantità sufficiente di metaboliti acidi, tale da determinare il viraggio dell'indicatore, oppure utilizzano così rapidamente i prodotti metabolici da non aversi egualmente un accumulo di metaboliti sufficiente al viraggio stesso.

Questo è particolarmente valido per i *Mycobacteri* (¹⁵, ¹⁶), dove i metodi auxanografici sono praticamente indispensabili per studiare il quadro metabolico delle varie specie (PENSO e ORTALI).

Nel nostro caso, sia la capacità di fermentare un solo zucchero, sia le discordanze tra i nostri risultati e quelli riportati da altri autori che si erano interessati dell'argomento, erano motivi validi per controllare se esistesse una maggiore capacità metabolica e se al vecchio schema fermentativo (³, ⁴, ⁹) corrispondeva una capacità metabolica e una contemporanea incapacità fermentativa.

Auxanogramma con zuccheri.

Terreno base: Acqua distillata	cm ³	1.000
Fosfato monopotassico	g	1
Solfato di magnesio	g	0,5
Agar	g	20
Terreno aggiustato a pH 7,4 e sterilizzato a 120°C per 20'.		

Le impurità dell'agar sono sufficienti ad assicurare le fonti azotate. Ogni ceppo in esame è stato coltivato per 48 ore su terreno agar-idrolizzato di caseina. La patina è stata raccolta e lavata, mediante centrifugazione, con soluzione fisiologica. Dopo tre lavaggi l'emulsione, nuovamente sospesa in soluzione fisiologica, è stata aggiunta alla predetta base, precedentemente sciolta e portata a 50°C. Con questo agar germi abbiamo preparato delle piastre di Petri. Dopo aver fatto gelificare il terreno e aver lasciato le piastre in termostato per almeno due ore, onde eliminare l'acqua di condensazione, abbiamo depositato, con una punta di vaccinostilo flambato, i vari zuccheri da saggiare sulla superficie dell'agar germi. Lo zucchero è stato posto alla periferia della piastra, in modo che, su una sola piastra, si potessero saggiare contemporaneamente quattro zuccheri. Il risultato positivo viene dato dalla crescita del germe nello spessore dell'agar, attorno al punto in cui era stato deposto lo zucchero.

Con tale tecnica abbiamo provato le seguenti fonti di carbonio: Adonite, Amido, Arabinosio, Arbutina, Cellobiosio, Destrina, Dulcite, Eritrite, Esculina, Galattosio, Glicogene, Glucosio, Inosite, Lattosio, Levulosio, Maltosio, d-Mannosio, Mannite, Melibiosio, Mutosio, Raffinosio, l-Ramnosio, d-Ribosio, Saccarosio, l-Sorbose, Trialosio, Xilosio.

Hanno dato risultato positivo, con tutti i cinque ceppi: glucosio, levulosio, trialosio.

I risultati ottenuti confermano la fermentazione del Glucosio ed estendono la utilizzazione al Levulosio e Trealosio.

Analogamente abbiamo studiato la utilizzazione delle fonti azotate, ma essendo il presente un lavoro di classificazione e, al tempo stesso, essendo il problema delle fonti azotate ancora controverso ai fini di una classificazione, non riportiamo i valori relativi all'utilizzazione dei composti azotati.

ALTRI CARATTERI.

I ceppi saggiati presentano i seguenti caratteri: indolo (Legal-Weil), negativa; riduzione dei nitrati a nitriti dopo 48 ore, assente (met. di Griess); fosfatasi, presente (met. di Braun e King); ureasi, assente (met. di Ortali e Samarani); Voges Proskauer, assente (met. Barrit); rosso metile, negativa (met. di Clark e Lubs); assenza di liquefazione della gelatina; coagulasi (met. Cruickshank), assente.

DISCUSSIONE.

