

67. Giuseppe PENSO e Vittorio ORTALI. — Studi e ricerche sui micobatteri. - Nota II. I Fagi dei micobatteri (*).

Riassunto. — Vengono descritti, sia dal punto di vista biologico che morfologico, cinque fagi attivi sui micobatteri: per ognuno vengono presentate le fotografie elettroniche ed esposta la sfera di azione saggiata su 107 ceppi diversi di micobatteri.

Résumé. — D'un peu de terre recueillie autour d'une fosse à fumier dans une localité riche en mycobactéries, on a isolé divers phages actifs sur plusieurs souches de mycobactéries.

Ces phages ont été étudiés aux points de vue biologique et morphologique sous le microscope électronique; il a été constaté que par la méthode de l'inactivation au moyen des antisérums correspondants, les phages isolés par les AA., avec un autre phage isolé par Gardner et Weiser et reçu dans l'entre-temps, se limitent à cinq espèces distinctes qui se caractérisent aussi par la morphologie de la tache lytique et par l'aspect morphologique de chaque individu. Ces cinq phages ont été appelés: *Phagus phlei*, *Phagus lacticola*, *Phagus Rabinowitschi*, *Phagus smegmatis*, *Phagus Pellegrini*: le nom spécifique de chacun d'eux a été emprunté à la souche de mycobactérie dont il a été isolé.

Chacun des phages ci-dessus mentionnés a son propre champ d'action sur les mycobactéries; par conséquent, si on les emploie dans leur concentration critique, il est possible, par leur action particulière, de définir les types de beaucoup de mycobactéries. Cette détermination ainsi effectuée à l'aide des phages a un caractère spécifique.

Ce travail est illustré par de nombreuses photographies électroniques des phages et des photographies optiques des taches lytiques.

Summary. — From a small quantity of earth picked up near a dung pit, in a locality rich in mycobacteria, the AA. isolated various phages active on several strains of mycobacteria.

Such phages were studied both biologically and morphologically with the electron microscope. It could thus be seen that by the method of inactivation through the correspondent antisera, the phages isolated by the AA. and another isolated by Gardner and Weiser and received in the meantime are limited to five distinct species, which are characterized by the morphology of the lytic plaque and by the morphological aspect

(*) Queste ricerche sono state in parte comunicate all'Accademia Nazionale dei Lincei nelle sedute dell'11 dicembre 1948 e 8 gennaio 1949, e hanno fatto oggetto di una comunicazione al Congresso Internazionale di Patologia comparata. Istanbul 17-23 maggio 1949.

of each individual. These phages received the names: *Phagus phlei*, *Phagus lacticola*, *Phagus Rabinowitschi*, *Phagus smegmatis*, *Phagus Pellegrini*; the specific name of each was chosen with reference to the strain of mycobacterium from which it was isolated.

Each of the above phages has its own sphere of action towards mycobacteria, so that by using them in their critical concentration it is possible to typify many mycobacteria. This determination by the phages has a specific character.

This work is illustrated by numerous electronic photos of the phages and by optical photos of the lytic plaques.

Zusammenfassung. — Aus der unmittelbar neben einer Düngergrube einer an Mycobakterien reichern Gegend gesammelten Erde, wurden mehrere Phagen, die auf verschiedene Stämme von Mycobakterien einwirken, isoliert. Diese Phagen wurden biologisch und morphologisch unter dem Elektronenmikroskop beobachtet; es ergab sich, dass mit der Inaktivierungsmethode mit den entsprechenden Antisera, die von den V.V. isolierten Phagen, sowie der, in der Zwischenzeit eingetroffene, von Gardner und Weiser, sich auf 5 unterscheidbare Arten begrenzen, die durch die Morphologie der phagischen Plaques und die morphologische Gestaltung erkennbar sind. Diese 5 Phagen wurden folgendermassen genannt: *Phagus phlei*, *Phagus lacticola*, *Phagus Rabinovitschi*, *Phagus smegmatis*, *Phagus Pellegrini*. Der spezifische Name von jedem wurde im Zusammenhang mit dem Mycobakterium aus dem er isoliert wurde, gewählt. Jeder der obengenannten Phagen hat einen eigenen Wirkungsbereich auf die Mycobakterien, so dass es möglich ist, mit ihnen viele Mycobakterien zu typisieren, wenn man sie in ihrer kritischen Konzentration verwendet. Derartige Typisierung hat spezifischen Charakter.

Die Arbeit wird durch zahlreiche Elektronenlichtbilder der Phagen und optische Photographien der Phagen-Plaques erläutert.

Più di una volta è stata segnalata l'esistenza di micobatteri provvisti di capacità autolitiche: ricorderemo le osservazioni di Johnson e Renfrew (1928), che constatarono autolisi nelle culture di un tubercolare umano (H 37); quelle di Steenken (1935), compiute su vecchie culture dello stesso ceppo H 37 e dalle quali riuscì a isolare per filtrazione un principio litico ch'egli, però, non identificò nè ravvicinò a un fago; quelle di Laporte (1943), fatte su varie specie di *Mycobacterium* (specie che non nomina, salvo un accenno generico a ceppi umani, bovini e aviari); quelle di Andrejew (1946) sopra un « bacille de la fièvre » che si autolizzava se posto a 20° e a 40° C., ma non si autolizzava se posto a 60° C., temperatura alla quale moriva rapidamente; quelle di van Deinse (1948)

su quattro ceppi umani (Ro., Ja., Mir. e un tubercolare di origine renale), sopra un ceppo bovino (Gué. 134) e sul BCG mantenuti per alcuni mesi su patata glicerinata.

Nessuno di questi Autori accenna, però, neppure di sfuggita, alla possibilità che la lisi da essi descritta sia da attribuirsi a un virus: essi si limitano di solito alla semplice esposizione del fenomeno osservato o a considerazioni di questo genere (van Deinse): « Il semble s'agir d'une hydrolyse, favorisée d'une part par la pomme le terre, d'autre part par l'absence d'air ».

Più precisi sono stati Gardner e Weiser (1947) i quali, cercando di isolare germi ad azione antagonista sui micobatteri, notarono una volta fenomeni litici che attribuirono a un fago. Nel corso delle ricerche essi riuscirono a isolare tale principio filtrando per Berkefeld un infuso di terra arricchito settimanalmente con 10 cm³ di una sospensione di *Mycobacterium smegmatis* e mantenuto a 37° C. per otto mesi. Infruttuosi furono, invece, i tentativi di isolare il fago direttamente da infusi privi di *Mycobacterium smegmatis*. Il fago di Gardner e Weiser si mostrò attivo soltanto sul ceppo da cui venne isolato, inattivo su un altro ceppo di *Mycobacterium smegmatis* e su uno di *Mycobacterium phlei*.

L'insieme di queste osservazioni colpì particolarmente la nostra attenzione — interessati, come siamo, in tutti i problemi attinenti ai micobatteri — e la colpì soprattutto per il fatto che noi vedevamo nell'esistenza di eventuali fagi, una possibile chiave per classificare il confuso genere *Mycobacterium*.

Decidemmo, così, di affrontare il problema tentando l'isolamento diretto di fagi attivi sui micobatteri.

ISOLAMENTO DEI FAGI

Se fagi antimicobatterici esistono — ci dicemmo —, essi debbono sicuramente coesistere coi germi acidoresistenti, là dove questi sono più facilmente reperibili.

Sulla base di nostre precedenti esperienze sull'isolamento di micobatteri (Penso, Cattaneo, Morellini e Ortali, 1948) scegliemmo una zona terrosa, alla periferia di una concimaia, zona non rimossa da tempo e nella quale, oltre a essere presenti residui di stabbio, si riversava gran parte del liquame scolato dalla concimaia stessa. In tale zona noi avevamo riscontrato con costanza la presenza di germi acidoresistenti. Una piccola massa di questa terra, all'incirca un chilogrammo, veniva stemperata entro un recipiente di vetro con una parte o due di acqua, a seconda dell'idrofilia delle sostanze presenti nella terra stessa. Mescola-

vamo, filtravamo per garza, poi per carta e infine, una certa quantità, per Seitz.

Tutta la serie di operazioni veniva compiuta in una sola mattinata.

Un'ansata del liquido filtrato veniva successivamente deposta sulla superficie di un agar-geñmi (brodo glicerinato al 2% con 2% di agar) e lasciata seccare; la piastra veniva tenuta in termostato a 37° C. La lettura veniva fatta dopo uno, due o più giorni a seconda della rapidità di sviluppo del ceppo impiegato.

In queste prime prove orientative noi usammo soltanto i seguenti ceppi (per i quali rimandiamo alla nostra prima nota sui micobatteri): Battaglini, Clegg I, Friburgensis, Grassberger, Lepra Kruse, *Myc. avium*, *Myc. enteriditis*, Pellegrino, Rabinowitsch e Timoteo. La ragione della scelta di questi ceppi e non di altri, risiedette nel fatto che da una serie di prove eseguite sulla termoresistenza dei micobatteri e sulla utilizzazione da parte loro degli idrati di carbonio (prove che, non appena terminate, riferiremo in una prossima nota) avevamo tratta la convinzione che i vari micobatteri sino ad oggi isolati e descritti si potessero riunire in un certo numero di gruppi più o meno ben distinti. I ceppi sopraelencati sono appunto i rappresentanti di alcuni di questi gruppi.

Le prove iniziate furono ben presto coronate da successo avendoci portato all'isolamento di vari fagi (Ortali, 1948; Penso e Ortali, 1948).

In una piastra di agar-Timoteo, trattata col filtrato di cui sopra, si cominciò col notare, infatti, una zona con ben 60 aree di lisi, zona che venne tagliata fuori dalla piastra, pestata in mortaio e diluita con brodo; la sospensione venne filtrata per carta e quindi per Seitz. Il filtrato venne nuovamente passato su agar-Timoteo: si riottenne la lisi. Il procedimento fu ripetuto sempre con egual successo e il fago venne così mantenuto su agar-Timoteo.

Dopo pochi giorni dal primo isolamento, si ottenne, sempre con la stessa tecnica, una lisi puntiforme in una piastra di agar-Friburgensis. Col metodo dell'agarpuntura si contaminò una seconda piastra di agar-Friburgensis ottenendo una zona litica di maggiori dimensioni e che venne successivamente trattata come quella ottenuta sul Timoteo.

In un terzo tempo si ottenne, sempre con lo stesso metodo, una lisi puntiforme in una piastra di agar-Pellegrino, zona litica che venne trattata come la precedente.

Dopo un mese dal terzo isolamento, un altro ne riuscì su agar-Rabinowitsch. Con la solita tecnica, il fago venne isolato e mantenuto su Rabinowitsch.

Altri fagi vennero successivamente isolati da piastre di Timoteo e da piastre di Friburgensis.

Nel frattempo avevamo richiesto a Gardner e Weiser il loro fago antismegmatis, fago che ricevemmo insieme al ceppo omologo di *Mycobacterium smegmatis*.

Avevamo, così, a disposizione 5 fagi antitimoteo, 2 fagi antifriburgensis, 1 fago antirabinowitsch, 1 fago antipellegrino e 1 fago antismegmatis.

PREPARAZIONE DEI FAGI

I fagi occorrenti per le varie prove da compiere venivano preparati su piastre di agar-Timoteo, agar-Friburgensis, agar-Rabinowitsch, agar-Pellegrino e agar-smegmatis che si contaminavano con sospensioni in brodo del fago omologo e venivano, quindi, poste in termostato a 37° C. A crescita e lisi avvenuta, l'intero strato di agar veniva raccolto e pestato in mortaio emulsionandolo con brodo di carne a pH 7,2. La sospensione così ottenuta veniva liberata dall'agar mediante filtrazione per Seitz. A volte, allorchè si temeva che il contenuto fagico dell'agar fosse scarso e che i pochi fagi presenti venissero trattiene dai filtri, centrifugavamo la sospensione dell'agar-brodo per un'ora a 5000 giri, raccogliendo il liquido sopranatante: tale tecnica si è dimostrata molto soddisfacente.

Per la preparazione delle sospensioni fagiche non abbiamo adottato il metodo delle culture liquide, giacchè i micobatteri, sui terreni liquidi, crescono esclusivamente in superficie risentendo — come ci è stato possibile constatare — scarso danno dai fagi presenti nel liquido sottostante; d'altro canto, il terreno di Dubos, pur non ostacolando la micobatteriofagia — come abbiamo constatato sperimentalmente — rallenta la moltiplicazione dei fagi. Per questi motivi abbiamo preferito preparare le nostre scorte partendo dai terreni solidi.

INDIVIDUAZIONE SIEROLOGICA DEI FAGI

Prima di procedere oltre nello studio dei fagi a nostra disposizione, era indispensabile stabilire la identità o meno dei dieci fagi in nostre mani. Unica via allo scopo era quella di sfruttare la capacità antigene dei fagi e di preparare gli antisieri corrispondenti che, com'è noto, inattivano i fagi omologhi.

Per compiere tale ricerca preparavamo una sospensione fagica come descritto nel paragrafo precedente, e la inoculavamo per via endovenosa, e nella dose di 5 cm³, a un coniglio ogni 5 giorni e per 45 giorni; alla fine di tale periodo il coniglio veniva salassato. Il sangue si lasciava sierare, e il siero veniva raccolto e diluito a diverso titolo. Mezzo centimetro cubo della prescelta diluizione di siero veniva mescolato con una goccia del fago da individuare; il miscuglio veniva mantenuto in termo-

stato per 24 ore a 37°C., dopo di che una goccia del miscuglio veniva saggiata col metodo dell'agar-patina.

