

70. Vittorio ORTALI e Giuseppe PENSO. — Studi e ricerche sui micobatteri. — Nota V. Sul riconoscimento specifico di un fago antimicobatterico e sulla possibilità di diagnosticare la specie di un fago.

Riassunto. — Per determinare la specie linneiana di un fago occorre basarsi su questi tre elementi: 1° inattivazione del fago in esame coll'antisiero specifico; 2° morfologia del fago; 3° attività del fago. Basandosi su questa metodica, si dimostra come il fago antimicobatterico di Hauduroy e Rosset sia da diagnosticarsi col *Phagus smegmatis* (P. e O., 1948).

Résumé. — Les possibilités de diagnostiquer l'espèce — dans un sens linnéen — d'un phage, étaient jusqu'à présent minimales, pour ne pas dire nulles. Pour cette raison, tous les principaux phages sont connus par des symboles ou par le nom du germe sur lequel ils agissent.

Seul Holmes a courageusement proposé une classification systématique et une dénomination linnéenne des phages, mettant à la base de cette classification les trois éléments suivants: 1) activité du phage; 2) dimensions des taches lytiques; 3) dimensions de chaque phage. — Ces éléments, toutefois, n'ont pas un caractère de certitude sur lequel on puisse toujours se baser; ils sont par conséquent peu utilisables en pratique.

A ces éléments les AA. ont substitué les éléments suivants: 1) inactivation du phage par un antisérum spécifique; 2) morphologie du phage; 3) activité du phage.

Chaque phage produit, chez le lapin, un antisérum qui inactive le phage même; chaque phage, lorsqu'il est étudié au microscope électronique, a sa morphologie particulière, complexe et caractéristique; chaque phage, lorsqu'il est essayé par une technique standard, montre de posséder une individualité biologique qui lui est propre.

Les trois éléments proposés comme ci-dessus sont appropriés et suffisants pour reconnaître l'espèce d'un phage inconnu.

Par cette technique, les AA. ont démontré que le phage antimycobactérien de Hauduroy et Rosset est le *Phagus smegmatis* (P. et O., 1948).

Summary. — The possibilities of determining the species, in a Linnaean sense, of a phage, have been up to the present extremely small, not to say none at all. For this reason, all of the most important phages are known either by symbols or by the names of the germs on which they individually produce a lysis.

Holmes alone had the courage of proposing a systematic classification of phages and a Linnaean denomination of them, basing this classification on the three following elements: 1) activity of the phage; 2) dimensions

of the phage plaques; 3) dimensions of the individual phages. — These elements, however, are not such certain data that they might in all cases be relied upon, and therefore, be utilizable in diagnostic practice.

For the above named elements, the AA. have substituted, in order, the following: 1) inactivation of the phage by its specific antiserum; 2) morphology of the phage; 3) activity of the phage.

Each phage produces in the rabbit an antiserum which inactivates the phage itself; each phage, when studied with the electron microscope, has a complex and characteristic morphology of its own; each phage, when tested by a standard technique, has a biological individuality of its own.

The three elements proposed are sufficient to recognize the species of an unknown phage.

By this technique the AA. have demonstrated that the antimycobacterial Hauduroy and Rossett's phage is the *Phagus smegmatis* (P. and O., 1948).

Zusammenfassung. — Die Möglichkeiten, die Species eines Phagus zu bestimmen (was in einem Linnéschen Sinne zu verstehen ist) waren bis jetzt sehr gering, wenn überhaupt irgendwelche vorhanden waren. Aus diesem Grunde sind die wichtigsten Phagi entweder durch symbolische Zeichen oder unter dem Namen des Keimes, worauf jeder Phagus eigentlich wirkt, gekennzeichnet worden.

Erst Holmes hat mutig eine Systematik der Phagi und eine Linnésche Nomenklatur derselben vorgeschlagen, wobei er dieser Systematik die drei folgenden Elemente zu Grunde legte: 1) Aktivität des Phagus; 2) Dimensionen der lytischen Flecke; 3) Dimensionen der einzelnen Phagi.

Diese Elemente stellen jedoch keine sicheren Daten dar, worauf man in allen Fällen basieren könne, weshalb sie in der diagnostischen Praxis kaum zu verwenden sind.

Aus diesem Grunde haben die Verfasser die genannten Elemente durch andere ersetzt, und zwar, ordnungsmässig, wie folgt: 1) Inaktivierung des Phagus durch das spezifische Antiserum; 2) Morphologie des Phagus; 3) Aktivität des Phagus.

Jeder Phagus erzeugt beim Kaninchen ein Antiserum, welches den Phagus selbst inaktiviert; jeder Phagus, wenn er mit dem Elektronenmikroskop studiert wird, hat eine eigene mannigfaltige und charakteristische Morphologie; jeder Phagus, wenn er durch eine Standardtechnik untersucht wird, stets zeigt eine eigene biologische Individualität.