I cinque ceppi da noi inviati come esemplari di *Micrococcus* o *Cocobacillus mycetoides* presentano tutti i caratteri morfologici, biochimi-

ci o metabolici identici tra loro. Le caratteristiche più appariscenti o, comunque, più significative ai fini della sistemazione in un genere, sono le seguenti: forma bastoncellare, estremo polimorfismo, immobilità, presenza di granuli metacromatici, Gram positività, pigmentazione gialla, aerobiosi e microaerofilia. Tali caratteri ci permettono direttamente di avvicinare e includere il *Micrococcus mycetoides* nel genere *Corynebacterium*, secondo quanto già proposto da PERGOLA ⁽¹²⁾. Infatti nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ed. 1948, così troviamo esposti i caratteri della Famiglia delle *Corynebacteriaceae*: « *Non motile rods, frequently banded or beaded with metachromatic granules. May show marked diversity of forms... Generally Gram positive, but this reaction may vary depending on the nature of the cells. Where pigment is formed it is grayish-yellow to orange or pink in color. Aerobic to microaerophilic. Anaerobic species have been reported. Gelatin may be liquefied and nitrites may be produced from nitrates. Animal and plants parasites and pathogens* ».

E' noto come molti problemi siano connessi con la costituzione della famiglia delle *Corynebacteriaceae*, strettamente imparentata da un lato con i proactinomiceti e picobatteri e, dall'altro, con i lattobacilli e gli streptococchi, specie quando si prenda in considerazione la sola presenza di granuli metacromatici, carattere molto più diffuso di quanto generalmente non si ammetta; vero carattere fondamentale di questa famiglia è l'estremo polimorfismo dei germi in essa inclusi. Crediamo, comunque, che i nostri cinque ceppi possano essere sistemati nel genere *Corynebacterium*, tanto più che ancora confusa risulta la differenziazione tra questo genere ed i generi *Listeria* e *Erysipelothrix* sistemati anche essi nella famiglia delle *Corynebacteriaceae*, sistemazione basata su una affinità quanto mai labile come quella della presenza di granuli metacromatici ⁽¹⁷⁾.

Si trattava ora di vedere se i nostri ceppi potevano essere considerati una specie a se stante, oppure, se dovevano essere identificati con specie già descritte.

L'unico carattere utilizzabile ai fini della classificazione dei *Corynebacteri* è la capacità di fermentare gli zuccheri. I nostri dati sono basati sull'impiego di un terreno, che, come abbiamo esposto nelle ricerche originali, ci permettesse di avere un quadro preciso della attività fermentativa dell'organismo da noi studiato sui vari zuccheri.

Dai nostri dati risulta come i cinque ceppi abbiano un comportamento metabolico estremamente uniforme (acidificazione del solo glucosio) e differente da tutti gli schemi metabolici delle specie di *Corynebacteri* sinora descritte e mantenute nelle collezioni nazionali: infatti, il

solo *Corynebacterium renale* presenta uno schema fermentativo simile a quello offerto dai nostri ceppi, ma questa specie è, però, descritta come anaerobia nel Bergey's Manual stesso, e, capace, anche, a volte, di fermentare il fruttosio e lattosio.

Le altre specie di *Corynebacteri* di provenienza umana e animale sono rappresentate, da un lato, dal *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *C. ovis*, *C. bovis*, *C. equi*, che non fermentano nessuno zucchero e, dall'altro, dal *C. acnes*, *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. murisepticum*, *C. xerose*, *C. pyogenes* e *C. ulcerogenes*, che hanno uno spettro metabolico molto più ampio del *Corynebacterio* da noi descritto.

CONCLUSIONI

Abbiamo studiato sistematicamente cinque ceppi di un microrganismo isolato da CASTELLANI (1942) e da lui classificato come *Micrococcus mycetoides*. CASTELLANI stesso considerava questa denominazione come temporanea.

Questo microrganismo è responsabile di un'affezione ulcerante chiamata da CASTELLANI « Ulcera tropicaloide ». Dai nostri dati è risultato un allineamento dei cinque ceppi, che ci consente di considerarli appartenenti al genere *Corynebacterium*, secondo quanto descritto anche da PERGOLA ⁽¹²⁾ e ci è risultato, inoltre, che i caratteri biochimici lo differenziano nettamente dagli altri *Corynebacteri* noti, il che ci permette di classificare questi cinque ceppi sotto il binomio linneiano: *Corynebacterium mycetoides* (CASTELLANI) ORTALI e CAPOCACCIA 1956.