Preparavamo, allo scopo, una emulsione in brodo del germe omologo al fago da saggiare, l'emulsione si faceva stemperando in brodo di carne a pH 7,2 la patina di un'agarcultura. Un'ansata (ansa da 4 mm.) di tale sospensione veniva portata sopra una piastra di agar glicerinato al 2%,

TABELLA I.

	Siero anti phlei	Siero anti lacticola	Siero anti Rabinowitsch	Siero anti smegmatis	Siero anti Pellegrino
PHAGUS PHLEI	+	—	—	—	—
PHAGUS LACTICOLA	—	+	—	—	—
PHAGUS RABINOWITSCHI	—	—	+	—	—
PHAGUS SMEGMATIS	—	—	—	+	—
PHAGUS PELLEGRINI	—	—	—	—	+

precedentemente preparata, controllata per due giorni in termostato a 37°C. e lievemente essiccata lasciandola — nell'ultima ora di permanenza in termostato — col coperchio leggermente sollevato. L'ansa, carica di materiale, si appoggiava sull'agar e con essa, muovendola a spirale, si copriva un'area di circa cm. 1,5-2 di diametro. Si lasciava essiccare per qualche minuto (2-5) e poi si deponeva su ogni area un'ansata del miscuglio fago-antisiero.

Se il siero preparato inattiva il fago in esame — il che significa che il fago con cui venne preparato il siero è identico al fago saggiato — si ha normale sviluppo del germe sull'agar-patina; se il siero preparato non

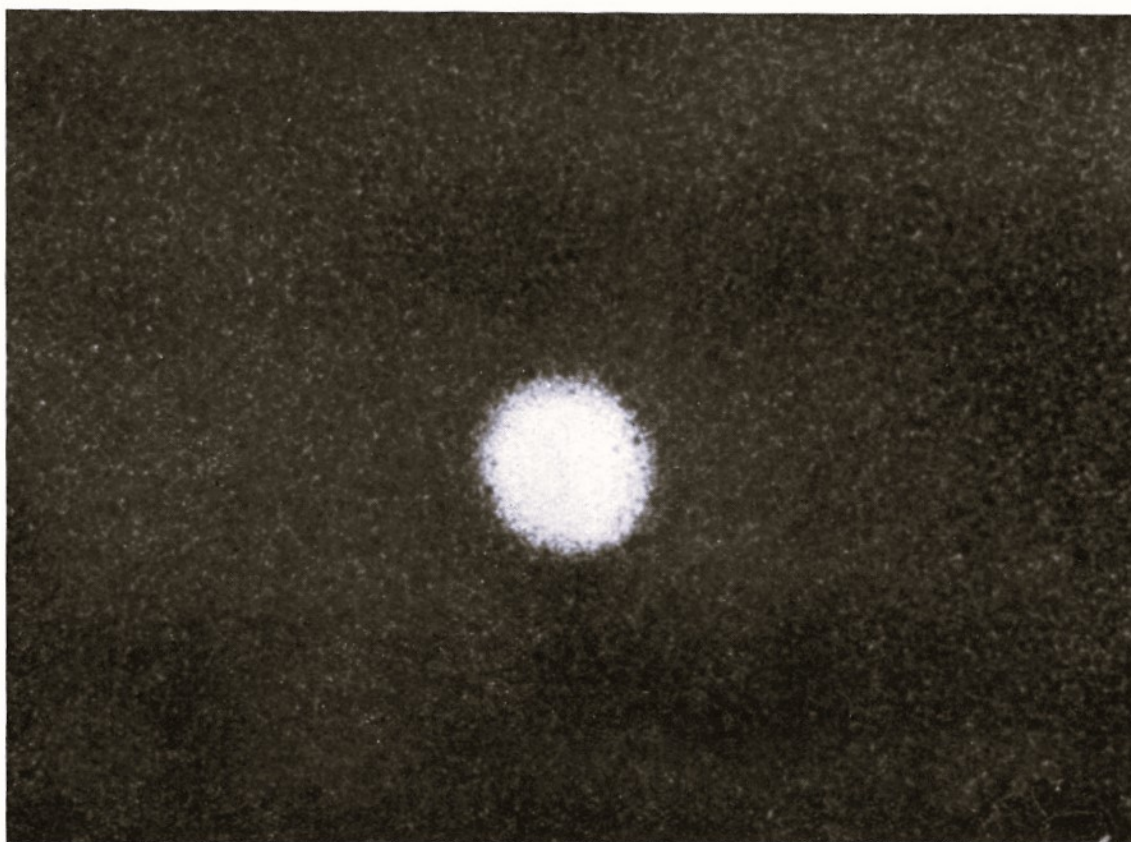


Fig. 2. - Placca litica da *Phagus laticola* su cultura di Friburgensis.

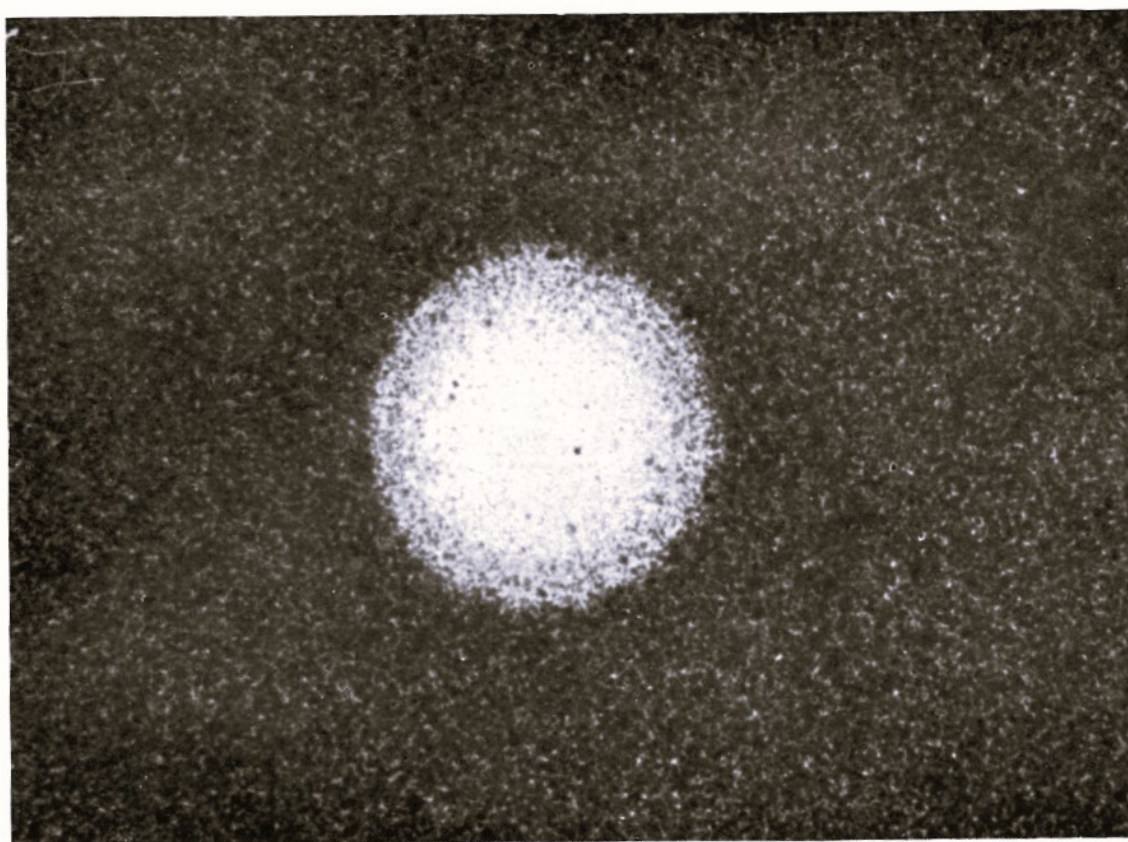


Fig. 3. - Placca litica da *Phagus Rabinowitschi* su cultura di Rabinowitsch.

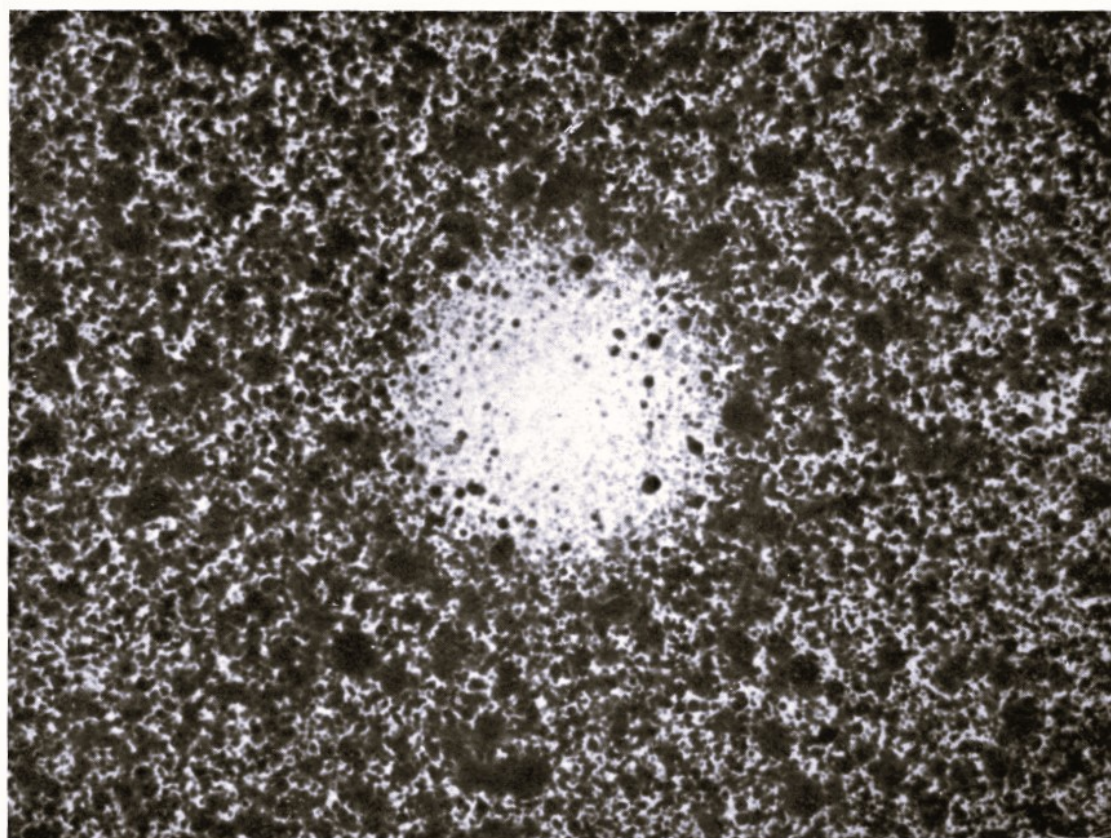


Fig. 4. - Placca litica da *Phagus smegmatis* su *Mycobacterium smegmatis*.

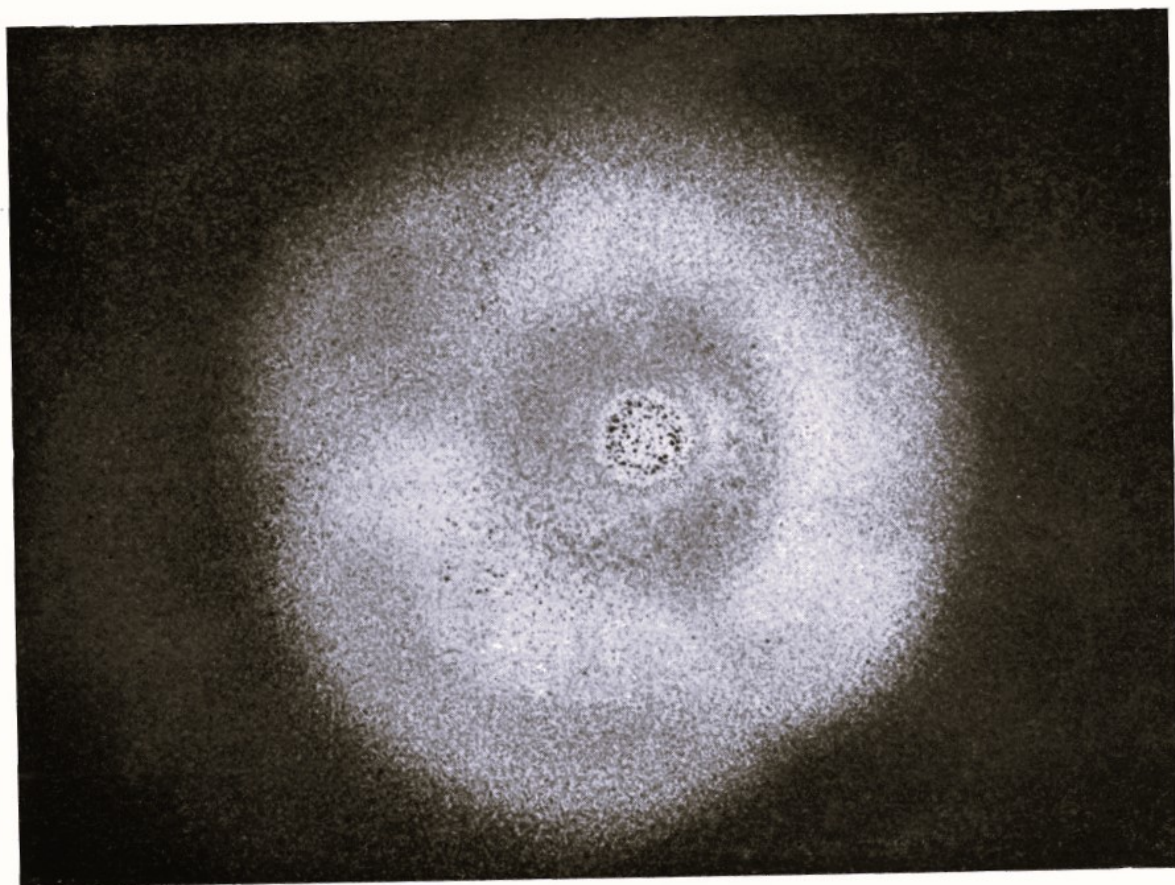


Fig. 5. - Placca litica tondeggiante da *Phagus Pellegrini* su cultura di Pellegrino.
Presenza di un atollo centrale.