Die drei somit vorgeschlagenen Elemente sind geeignet und genügend, um die Species eines unbekannten Phagus zu ermitteln.

Durch eine solche Technik haben die Verfasser bewiesen, dass der antimycobakterische Phagus von Hauduroy und Rosset der *Phagus smegmatis* ist. (P. and O., 1948).

Tutti gli Autori che hanno lavorato, o ancora lavorano sui fagi, parlano di questi senza dar loro alcuna denominazione linneiana e indicandoli semplicemente o col nome del germe su cui vennero isolati (batteriofago paratifo B, batteriofago stafilococcico Twort e simili) o indicandoli con uno simbolo (batteriofago C 8, D 20, S 13 e via dicendo).

Dopo un primo e incerto tentativo di d'Herelle (1918 e 1923), soltanto l'Holmes, nel 1939, ebbe la coraggiosa idea di creare una sistematica dei fagi e di proporre per essi una tassonomia linneiana, sistematica e tassonomia sulle quali egli è tornato nel 1948.

L'Holmes basa la propria classificazione sui seguenti tre elementi:

- 1) attività del fago;
- 2) dimensioni e aspetto delle placche fagiche;
- 3) dimensioni dei singoli fagi.

E' bene avvertire il lettore che l'Holmes non ha mai lavorato personalmente sui fagi, e che il suo tentativo sistematico si basa su dati forniti da diversi Autori, dati che non sempre sono attendibili, perchè in parte superati.

Le dimensioni dei singoli fagi, per esempio, sono dedotte da calcoli matematici basati sulla filtrazione, sulla ultracentrifugazione e sulla irradiazione; orbene, con tali tecniche si hanno dati non sempre precisi, scarti molto elevati e cifre che si riferiscono a forme astratte e che non tengono conto del rapporto lunghezza-larghezza del fago, e della presenza del ciglio. Il microscopio elettronico ci ha oggi dimostrato l'approssimazione di quei calcoli, la possibilità di avere fagi le cui dimensioni medie possono aggirarsi sull'ordine del decimo di micron, come abbiamo già descritto (1949), e non soltanto su quello del centesimo di micron, come registra l'Holmes, e l'importanza del ciglio, le cui dimensioni e il cui aspetto muta da specie a specie fagica.

Anche le dimensioni e l'aspetto delle placche fagiche, pure essendo talvolta dati coadiuvanti la diagnosi di specie, pure non sono dati probativi e fissi: noi (1948 e 1949) abbiamo per esempio veduto come il nostro *Phagus Pellegrini* possa presentare — in identiche condizioni di sviluppo, di concentrazione, di germe omologo e di tempo — placche tondeggianti, placche ellittiche, placche con atollo centrale, placche senza atollo, nonchè placche le cui dimensioni sono estremamente variabili e comprese nel rapporto da 1 a 100.

Il campo di azione del fago è un dato certamente di basilare importanza; esso, però, non ha valore assoluto, essendo spesso in funzione

della concentrazione a cui il fago si adopera, del germe su cui esso si fa agire e del terreno che si adopera. Esistono poi, fagi ad azione polivalente, ad azione specie specifica e fagi ad azione tipo specifica, e fagi che, pur essendo sicuramente differenti tra loro, sono capaci di attaccare uguali specie batteriche: un esempio è fornito dai nostri *Phagus lacticola*, *Phagus Rabinowitschi* e *Phagus smegmatis*; un altro esempio ce lo dà lo stesso Holmes il quale ha creato ben 11 specie di fagi capaci tutti di attaccare la *Shigella dysenteriae*.

Un dato, invece che ha importanza basilare nella diagnosi specifica dei fagi è quello della loro inattivazione con gli antisieri specifici. Tale fenomeno venne messo in evidenza da Bordet e Ciuca sin dal 1921 e impiegato successivamente da vari Autori (particolarmente dal Burnet, 1933) per la differenziazione dei vari ceppi di fagi attivi sui dissenterici. L'Holmes, pur non basando la propria classificazione generale su questo fenomeno, ne tiene conto ma soltanto per quei fagi su cui tale ricerca venne praticata.

Un altro elemento bisogna, infine, prendere in considerazione per riconoscimento specifico dei fagi: quello della loro struttura morfologica studiata con l'aiuto del microscopio elettronico. I vari Autori che si sono occupati dell'argomento sono tutti d'accordo nell'affermare che i vari fagi presentano, dal punto di vista morfologico, «une structure complete et variable suivant le bacteriophage» per ripetere, a mo' di conclusione, le parole di Giuntini, Lépine, Nicolle, e Croissant (1947).