I dati, costanti e perfettamente sovrapponibili per tutti i cinque ceppi, sono i seguenti:

Bastoncelli asporigeni di 1 o 2 micron di lunghezza per 0,3-0,5 di larghezza, talvolta presentantisi clavati e più raramente coccoidi. Gram positivi. Non acido resistenti. Granuli metacromatici alle estremità e talvolta al centro.

Agar semplice: crescita non rigogliosa (specie ai primi trapianti), con colonie piccole, tendenti a confluire, con lieve pigmentazione giallastra su alcuni tipi di agar.

Agar caseina o tripsina: crescita abbondante, a patina, con pigmentazione gialla intensa, filante.

Loeffler: stessi caratteri.

Acqua peptonata: crescita non abbondante, con intorbidamento diffuso.

Brodo semplice o glucosato: crescita abbondante, con intorbidamento diffuso, e tendenza, dopo qualche giorno, a un sedimento lievemente giallastro.

Fermenta senza gas il solo glucosio. Non fermenta alcun altro zucchero.

Utilizza come fonti di carbonio il glucosio, il levulosio e il trialosio. Indolo: negativo.

Non riducono i nitrati a nitriti.

Fosfatasi: presente.

Ureasi: assente.

Voges Proskauer: assente.

Rosso metile: negativa.

Coagulasi: assente.

Non liquefà la gelatina e non coagula il latte.

Optimum di crescita: tra 25°C e 38°C. Aerobio, microaerofilo.

Origine: isolato da casi di « ulcera tropicaloide ».

Potere patogeno: inoculando il germe si riproduce un'ulcera nel luogo di inoculazione.

Habitat: ignoto.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia e Clinica Malattie tropicali dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CASTELLANI A. - Reale Accademia Medica di Roma. Seduta del 18 dic. 1942.
- (2) CASTELLANI A. - *Annali di Igiene* 12: 349 (1942).
- (3) CASTELLANI A. - *Arch. It. Sci. Med. Col. e Parass.*, 24: 1 (1943).
- (4) CASTELLANI A., SERVINO V., TARIZZO M. - *Riv. Ist. Sierot. It.*, 24: 1 (1949).
- (5) NEGRO G. - *Giornale di Batteriologia e Immunologia*, 30: 703 (1943).
- (6) CASTELLANI A. - *Arch. It. Sci. Med. Col. e Parass.*, 24: 1 (1943).
- (7) CASTELLANI A. - Relazione al IV Congresso Intern. Unione Medica Latina. *Arch. It. Sci. Med. Trop. e Parass.*, 36: 587 (1953).
- (8) CASTELLANI A. - Comunicazione personale.
- (9) URSO B., TRIPODI P. - Comunicazione al I Congresso Società It. Mal. Infett. e Parass. Roma 27-28 ottobre 1949. Pubblicato negli Estratti del Congresso da *Acta Medica Italica Mal. Inf. Parass.* 1949.
- (10) CAPOCACCIA L., CAO PINNA M. - VI Congresso Int. Microbiologia, 1: 848 (1953).
- (11) CAO PINNA, M. CAPOCACCIA L. - *Arch. It. Sci. Med. Trop. e Parass.*, 35: 1 (1954).
- (12) PERGOLA M. - *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 17: 147-154 (1954).
- (13) CAPOCACCIA L., PARONI F. - *Arch. It. Sci. Med. Trop. e Parass.*, 36: 36 (1953).
- (14) CAPOCACCIA L. - Comunicazione all'VIII Cong. Soc. It. Mal. Inf. e Parass., dic. 1953.
- (15) MERRIL M. H. - *J. Bact.*, 20: 235 (1930).
- (16) PENSO G., ORTALI V., GAUDIANO A., PRINCIVALLE M., VELLA L., ZAMPIERI A. - *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 14: 855 (1954).
- (17) BISSET K. A. - *J. gen. Microb.*, 3: 93 (1949).