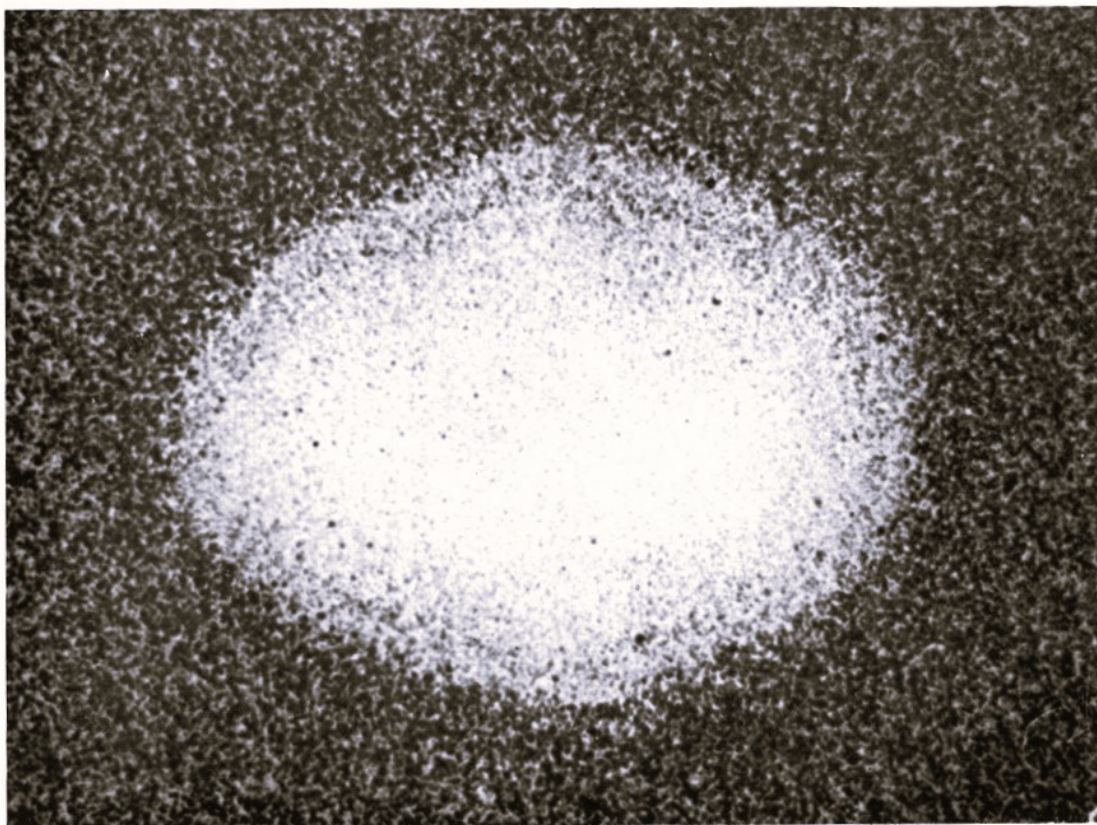


Fig. 6. - Placca litica allungata da *Phagus Pellegrini* su cultura di Pellegrino.

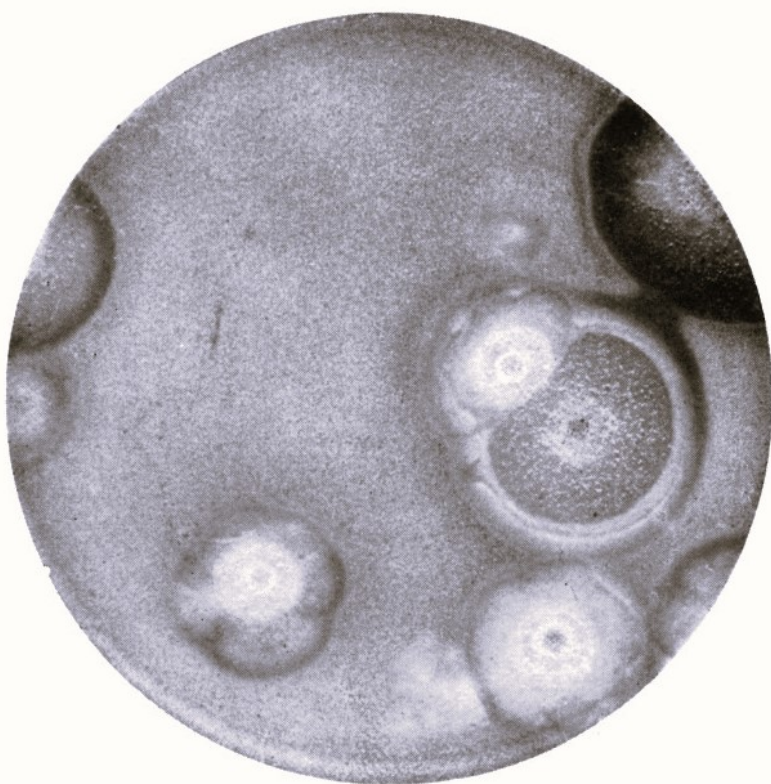


Fig. 7. - Piastra di Pellegrino con varie placche litiche da Phagus Pellegrini provviste tutte di atollo centrale.

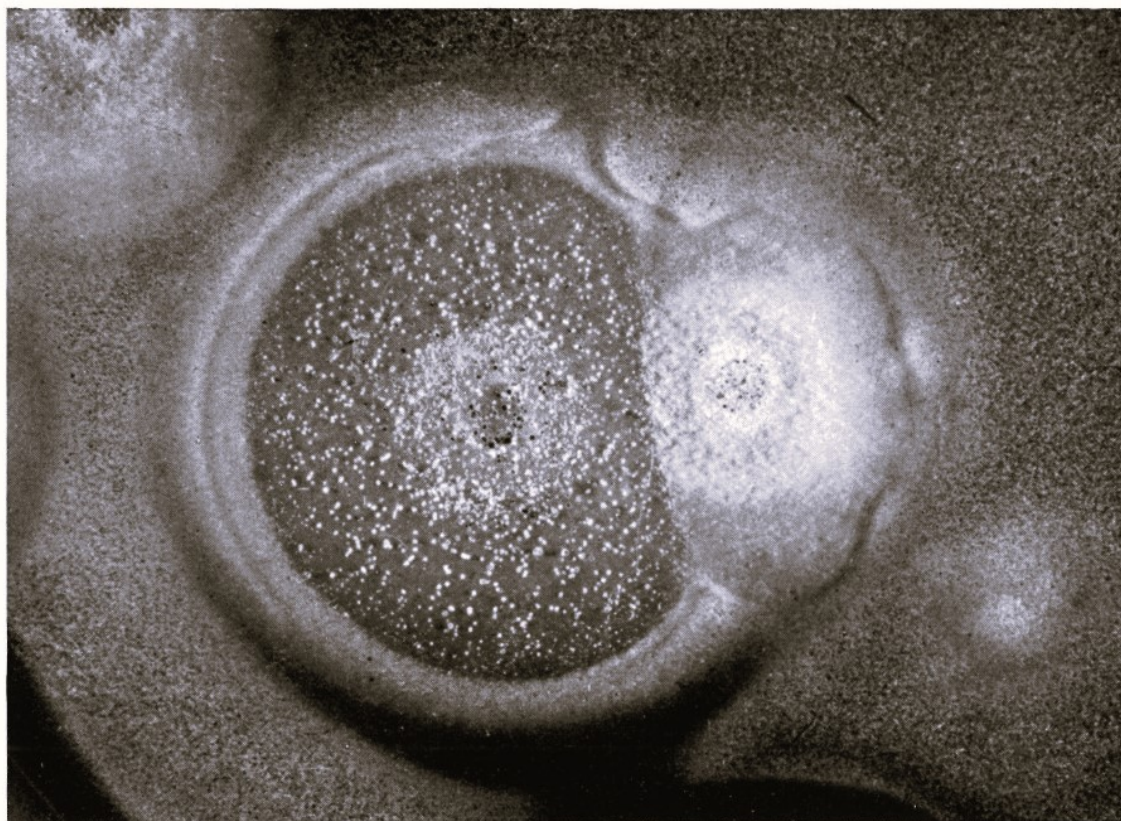


Fig. 8. - Particolare della figura precedente: incontro di due placche litiche e relativi atolli.

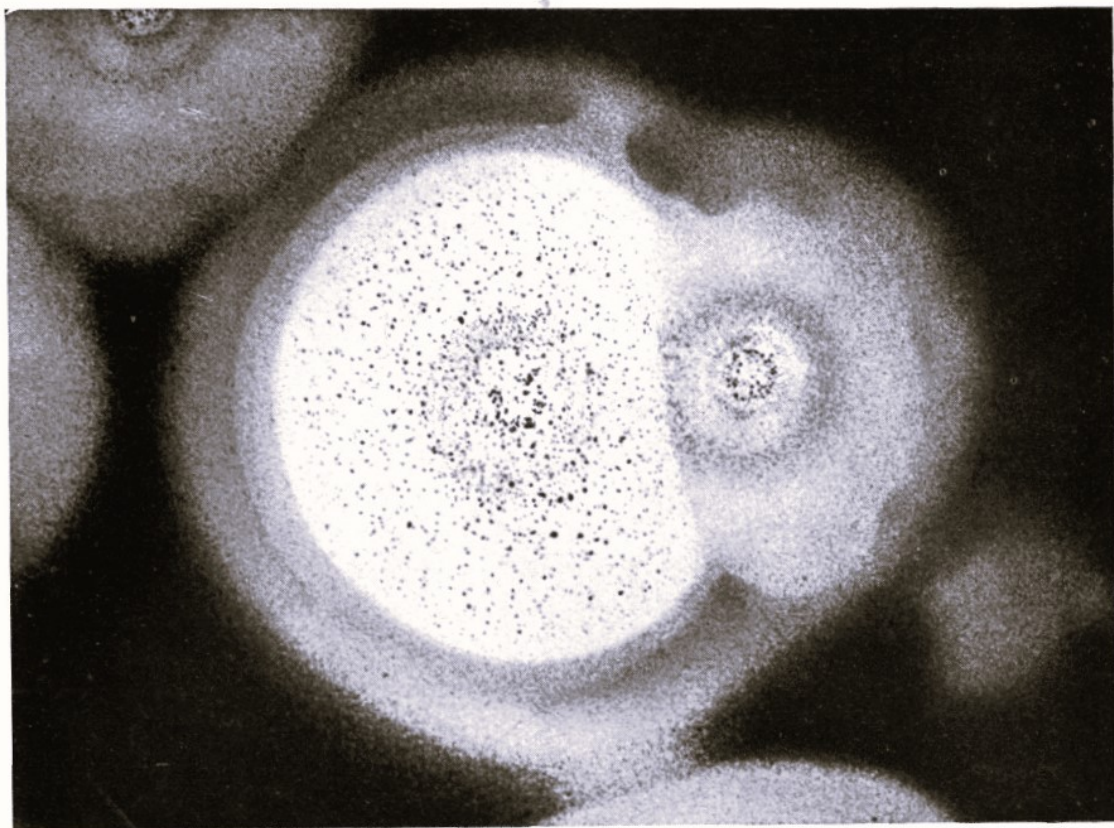


Fig. 9. - Le stesse placche della figura precedente viste in campo scuro.



Fig. 10. - *Phages phlei*. Preparato non metallizzato (4 cm. = 1 μ).