Col perfezionamento della tecnica elettronica, noi possiamo oggi penetrare maggiormente in quella «struttura complessa» e comprenderla in un certo senso almeno tanto per dire che la struttura morfologica di un fago è molto caratteristica, che in esso si osservano sempre dei granuli posti in posizione fissa, un ciglio in parte libero e in parte endosomatico, un granulo sull'estremità libera del ciglio; per dire ancora che fagi della stessa specie sono sempre identici tra loro e a tal punto che si direbbero tutti fatti sullo stesso stampo, a differenza degli schizomiceti che, se osservati al microscopio elettronico, pur mostrando una certa analogia tra gli individui di una stessa specie, pure non si ha mai identità tra tali individui.

Prendiamo ad esempio il *Phagus phlei*: la sua forma a bastoncino, la presenza costante dei due granuli apicali, il ciglio libero e la sua porzione endosomatica, le dimensioni trasverse e longitudinali, la lunghezza e lo spessore del ciglio sono tutti elementi costanti e inconfondibili: allo stato attuale delle nostre conoscenze, soltanto il *Phagus phlei* si presenta con quell'aspetto caratteristico, con quella struttura particolare, con quelle dimensioni tipiche. Esso ha, quindi, una propria inconfondibile personalità morfologica.

Uguale ragionamento può applicarsi agli altri fagi da noi studiati e descritti.

Basandosi sulle premesse or ora esposte, siamo noi in grado, allo stato attuale dei fatti, di poter diagnosticare, in senso linneiano, un fago di nuovo isolamento o uno di collezione, ma semplicemente conosciuto con un simbolo?

Noi crediamo ciò possibile e riteniamo che l'applicazione pratica di questa possibilità permetta una charificazione dell'intero problema dei fagi, dia adito a una limitazione delle specie conosciute, e porti a una unità d'intenti nello studio dei fagi, in tal maniera che lo stesso fago possa chiamarsi nella stessa maniera in tutto il mondo, e che dinanzi a un fago ignoto chiunque possa riconoscerne l'esatta posizione sistematica e diagnosticarne la specie precisa.

Per realizzare questa finalità, noi crediamo sia necessario prendere in considerazione tre elementi:

- 1) l'inattivazione del fago coll'antisiero specifico;
- 2) la morfologia del fago;
- 3) l'attività del fago.

La nostra e altrui esperienza ci dice, infatti, che ogni fago inoculato in un coniglio produce in questo un antisiero che inattiva quel fago. Occorre, perciò, disporre di sieri specifici antifago, tanti per quanti sono i fagi conosciuti: solo così non importa qual ricercatore, potrà in breve tempo riconoscere l'esatta posizione sistematica di un fago tassonomicamente sconosciuto.

Il successivo studio di quel fago al microscopio elettronico ce ne farà conoscere la struttura morfologica, sempre tipica e caratteristica, e ci confermerà i risultati ottenuti con le prove d'inattivazione serica.

Lo studio delle capacità litiche del fago sui germi omologhi ce ne confermerà, infine, l'individualità biologica. Questa prova, però, è molto delicata, giacchè la specificità di un fago per un germe determinato non è sempre assoluta ma spesso relativa, nel senso ch'essa è in rapporto col numero dei fagi presenti nella sospensione di saggio, con il germe cimentato e il terreno su cui si esperimenta. Occorre, perciò, titolare sempre la sospensione del fago da saggiare, e ciò allo scopo di determinare il titolo minimo al quale la sospensione fagica sarà capace di dare ancora lisi confluyente sul germe su cui il fago venne preparato. La sospensione così titolata costituirà «la sospensione critica» con la quale si dovrà procedere alla ricerca dell'attività del fago in esame, adoperando sempre per tutti i germi lo stesso terreno.

Oltre questi tre elementi diagnostici, altri se ne potranno col tempo aggiungere, più a titolo di complemento e completamento, che a titolo

di necessità; ci riferiamo alla inattivazione di un fago con estratti batterici omologhi, con sostanze chimiche o con mezzi fisici.

Allo stato attuale dei fatti, i tre elementi da noi considerati e proposti sono idonei e sufficienti per riconoscere la specie di un fago tassonomicamente sconosciuto.

Abbiamo avuto recentemente occasione di applicare con successo tale metodica; riferiamo il caso che, salvo errore, è il primo registrato in letteratura essendo i tentativi precedenti di Burnet (1945) e quelli di Sertic e Boulgakov (1935) limitati alla identificazione di razze fagiche e non di specie in senso linneiano.

Hauduroy e Rosset comunicavano recentemente (1948) avere isolato a Losanna, da terra di giardino messa a macerare in brodo sterile a 37° C., un principio litico agente in serie su alcuni stipiti di micobatteri paratubercolari non altrimenti definiti.