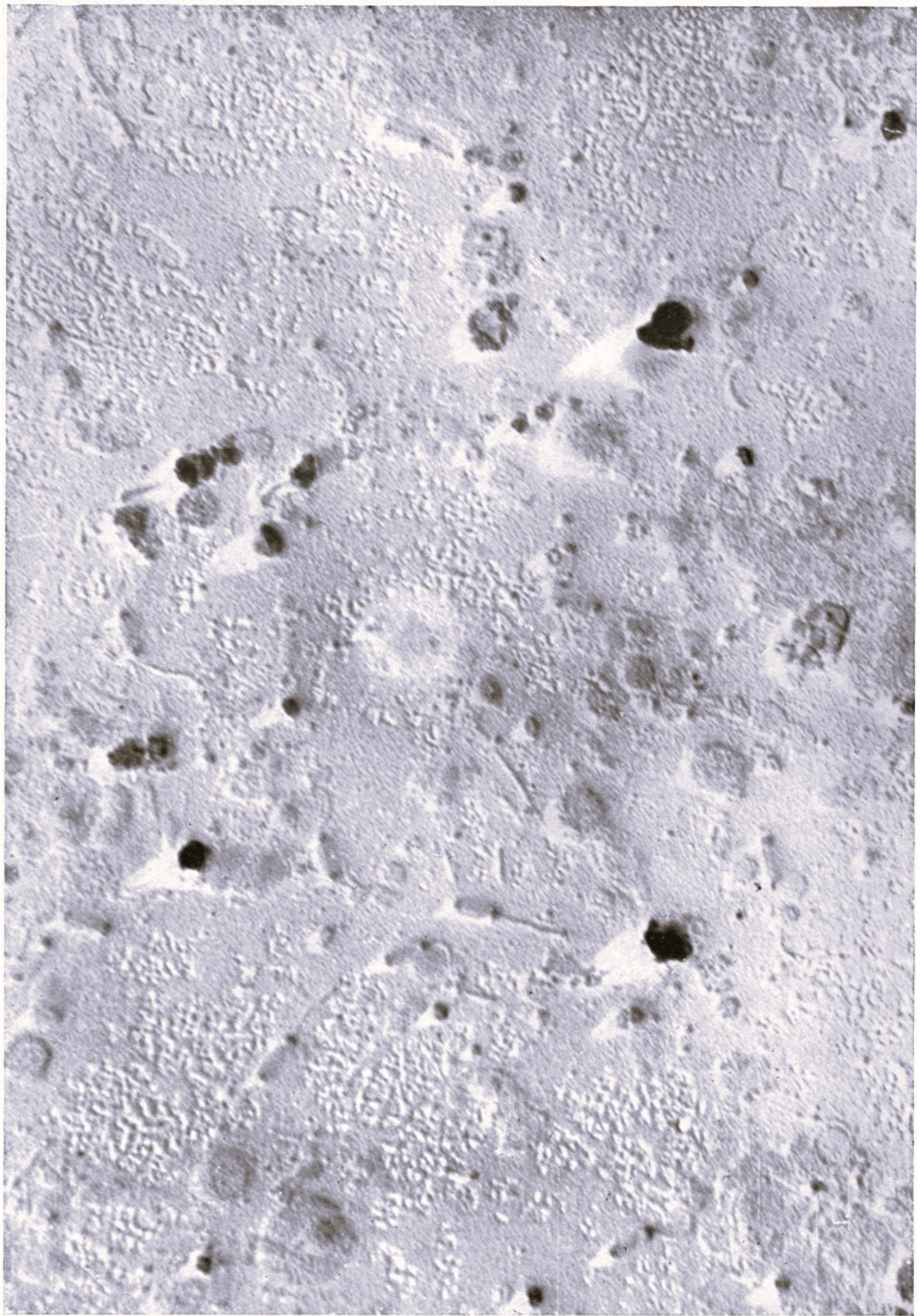


Fig. 11. - *Phagus phlei*. Preparato metallizzato. Osservare a sinistra il fago con il granulo dell'estremo non ciliato doppio ($4\text{ cm} = 1\text{ }\mu$).

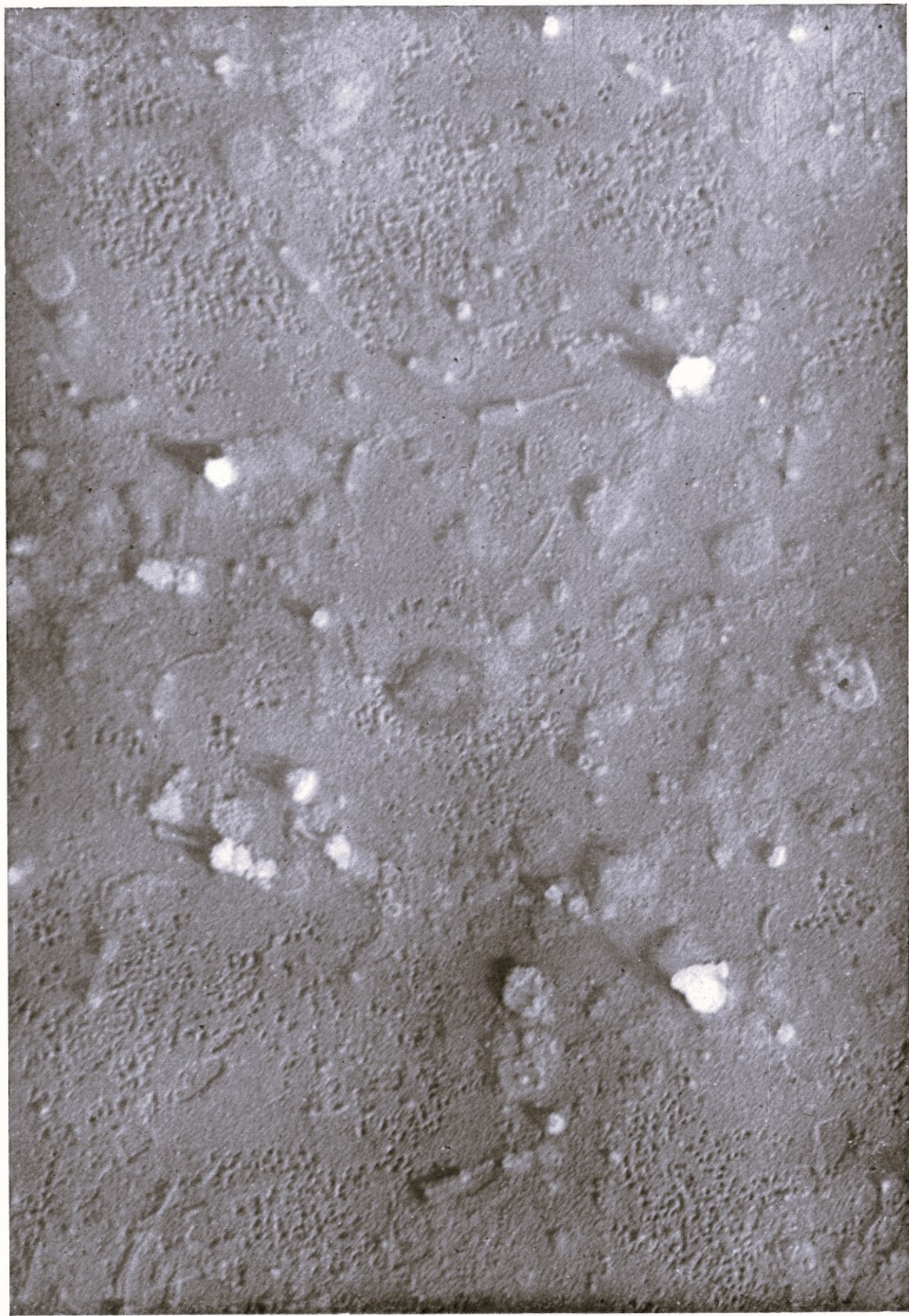


Fig. 12. - *Phagocytosis in Mycobacterium phlei*. Controtipo della figura precedente: si vede chiaramente il percorso endocellulare del ciglio ($4 \text{ cm} = 1 \mu$).

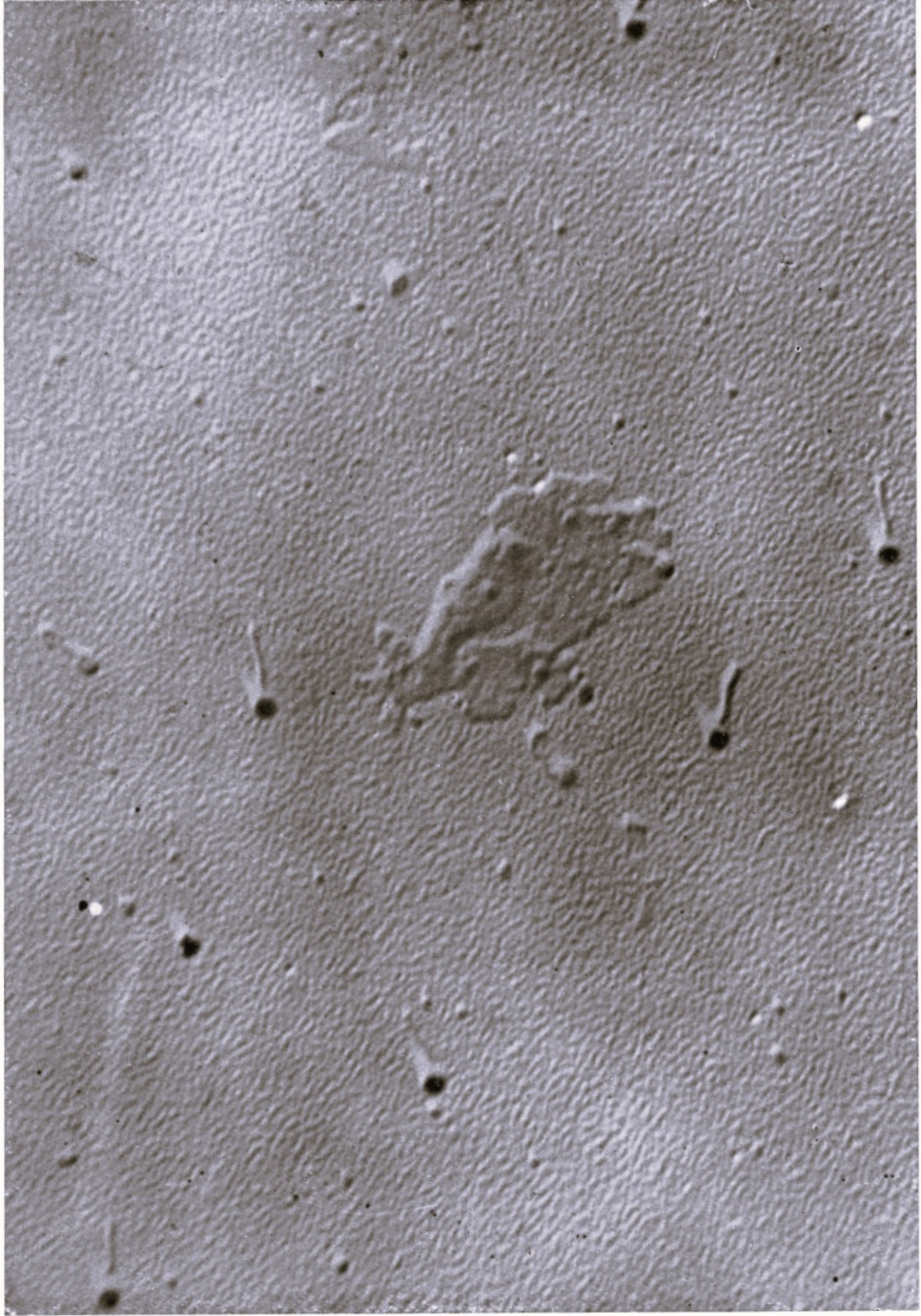


Fig. 13. - *Phagus lacticola*. Preparato metallizzato (4 cm = 1 μ).

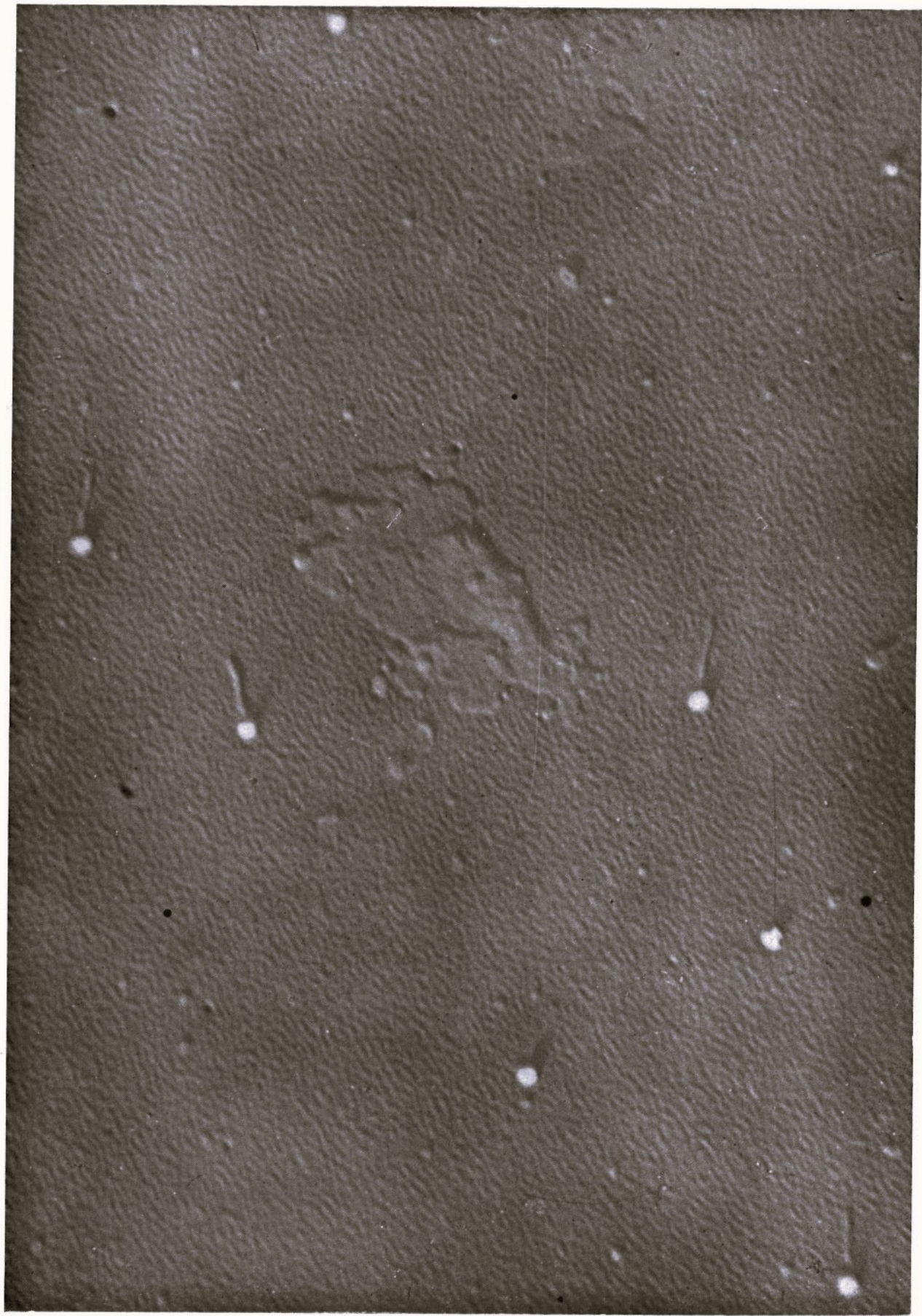


Fig. 14. - *Phages lacticola*. Controtipo della figura precedente: si vede chiaramente un sol granulo nell'interno del fago.