Gli Autori interpretarono giustamente tale principio come un vero batteriofago.

Dobbiamo alla gentilezza dell'eminente collega prof. Hauduroy la recezione del fago in questione, insieme al micobatterio su cui venne isolato.

Appena il materiale fu in nostre mani, cimentammo il fago ricevuto con i sieri antimicobatteriofagici da noi già preparati (1948). Tale saggio s'imponeva, dato che si trattava di un fago attivo sui micobatteri.

Le prove diedero esito positivo con l'antisiero preparato col *Phagus smegmatis* e negativo con gli altri quattro antisieri.

Sottoponemmo allora il fago di Hauduroy e Rosset all'indagine elettronica e potemmo così constatare come la sua morfologia fosse identica a quella del *Phagus smegmatis*, così tipica e inconfondibile, e da noi già descritta (1949).

Per ultimo saggiammo il potere di azione del fago — nella sua concentrazione critica — sui nostri diversi ceppi di micobatteri e constatammo come esso agisse sul *Grassbacillus*, sul *Myc. smegmatis* U. of W., sui *Myc. smegmatis* 523 e 53, sul *Myc. stercoris* 3820 e sui ceppi Smegma 19 e 22; come esso agisse, cioè, sugli stessi ceppi su cui agiva il *Phagus smegmatis*. Constatammo altresì come il nostro *Phagus smegmatis* agisse a sua volta sul ceppo inviato da Losanna e sul quale era stato appunto isolato il fago di Hauduroy e Rosset.

Il fago di Losanna, dunque:

- 1) veniva inattivato dall'antisiero preparato col *Phagus smegmatis*;
- 2) presentava, al microscopio elettronico, morfologia identica al *Phagus smegmatis*;
- 3) esercitava le sue capacità litiche sugli stessi micobatteri attaccati dal *Phagus smegmatis*.

Il fago di Hauduroy e Rosset era dunque identico, biologicamente e morfologicamente, al *Phagus smegmatis* (P. e O., 1948) e come tale doveva essere riconosciuto e diagnosticato.

Crediamo sia questa la prima volta in cui si riesce a riconoscere e a determinare la specie linneiana di un fago isolato da terzi: tale possibilità dunque esiste, essa è una realtà dalla quale i ricercatori non debbono prescindere per poter passare dall'empirismo in cui si è lavorato sino ad oggi, alla sistematica rigorosa e alla diagnosi di specie dei fagi.

Siamo dunque lontani dai giorni, se pure recentissimi (Bordet J. e Bordet P., 1946), in cui si discuteva ancora per sapere se i fagi fossero o non fossero esseri viventi.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.
5 novembre 1949.

BIBLIOGRAFIA

- BORDET J. e BORDET P., Bactériophagie et variabilité microbienne, Ann. Inst. Pasteur, 72, 161 e 321 (1946).
- BORDET J. e CIUCA M., Autolyse microbienne et sérum antilytique, C.R.S.B., 84, 280 (1921).
- BURNET F. M., Classification of dysentery-coli bacteriophages; serological classification of coli-dysentery phages, J. Path. Bact., 36, 307 (1939).
- D'HERELLE F., Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (*Bacteriophagum intestinale*), C.R.S.B., 81, 1160 (1918).
- D'HERELLE F., Immunity in natural infectious disease, Baltimore, pag. 345 (1924).
- GIUNTINI J., LEPINE P., NICOLLE P. e CROISSANT O., Images électroniques de quelques bactériophages et détermination de leur taille, Ann. Inst. Pasteur, 73, 579 (1947).
- HAUDUROY P. e ROSSET W., Un bactériophage lysant certains Mycobactéries, C.R.Ac.Sc., 227, 917 (1948).
- HOLMES F. O., Handbook of Phytopathogenic viruses, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn, p. 141 (1939).
- HOLMES F. O., Filterable viruses in Bergey's Manual of determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 1127 (1948).
- ORTALI V. e PENSO G., Studio morfologico, al microscopio elettronico, dei fagi attivi sui micobatteri, Atti Acc. Naz. d. Lincei, 6, Serie VIII (Seduta dell'8 gennaio 1949), 248 (1949).
- PENSO G. e ORTALI V., Isolamento e studio di fagi attivi sui micobatteri, Atti Acc. Naz. d. Lincei, 6, Serie VIII (Seduta dell'11 dicembre 1948), 109 (1949).
- PENSO G. e ORTALI V., Studi sui micobatteri. Nota II. I fagi dei micobatteri, Rendiconti Ist. Sup. di Sanità, fasc. IV, vol. XII, in corso di stampa (1949).
- SERTIC V. e BOULGAKOV N., Classification et identification des typhiphages, C.R.S.B., 99, 826 e 1270 (1935).
-