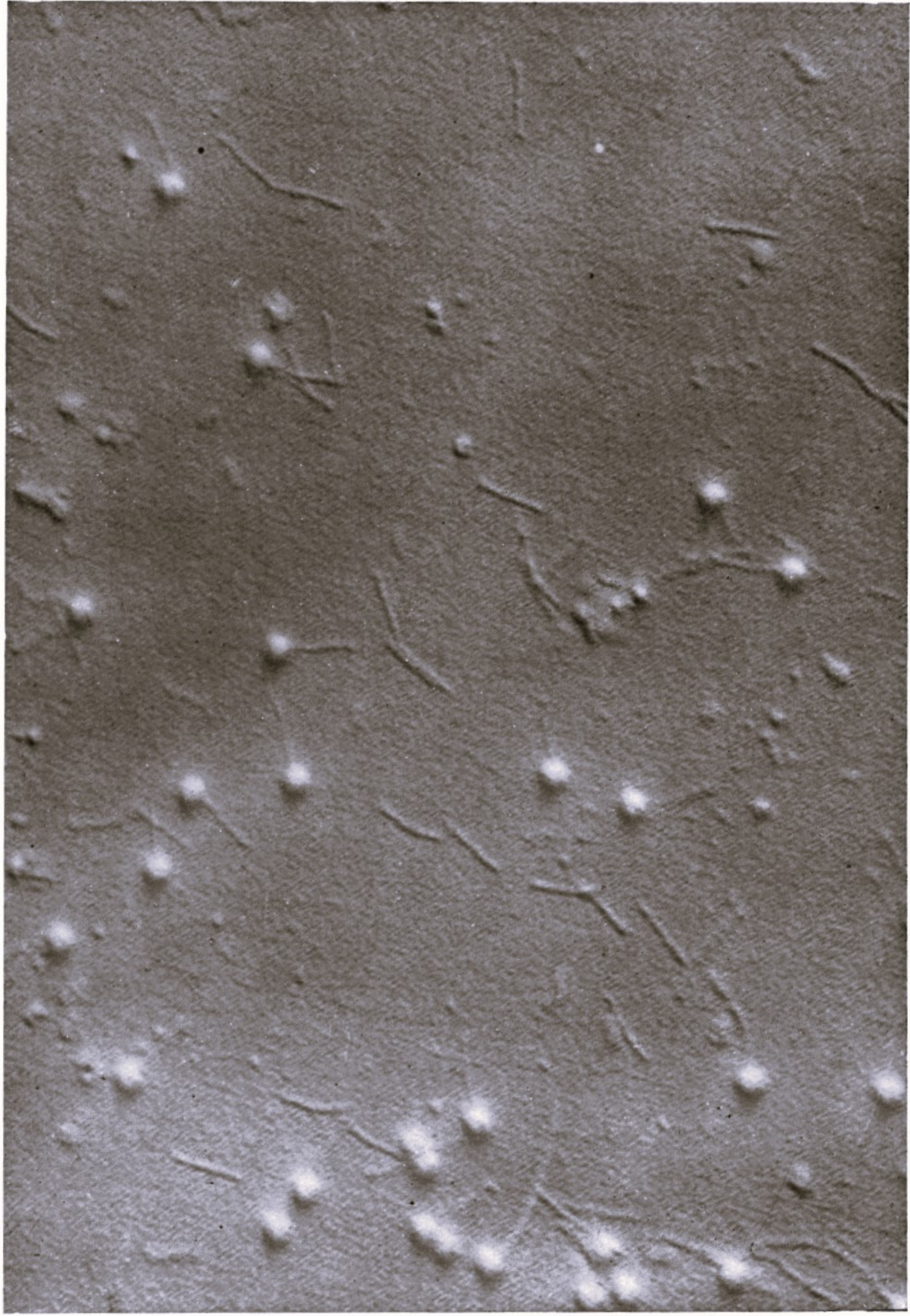


Fig. 15. - *Phagus lacticola*. Preparato metallizzato e controtipo: fagi completi e ciglia separate (4 cm = 1 μ).

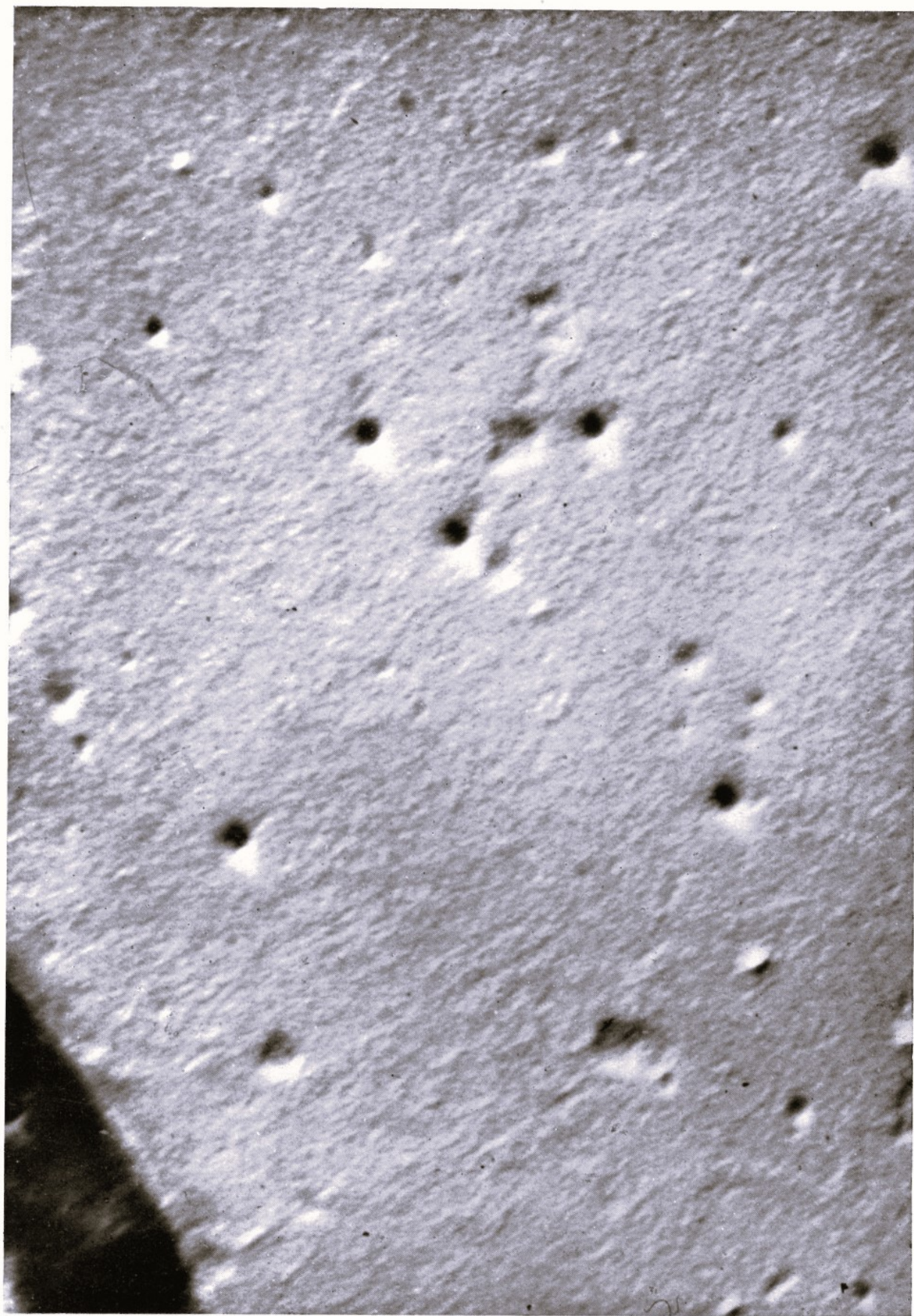


Fig. 16. - *Phagus Rabinowitschi*. Preparato metallizzato (4 cm = 1 μ).

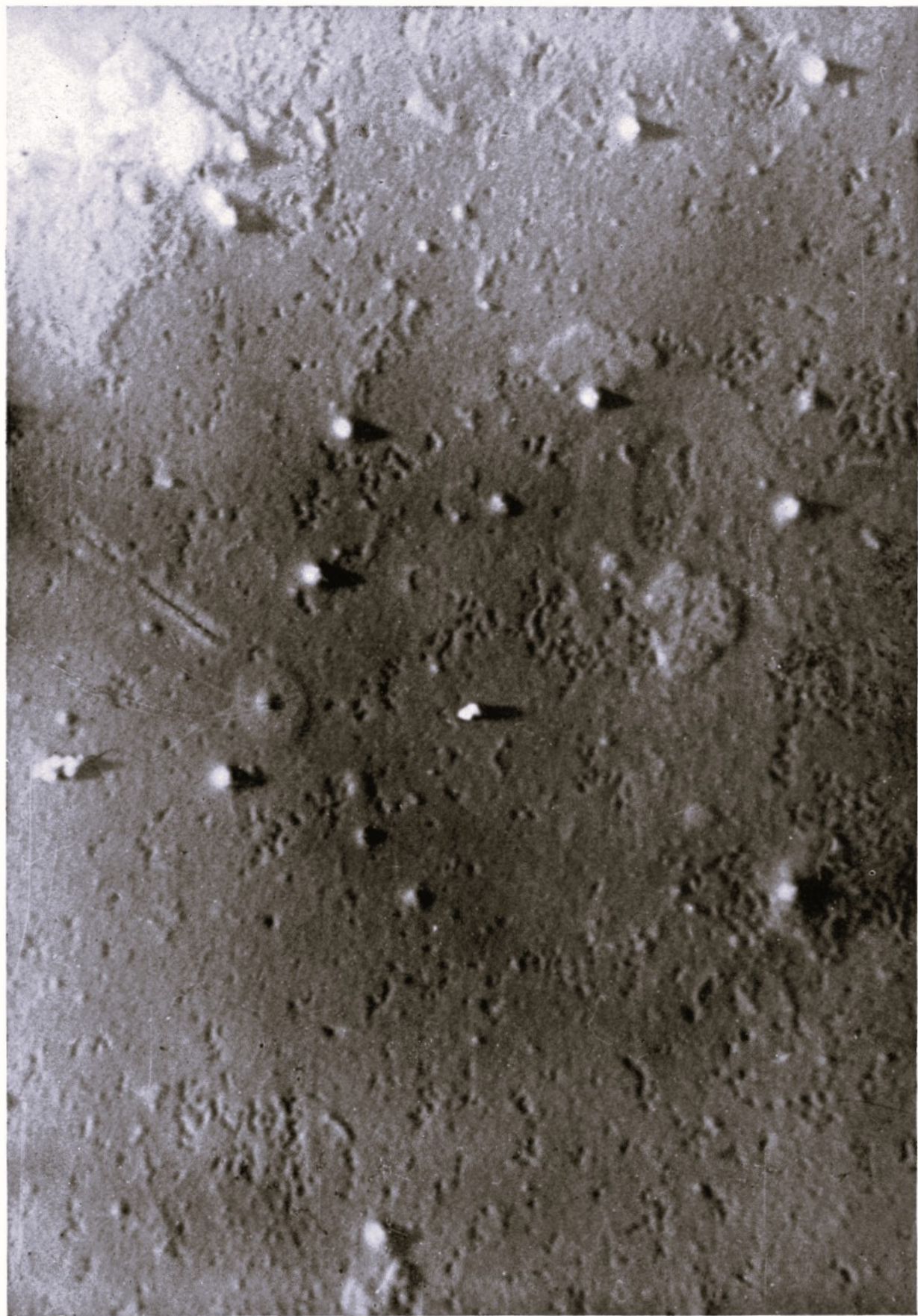


Fig. 17. - *Phagus Rabinowitschi*. Preparato metallizzato. Controtipo che mette in evidenza il grosso granulo interno (4 cm = 1 μ).

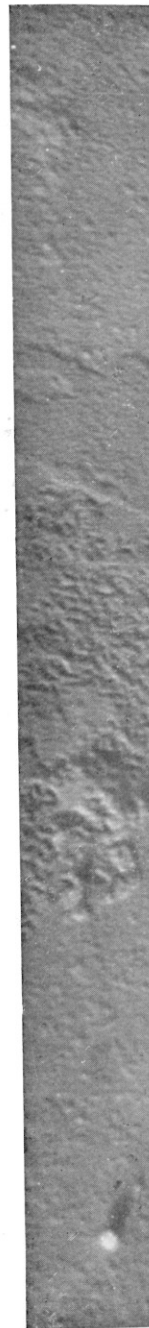


Fig. 18. - *Phagus smegmatis*. Preparato metallizzato.



Fig. 19. - *Phagus smegmatis*. Preparato metallizzato.

G. PENSO e V. ORTALI. - *I fagi dei micobatteri.*



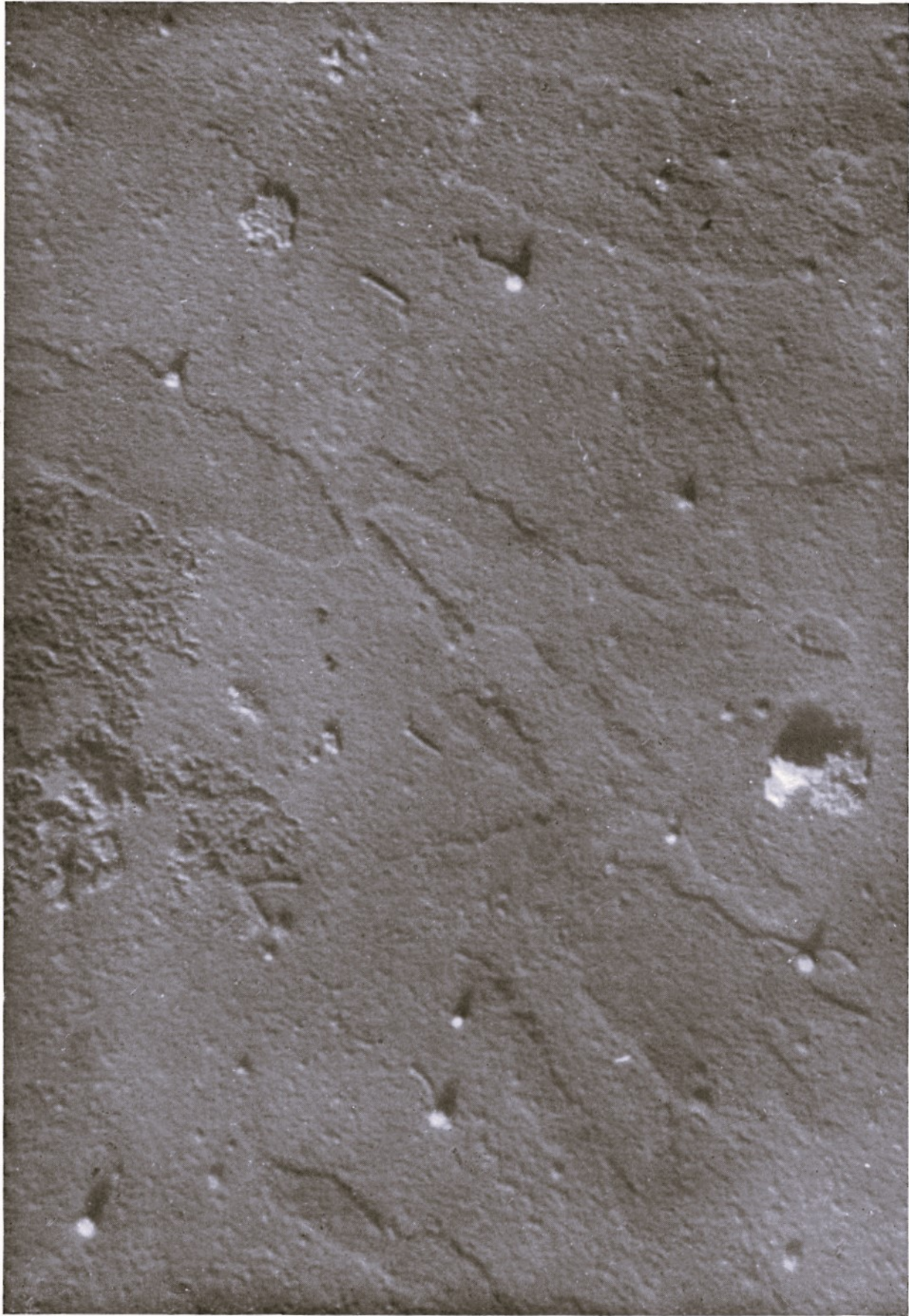


Fig. 20. - *Phagus Pellegrii*. Preparato metallizzato e controtipo.

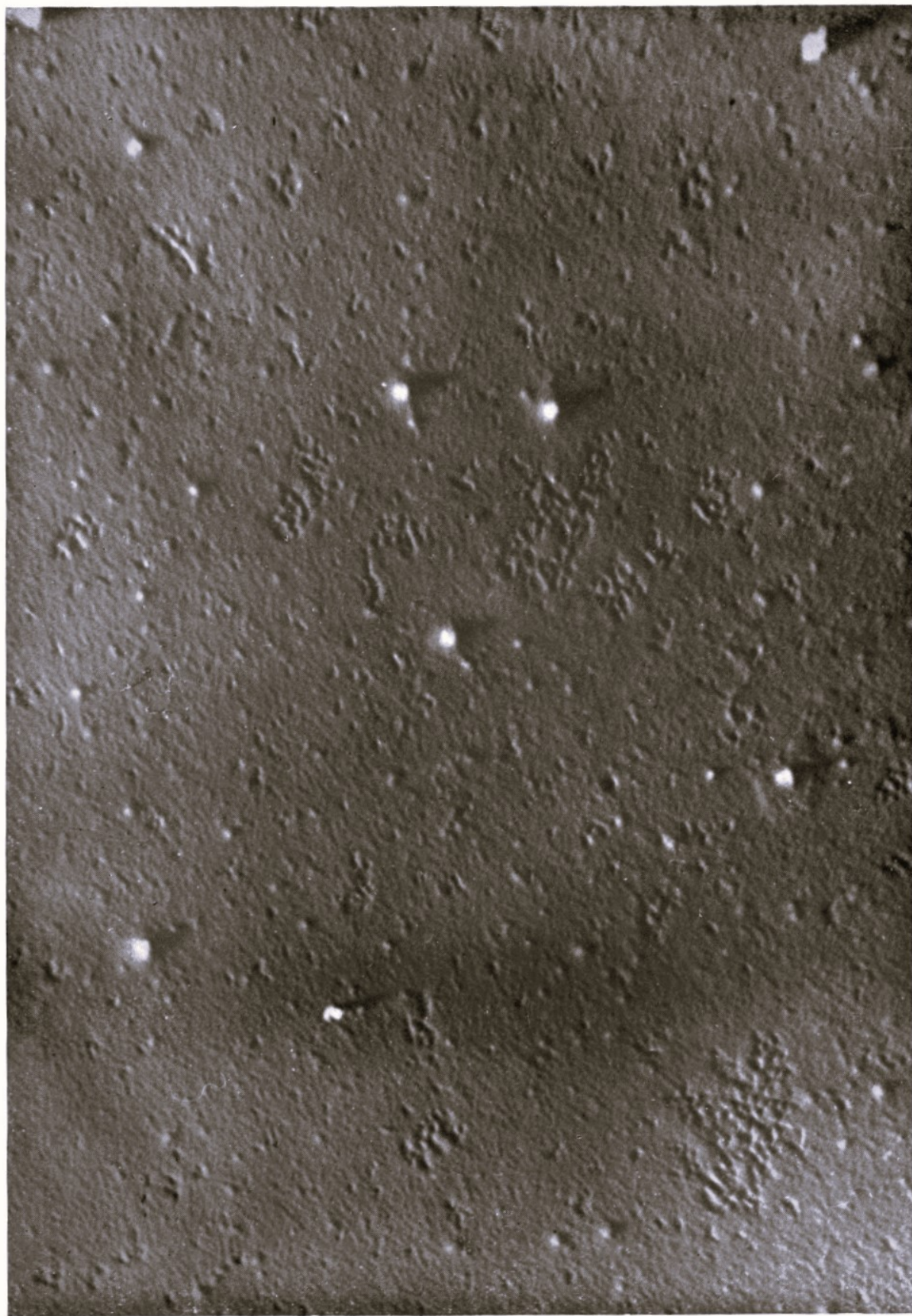


Fig. 21. - *Phagus Pellegrii*. Preparato metallizzato e controtipo. Si vedono nettamente i due granuli interni e il granulo sull'estremo ciliare (4 cm = 1 μ).

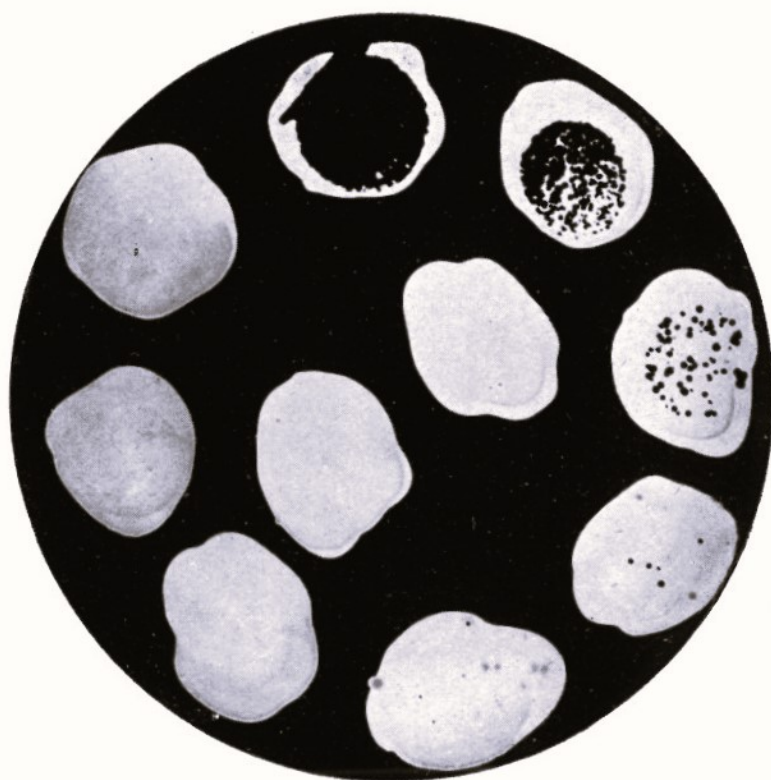


Fig. 22. - Titolazione di una sospensione fagica: fagi sono presenti sino alla quinta diluizione (al centro due controlli).

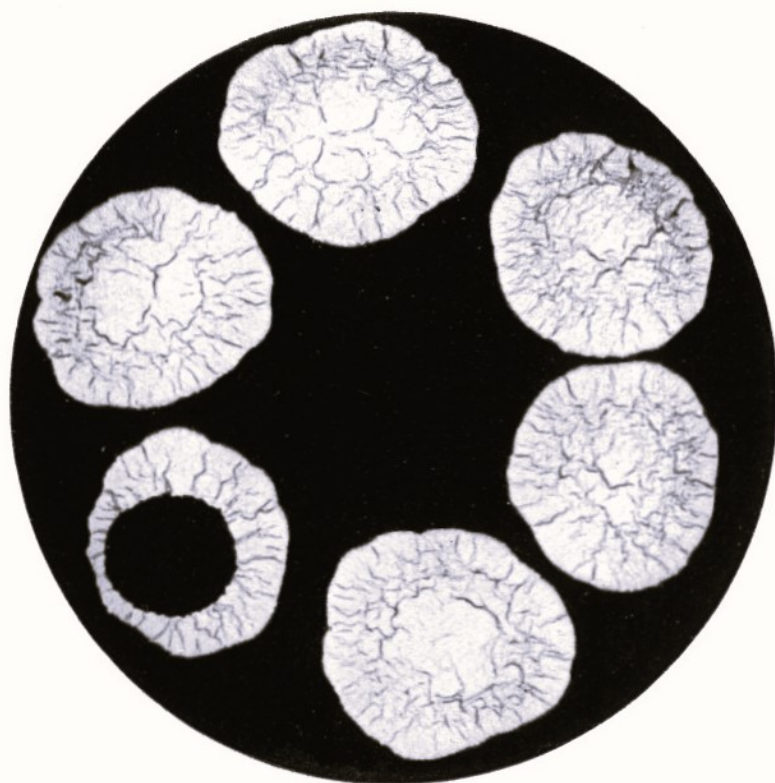


Fig. 23. - Micobatterio sensibile a un solo fago dei cinque saggiati (la sesta area è il controllo).

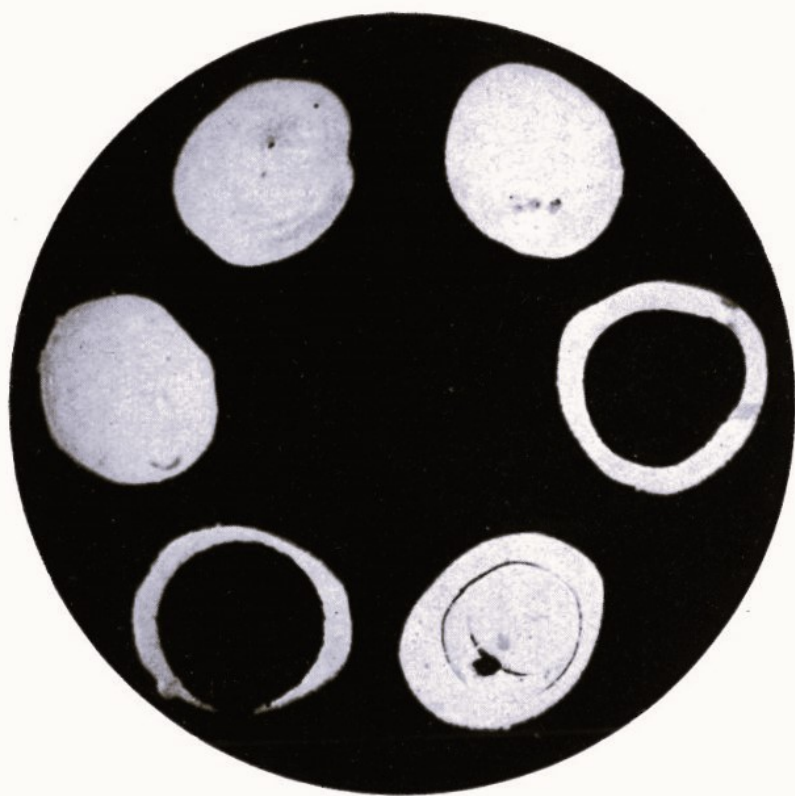


Fig. 24. - Micobatterio sensibile a tre fagi dei cinque saggiati (la sesta area è il controllo).

inattiva il fago in esame — il che significa che il fago con cui venne preparato il siero è diverso da quello del fago saggiato — si ha lisi sull'agar-patina.

Con tale metodo saggiammo dapprima i fagi isolati sullo stesso germe e precisamente i cinque fagi antitimoteo, che risultarono eguali tra loro, e i due fagi antifriburgensis che risultarono identici; successivamente praticammo le prove crociate tra l'antitimoteo, l'antifriburgensis, l'antirabinowitsch, l'antipellegrino e l'antismegmatis che risultarono tutti diversi tra loro.

I nostri fagi si riducevano, dunque, a cinque, come compendiamo nella tabella 1: un fago antitimoteo, al quale assegnamo il nome di *Phagus phlei*; un fago antifriburgensis, al quale assegnamo il nome di *Phagus lacticola*; un fago antirabinowitsch, che batteizzeremo col nome di *Phagus Rabinowitschi*; un fago antipellegrino, che chiameremo *Phagus Pellegrini*; un fago antismegmatis, che indicheremo col nome di *Phagus smegmatis*.

CARATTERISTICA MORFOLOGICA DELLE PLACCHE FAGICHE

Stabilita sierologicamente l'esistenza di cinque specie di micobatteriofagi, abbiamo voluto osservare se, nella loro estrinsecazione litica, le cinque specie si comportassero diversamente. Abbiamo potuto constatare, così, come ogni specie fagica desse sul ceppo omologo, col metodo dell'agar-germi, un'area litica a caratteristica sua propria.

Il *Phagus phlei* provoca una lisi a placca tondeggianti (fig. 1), a fondo non perfettamente trasparente, a margini leggermente sfumati; ogni placca ha un diametro medio di 2 mm (1,5-3 mm).

Il *Phagus lacticola* provoca una lisi a placca tondeggianti (fig. 2), a fondo trasparente, a margini netti, quasi a stampo: ogni placca è piccolissima e non supera mai 1 mm di diametro.

Il *Phagus Rabinowitschi* provoca una lisi a placca tondeggianti (fig. 3), a fondo poco trasparente, a margini netti e regolari; ogni placca è abbastanza grande presentando in media 2-3 mm di diametro.

Il *Phagus smegmatis* provoca una lisi tondeggianti a margini irregolari (fig. 4), a fondo molto trasparente; le placche hanno in media 2 mm di diametro.

Il *Phagus Pellegrini* provoca una placca a volte tondeggianti (fig. 5), a volte ellittica (fig. 6), a fondo molto trasparente, a margini spesso irregolari. Caratteristica principale delle placche di *Phagus Pellegrini* è quella di essere in continuo aumento di diametro sia sulle piastre lasciate in termostato, che in quelle lasciate a temperatura ambiente, tanto che la placca litica può raggiungere nello spazio di qualche settimana anche 2 cm di diametro. In queste vecchie placche, più o meno rotondeggianti,

ma a limite irregolare, si ha la crescita di colonie secondarie disposte tipicamente ad atollo al centro della placca stessa (fig. 5 e figg. 6, 7, 8,9).

Se due aree litiche vengono ad incontrarsi, esse si influenzano a vicenda e ognuna si comporta come se trovasse nell'altra un ostacolo alla propria espansione (figg. 7-9); anche l'atollo centrale partecipa a questo fenomeno in tutto analogo a quello osservato nell'incontro di due colonie di germi visibili (Penso, 1948).

In queste grandi placche di *Phagus Pellegrini* abbiamo voluto studiare il contenuto fagico lungo il diametro della placca: è risultato che i fagi sono presenti sia alla periferia, sia alla metà del raggio, sia in vicinanza dell'atollo, sia nell'atollo stesso che nel centro della placca.

DESCRIZIONE MORFOLOGIA DEI SINGOLI FAGI

Per completare le nostre conoscenze sui cinque fagi suddetti, non rimaneva che individuarne la forma, stabilirne la morfologia. Iniziammo, così, una serie di ricerche al microscopio elettronico con la speranza di poter vedere e fotografare i cinque fagi.

I primi tentativi furono vani, giacchè, con la comune tecnica di preparazione per l'osservazione elettronica (centrifugazione del materiale, lavaggio e nuova centrifugazione) non si riusciva a individuare alcun fago, nè fagi si potevano rinvenire nel materiale sottoposto a semplice filtrazione per Seitz.

Cambiammo, allora, tecnica e pensammo di usare il metodo a stampo: un vetrino coprioggetto veniva fatto intimamente aderire sull'agar di un'area fagica, il vetrino veniva poi asportato con una pinzetta e posto sopra un piano con la superficie di adesione rivolta verso l'alto; su tale superficie veniva deposta una goccia di acqua distillata e con un'ansa vi si stemperava il materiale rimasto aderente al vetrino. Un'ansata della sospensione veniva, infine, passata sopra una blenda. Con tale tecnica riuscimmo ad osservare i fagi. La visione elettronica, però, non era del tutto chiara, giacchè il campo microscopico appariva come annebbiato, velato, ovattato. Cercammo migliorare la tecnica: ponemmo una grossa ansata di acqua distillata direttamente sull'area fagica sfregando leggermente con l'ansa l'agar sperando di spostare, così, i fagi dall'agar nell'acqua; una piccola ansata del liquido ottenuto veniva poi trasportata sulla blenda o la stessa blenda veniva immersa capovolta nella goccia onde caricarla. I risultati furono migliori dei precedenti, ma non ancora ottimi, giacchè la velatura persisteva: l'attribuimmo a particelle di agar che passavano in sospensione. Cercammo di ovviare all'inconveniente preparando le nostre aree fagiche su agar più duro, al 3% anzichè al 2%, ed eliminando lo strisciamento dell'ansa sull'agar: un'ansata (ansa da 4 mm) di acqua

distillata veniva deposta sull'area fagica, si attendeva qualche minuto con la speranza che i fagi — che avevano visti ciliati e che presumibilmente dovevano essere mobili — passassero nella goccia; si prendeva allora la blenda che, capovolta, caricavamo portandola a contatto con la goccia.

Tale tecnica ci permise di ottenere preparati puliti, ricchi e fotografabili.

Le blende venivano osservate o direttamente, o previa metallizzazione. Questa seconda tecnica si è dimostrata la migliore per lo studio morfologico dei nostri fagi.

Passiamo, ora, alla metodica descrizione dei cinque fagi studiati.

Phagus phlei. — E' costituito da un corpo rigido, allungato e da un ciglio flessuoso. Il corpo è a bastoncello, di aspetto nettamente bacillare nei preparati non metallizzati (fig. 10), digitiforme, a dattero in quelli metallizzati (fig. 11). In questi ultimi si mette nettamente in evidenza una struttura interna: ad ogni estremo del corpo è presente un granulo. I due granuli sono generalmente di dimensioni e di aspetto diverso: il più piccolo sembra essere meno compatto, meno spesso del più grande, tondeggiante, talvolta duplice, i due granuli assumono allora l'aspetto di un chicco di caffè. Dal granulo più piccolo si diparte un ciglio che attraversa il corpo del fago (fig. 12) e raggiunge il granulo più grande che si presenta di solito a semisfera; superato questo secondo granulo, il ciglio diviene libero, ispessendosi leggermente, ma mantenendosi flessibile per tutta la sua lunghezza.

Le dimensioni medie del *Phagus phlei* sono: lunghezza del corpo μ 0,15-0,20; larghezza μ 0,05-0,06; lunghezza del ciglio libero μ 0,25-0,30; suo spessore μ 0,01; spessore dei granuli μ 0,025-0,03.

Phagus lacticola. — E' costituito da un corpo rigido, sferico e da un ciglio lungo, poco flessuoso. Il corpo è quasi a palla, compatto, sprovvisto apparentemente, nelle fotografie dirette, di speciale organizzazione interna (fig. 13), mentre nei controtipi (fig. 14) è possibile mettere in evidenza almeno un granulo vicino al punto dal quale si distacca il ciglio. Questo si mostra poco flessuoso, ed è piuttosto spesso e fragile, giacchè in alcuni preparati (fig. 15) si rinvenivano numerose ciglia distaccate dai rispettivi corpi.

Le dimensioni del *Phagus lacticola* sono: diametro del corpo μ 0,05-0,06; lunghezza del ciglio μ 0,24-0,28, suo spessore μ 0,02.

Phagus Rabinowitschi. — E' costituito da un corpo rigido, sferico e da un ciglio molto corto. Il corpo è a palla, grosso, compatto (fig. 16) sprovvisto di un grosso granulo interno visibile soprattutto nelle fotografie a controtipo (fig. 17). In vicinanza di tale granulo si distacca il ciglio corto, poco flessibile e che presenta un ingrossamento terminale.

Le dimensioni del *Phagus Rabinowitschi* sono: diametro del corpo μ 0,07-0,08; lunghezza del flagello μ 0,12-0,15, suo spessore μ 0,03.

Phagus smegmatis. — E' costituito da un corpo rigido, allungato e da un ciglio abbastanza flessuoso (fig. 18 e 19). Il corpo è quasi rettangolare e nel suo interno si distinguono nettamente due granuli posti ognuno a un estremo. I due granuli non hanno uguale compattezza, e quello opposto al lato da cui si libera il ciglio sembra essere più grosso. Il ciglio è abbastanza spesso, discretamente lungo e flessuoso, esso si origina da un estremo del fago e probabilmente dal granulo prossimiore. Non sembra che il ciglio percorra un tratto nell'interno dell'endoplasma come nel *Phagus phlei*. All'estremo libero del ciglio si osserva un piccolo ingrossamento.

Le dimensioni del *Phagus smegmatis* sono: lunghezza del corpo μ 0,08-0,09; larghezza μ 0,035; lunghezza del ciglio μ 0,16-0,19, suo spessore μ 0,02; spessore medio dei granuli μ 0,03.

Phagus Pellegrini. — E' costituito da un corpo tondeggianti rigido e da un ciglio flessibile (fig. 20). Il corpo dà l'impressione di essere più lentiforme che sferico, nel suo interno è possibile mettere in evidenza due granuli allungati (fig. 21). Il ciglio è abbastanza lungo, sottile, pochissimo sinuoso e sprovvisto di un granulo alla sua estremità.

Le dimensioni del *Phagus Pellegrini* sono: diametro del corpo μ 0,06-0,07; lunghezza del ciglio μ 0,15-0,16, suo spessore μ 0,017; spessore del granulo μ 0,01.

Dall'insieme delle osservazioni compiute risulta, quindi, che i cinque fagi attivi sui micobatteri hanno ognuno una propria individualità morfologica, oltrechè sierologica.

TITOLAZIONE DELLE SOSPENSIONI FAGICHE

Stabilito il numero delle specie fagiche in nostro possesso, titolammo le diverse sospensioni dei fagi onde conoscerne l'esatta concentrazione e poter preparare sospensioni tipo con numero fisso e costante di fagi per centimetro cubo.

Anche per la titolazione delle sospensioni abbiamo preferito la tecnica su agar a quella su terreni liquidi, e ciò per evitare le difficoltà e gli ostacoli derivanti dall'uso dei terreni liquidi e di cui abbiamo detto più sopra. Come metodo abbiamo scelto quello dell'agar patina, così come è stato descritto nel paragrafo precedente, con la differenza di sostituire all'ansata del miscuglio fago-antisiero, una goccia di sospensione fagica debitamente diluita. La deposizione della goccia veniva fatta usando una pipetta di 1/10 di cm^3 e depositando su ogni area 1/100 di cm^3 di sospensione fagica. Abbiamo preferito questa tecnica a quella dell'ansa — co-

munemente usata nella tipizzazione delle salmonelle — perchè la riteniamo molto più precisa e tale da far ritenere di immettere sulla patina sempre un'egual quantità di sospensione fagica.

Questa sospensione veniva diluita sino a 10^{-12} usando, per le varie diluizioni, provettoni da 25 mm di diametro e 10 cm³ di liquido in toto (9+1). Tra una diluizione e l'altra cambiavamo naturalmente di pipetta.

L'ultima diluizione che provocava una o più placche litiche veniva considerata contenere uno o più fagi per cm³ (fig. 22).

Titolata la concentrazione delle varie sospensioni fagiche, abbiamo preparato per ognuna di esse una sospensione di 1.000.000 di fagi per cm³, sospensione che abbiamo adottato come nostra concentrazione tipo.

ATTIVITÀ DEI FAGI

Individuati e titolati i vari fagi, abbiamo indagato sulla loro sfera di azione cimentandoli con tutti i micobatteri «classici» in nostre mani. Con il termine «classico» intendiamo indicare i micobatteri presenti nelle varie collezioni batteriologiche sparse per il Mondo, già noti in letteratura e comunemente indicati con un nome ben definito e preciso, anche se non specifico: quei micobatteri, insomma, che nella nostra già riferita prima nota sull'argomento, chiamammo «Ceppi di collezione». Abbiamo preferito limitare per il momento la nostra indagine a tali ceppi, sembrandoci ancora prematuro saggiare una lunga serie di germi di nuovo isolamento e sui quali nulla sappiamo all'infuori della loro acidoresistenza e della loro origine.

Per il compimento di tali indagini, abbiamo operato con due diverse tecniche: col metodo dell'agar-patina, che abbiamo più sopra già descritto, e con quello dell'agar-germi che standardizzammo nella seguente maniera: 20 cm³ di agar glicerinato (brodo glicerinato al 2% con aggiunta del 2% di agar) venivano versati in una capsula di Petri di 10 cm di diametro nella quale avevamo già versato 1 cm³ di una sospensione del germe da saggiare; si agitava, si lasciava solidificare e si poneva in termostato a 37° C. per un'ora e col coperchio sollevato. Si aggiungeva, quindi, un'ansata di sospensione fagica (ansa da 4 mm e 1.000.000 di fagi per cm³) e si rimetteva in termostato. La lettura veniva fatta 25, 36, 48 o più ore dopo a seconda della velocità di sviluppo del germe in esame.

I due metodi più o meno si equivalgono, sebbene quello dell'agar-patina debba considerarsi leggermente più sensibile. Tale maggiore sensibilità è probabilmente dovuta al fatto che la sospensione fagica, essendo deposta direttamente sopra lo strato batterico, viene a più intimo contatto con i germi che non la goccia deposta sopra un agargermi nel quale i batteri sono sparsi per tutto lo spessore dell'agar. Limitiamo,

TABELLA II.

ATTIVITÀ DEI FAGI.
(1.000.000 di φ per cm^3)

C e p p o	<i>Phagus phlei</i>	<i>Phagus lacticola</i>	<i>Phagus Rabino- witschi</i>	<i>Phagus smegmatis</i>	<i>Phagus Pellegrini</i>
B 10	Lc	—	—	—	—
Battaglini	—	—	—	—	—
Barry	—	—	—	—	—
Beck	—	—	—	—	« Lc
Beck RR	—	—	—	—	« Lc
Boquet	—	—	—	—	—
Boquet Lebailly	—	—	—	—	—
Brinckerhoff I	—	—	—	—	—
Brinckerhoff II	—	Lc	Lc	—	—
Butter	—	—	—	—	—
Clegg I	—	—	—	—	—
Clegg II	—	—	—	—	—
Chaffour Ch4	—	—	—	—	—
Ching-Fong	—	—	—	—	—
Crottin	Lc	—	—	—	—
Cummins	—	—	—	—	—
Currie	—	—	—	—	—
D6	—	Lc	—	—	—
Danes	—	Lc	« Lc	—	—
De Sanctis Monaldi	—	—	—	—	—
Duval	—	—	—	—	—
Elly	—	—	—	—	—
Favia	—	—	—	—	—
Fish	—	—	—	—	—
Fleol	Lc	—	—	—	—
Friburgensis	—	Lc	« Lc	Lc	—
Friedmann	—	—	—	—	—
Friedmann 946	—	—	—	—	—
Frog	—	—	—	—	—
Frosh	—	—	—	—	—
Gp 60	—	Lc	—	« Lc	—
Gp 61	—	Lc	Lc	—	—
Grassbacillus	—	Lc	—	Lc	—
Grassberger	—	—	—	—	—
Grustern	—	—	—	—	—
H10	—	—	Lc	Lc	—
Hallibut	—	—	—	—	—
Karlinski	—	—	« Lc	+++ Pp	—
Karlinski 2071	—	« Lc	+++ Pp	—	—
Kedrowski	—	—	—	—	—
Korn	—	Lc	Lc	+++ Pp	—
L 619	Lc	—	—	—	—
Lanterna	—	—	—	—	—
Lepra Krause	—	—	—	—	—
Levy Chrome	—	—	—	—	—
Loewenstein	—	—	—	—	—
Marpmann	—	—	Lc	Pm	—
Mayeranne	—	+++ Pp	Lc	« Lc	—
Milch	—	Lc	+++ Pp	Lc	—
Moeller	Lc	—	—	—	—
Muir 3460	—	—	—	—	—
<i>Myc. album</i>	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Bang	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Colarieti	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Cow 18	—	—	—	—	—

Segue: TABELLA II.

C e p p o	<i>Phagus phlei</i>	<i>Phagus lacticola</i>	<i>Phagus Rabino- witschi</i>	<i>Phagus smegmatis</i>	<i>Phagus Pellegrini</i>
<i>Myc. avium</i> Cow 19	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Cow 73	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Cow 70	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Cow 75	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Goring	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Lafont	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> M	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> New Haw	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> P	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Poulet 3	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Rhode Island	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> Sentille	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> WP	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> ZS	—	—	—	—	—
<i>Myc. avium</i> 17	—	—	—	—	—
<i>Myc. enteridis</i>	—	—	—	—	—
<i>Myc. marinum</i>	—	—	—	—	—
<i>Myc. muris</i> D 15	—	—	—	—	—
<i>Myc. phlei</i> 54	Lc	—	—	—	—
<i>Myc. phlei</i> 525	—	+++ Pp	+++ Pp	Lc	—
<i>Myc. piscium</i>	—	—	—	—	—
<i>Myc. smegmatis</i> Un. of Wash.	—	Lc	—	Lc	—
<i>Myc. smegmatis</i> 52	—	Lc	—	Lc	—
<i>Myc. smegmatis</i> 53	—	Lc	—	Lc	—
<i>Myc. stercoris</i> 3820	—	Lc	—	Lc	—
<i>Myc. stercoris</i> 3821	—	Lc	Lc	++ Pp	—
Nabarro Bayon	—	—	—	—	—
Needham 361	—	—	—	—	—
Ninni N16	—	—	—	—	—
Pellegrino	—	—	—	—	Lc
Pseudoperlsucht	—	+++ Pp	« Lc	—	—
Rabinowitsch R	—	Lc	Lc	Lc	—
Rabinowitsch S	—	Lc	Lc	—	—
Randoni	—	« Lc	« Lc	« Lc	—
Rost Williams	—	—	—	—	—
Saenz	—	—	—	—	—
Schildkröte	—	—	—	—	—
Seine	—	—	—	—	—
Serpent S20	—	—	—	—	—
Smegma 19	—	Lc	+++ Pp	Lc	—
Smegma 22	—	Lc	+++ Pp	Lc	—
Terrapin 2006	—	—	—	—	—
Thouroff T21	—	—	—	—	—
Timoteo	Lc	—	—	—	—
Trompete	—	—	—	—	—
Urina Vitello	—	—	—	—	—
Vallée Gelb	—	—	—	—	—
Valtis Van Deinse Bianco	—	—	—	—	—
Valtis Van Deinse Rosso	—	—	—	—	—
Vip 27	Lc	—	—	—	—
Vip 28	Lc	—	—	—	—
18 « 518 »	—	—	—	—	—

SPIEGAZIONE DEI SEGNI

—: nessuna azione. - Lc: lisi confluyente. - « Lc e « Lc: lisi meno netta. - Pp: placche piccole con oltre 20 (+), 50 (++), 100 (+++) placche per area.

quindi, la pubblicazione dei dati ai risultati ottenuti con il metodo dell'agar-patina.

Ogni germe veniva cimentato con i cinque fagi: la prova veniva eseguita sopra una sola piastra nella quale si allestivano sei piccole patine batteriche con la tecnica già descritta a proposito della individuazione sierologica dei fagi: una patina serviva da controllo, le altre cinque per cimentare i cinque fagi (fig. 23).

I ceppi di micobatteri saggiati sono stati esattamente 107, come risulta dalla tabella II nella quale i risultati vengono forniti analizzando il fenomeno della batteriofagia nei suoi dettagli; per ogni risultato positivo, infatti, viene specificato il tipo di lisi: confluyente (Lc), a placche piccole (Pp).

Dall'esame della tabella risulta come, accanto a un certo numero di micobatteri rimasti insensibili all'azione dei fagi, ve ne siano numerosi altri che vengono attaccati da uno o da più di uno dei suddetti cinque fagi.

Vengono attaccati esclusivamente dal *Phagus phlei* i seguenti ceppi: B 10; Crottin; Fleol; L 619; Moeller; *Mycobacterium phlei* 54; Timoteo; Vip. 27; Vip. 28.

Viene attaccato esclusivamente dal *Phagus lacticola* il seguente ceppo: D 6.

Vengono contemporaneamente attaccati dal *Phagus lacticola* e dal *Phagus Rabinowitschi* i seguenti ceppi: Brinckerhoff II; Danes; GP 61; Karlinski 2071; Pseudoperlsucht; Rabinowitsch S.

Vengono contemporaneamente attaccati dal *Phagus lacticola* e dal *Phagus smegmatis* i seguenti ceppi: Grassbacillus; *Mycobacterium smegmatis* Univ. of. Wash.; *Myc. smegmatis* 52; *Myc. smegmatis* 53; *Myc. stercoris* 3820; Smegma 19; Smegma 20.

Vengono contemporaneamente attaccati dal *Phagus lacticola*, dal *Phagus Rabinowitschi* e dal *Phagus smegmatis* i seguenti ceppi: Friburgensis; Korn; Mayeranne; Milch; *Mycobacterium phlei* 525; *Myc. stercoris* 3821; Rabinowitsch R; Randoni.

Vengono, infine, attaccati esclusivamente dal *Phagus Pellegrini* i seguenti ceppi: Beck; Beck RR; Pellegrino.

Dall'analisi di questi risultati si nota subito come i micobatteri attaccati dal *Phagus phlei* siano sensibili soltanto a questo fago e a nessuno degli altri quattro.

Ugual osservazione vale per i micobatteri attaccati dal *Phagus Pellegrini*.

Il *Phagus lacticola*, il *Phagus Rabinowitschi* e il *Phagus smegmatis* hanno, invece, una certa analogia tra loro essendo essi capaci di attac-

care contemporaneamente — tutti e tre insieme o due per volta — gli stessi micobatteri.

Come interpretare questo fatto? Evidentemente questi tre fagi debbono essere capaci di attaccare più antigeni presenti nei micobatteri: quando uno di questi antigeni è presente in più specie, lo stesso fago è capace di attaccare tutte le specie di micobatteri che contengono quell'antigene.

In ogni modo è logico pensare che i micobatteri sensibili a uno o più dei tre fagi in questione debbano essere molto vicini tra loro e contenere uno o più antigeni in comune. I micobatteri attaccati, invece, dal *Phagus phlei* e dal *Phagus Pellegrini* debbono costituire due gruppi molto omogenei e ben diversi dagli altri.

Non vogliamo entrare nel presente lavoro sulla possibilità di differenziare specificatamente i vari micobatteri saggiandoli con i diversi fagi: affronteremo tale argomento in una delle nostre prossime note, allorché avremo pubblicato altre ricerche collaterali che ci serviranno ai fini della sistematica. Ci limitiamo oggi a dire che tale possibilità esiste, e che, praticamente, i sette gruppi sopra elencati debbono probabilmente corrispondere ad altrettanti gruppi (specie o varietà) di micobatteri, come altre specie debbono esistere tra quei micobatteri che sono risultati insensibili all'azione dei suddetti cinque fagi adoperati nelle esposte concentrazioni. Vedremo prossimamente come, aumentando di molto la concentrazione dei fagi per centimetro cubico, sia possibile ottenere reazioni crociate e derivarne fagi indotti sui seguenti ceppi: Battaglini, Barry, Boquet, Brinckerhoff I, Clegg I e II, Ching-Fong, Cummins, Curry, Duval, Elly, Fish, Friedmann, Frog, Grassberger, Hallibut, Levy Chrome, Loewenstein, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium enteritidis*, *Mycobacterium muris* D 15.

D'altro canto, prima di terminare, diremo ancora come i cinque fagi in questione si siano dimostrati inattivi verso ceppi di stafilococco, streptococco, coli, tifo, shiga, proteo, colerico e difterico.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.
22 gennaio 1949.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREJEW A., L'autolyse du bacille de la fièvre, Ann. Inst. Pasteur, 72, 798 (1946).
GARDNER G. M. e WEISER R. S., «Mycobacterium smegmatis» bacteriophage, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 206 (1947).
JOHNSON T. B. e RENFREW A. G., Some chemical changes accompanying the growth of tubercle bacilli on Long's synthetic medium, Amer. Rev. Tub., 17, 508 (1928).
LAPORTE R., Un mode particulier d'autolyse microbienne: la désintégration progressive du bacille du genre *Mycobacterium*, Ann. Inst. Pasteur, 69, 262 (1943).

- ORTALI V., Isolamento di tre batteriofagi anti-micobatterici, Rend. Acc. Naz. dei Lincei, seduta del 9 giugno 1948.
- ORTALI V. e PENSO G., Studio morfologico al microscopio elettronico dei fagi attivi sui micobatteri, Rend. Acc. Naz. dei Lincei, seduta dell'8 gennaio 1949.
- PENSO G., Soglia di patina e policolonie, Rend. Ist. Sup. di Sanità, 11, 1183 (1948).
- PENSO G., CATTANEO C., MORELLINI M. e ORTALI V., Studi e ricerche sui micobatteri
Nota I: Premesse generali ed elenco dei ceppi di collezione e di nuovo isolamento, Rend. Ist. Sup. di Sanità, 11, 1496 (1948).
- PENSO G. e ORTALI V., Isolamento e studio di fagi attivi sui micobatteri, Rend. Acc. Naz. dei Lincei, seduta dell'11 dicembre 1948.
- STEENKEN W., Lysis of tubercle bacilli in vitro, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 33, 253 (1935).
-