

68. Giuseppe PENSO, Vittorio ORTALI, Aldo GAUDIANO, Mario PRINCIVALLE, Luciano VELLA e Alfredo ZAMPIERI — Studi e ricerche sui micobatteri — VII - Il *Mycobacterium phlei* - (Lehmann e Neumann, 1899, *pro parte*).

**Riassunto.** — Con il nome di *Mycobacterium phlei* (Lehmann e Neumann, 1899) si indicano, nei vari laboratori del mondo, specie spesso differenti tra loro.

Lehmann e Neumann attribuirono il nome di *Mycobacterium phlei* a un gruppo di ceppi, che oggi sappiamo appartenere a specie diverse; dato, però, che essi crearono questo nome particolarmente per la specie che Moeller isolò dal *Phleum pratense*, conviene conservare il nome di *Mycobacterium phlei* soltanto per questa specie, la quale dovrà perciò essere indicata col nome di « *Mycobacterium phlei* (Lehmann e Neumann, 1899, *pro parte*) ».

Le caratteristiche principali di tale specie sono le seguenti: germe a bastoncino, nucleato, acidoresistente, con qualche forma giovanile cianofila, grampositivo; cresce su tutti i comuni terreni a temperature comprese tra 20° e 52° C con optimum di crescita a 48° C, e a pH compresi tra 5,5 e 8,8 con optimum a pH 6.

In terreni liquidi cresce in superficie; in Dubos e in terreni agitati cresce in profondità dando luogo a formazioni globulari.

In terreni solidi dà colonie tondeggianti, frastagliate, a superficie radialmente pieghettata e centro sopraelevato.

Si ha formazione di un pigmento arancione con massimo di assorbimento a 460-463 m $\mu$  e bande secondarie a 430-440 e 480-490 m $\mu$  (in cloroformio). Tale pigmento è costituito da tre carotenoidi epifasici, particolarmente da leprotina e  $\alpha$ -carotene, oltre un carotenoide a carattere acido.

Il *Myc. phlei* non fluidifica la gelatina, riduce i nitrati a nitriti; non produce indolo, non coagula il latte, dà emolisi su agarsangue. In terreni sintetici utilizza, come fonte di carbonio, l'alcool amilico, l'alcool butilico, l'alcool etilico, l'adonitolo, l'eritrolo, il glicerolo, il mannitolo, il sorbitolo, l'arabinosio, lo xilosio, il galattosio, il glucosio, il levulosio, il mannosio e il trealosio, non utilizza l'acetone, l'alcool metilico, il dulcitolio, l'inositolo, l'arbutina, l'esculina, la salicina, il ramnosio, il sorbosio, il lattosio, il maltosio, il saccarosio, la destrina, l'inulina e il raffiniosio.

Il *Myc. phlei* è lisato dal *Phagus phlei* (P. e O.), fago ad azione specie specifica.

Il *Myc. phlei* non è patogeno per i topi, i ratti, le cavie, i conigli

ei piccioni, i polli, le rane, le carpe. Non dà lesioni sulla membrana corio-allantoidea di embrione di pollo, sulla quale, però, è capace di moltiplicarsi.

**Résumé.** — Sous le nom de *Mycobacterium phlei* (Lehmann et Neumann, 1899) on indique dans les divers laboratoires du monde des espèces souvent différentes les unes des autres.

Lehmann et Neumann attribuèrent le nom de *Mycobacterium phlei* à un groupe de souches dont nous savons aujourd'hui qu'elles appartiennent à des espèces diverses; mais, étant donné qu'ils créèrent ce nom particulièrement pour l'espèce que Moeller isola du *Phleum pratense*, cela convient de conserver le nom de *Mycobacterium phlei* seulement pour cette espèce qui devra cependant être désignée par le nom de « *Mycobacterium phlei* (Lehmann et Neumann, 1899, *pro parte*) ».

Les principaux caractères de cette espèce sont les suivants: germe en forme de bâtonnet, nucléé, acido-résistant, avec quelques formes jeunes cyanophiles, Gram positif; se développe sur tous les milieux à une température comprise entre 20° et 52° C. avec optimum de croissance à 48° C. et à un pH compris entre 5,5 et 8,8 avec optimum à pH 6.

En milieux liquides il croît en surface; dans le milieu de Dubos et dans les milieux agités il croît en profondeur en donnant lieu à des formations globulaires.

En milieux solides il donne des colonies arrondies, découpées, à surface plissée suivant les rayons et à centre surélevé.

On a la formation d'un pigment orange avec un maximum d'absorption à 460-463 m $\mu$  et des bandes secondaires à 430-440 et 480-490 m $\mu$  (en chloroforme). Ce pigment est constitué par trois caroténoïdes épiphasiques, particulièrement par la leprotine et le  $\alpha$ -carotène, et par un caroténoïde à caractère acide.

Le *Myc. phlei* ne fluidifie pas la gélatine, réduit les nitrates en nitrites; il ne produit pas de l'indol, il ne coagule pas le lait, il donne de l'hémolyse sur gelose additionnée de sang. En milieux synthétiques il utilise comme source de carbone l'alcool amylique, l'alcool butylique, l'alcool éthylique, l'adonitol, l'érythritol, le glycerol, le manitol, le sorbitol, l'arabinose, le xylose, le galactose, le glucose, le lévulose, le mannose et le tréhalose; il n'utilise pas l'acétone, l'alcool méthylique, le dulcitol, l'inositol, l'arbutine, l'esculine, la salicine, le rhamnose, le sorbose, le lactose, le maltose, le saccharose, la destrine, l'inuline et le raffinose.

Le *Myc. phlei* est lysé par le *Phagus phlei* (P. et O.), phage à action espèce-spécifique.

Le *Myc. phlei* n'est pas pathogène pour les souris, les rats, les cobayes, les lapins, les pigeons, les poulets, les grenouilles, les carpes. Il ne donne pas de lésions sur la membrane chorioallantoïdée d'embryon de poulet sur laquelle, cependant, il peut se multiplier.

**Summary.** — By the name of *Mycobacterium phlei* (Lehmann and Neumann, 1899) are often called very different species.

Lehmann and Neumann gave the name of *Mycobacterium phlei* to a group of strains which we know to-day to belong to different species. In view of the fact that they particularly gave this name to the species isolated by Moeller from the *Phleum pratense*, it is convenient to preserve the name of *Mycobacterium phlei* to this species only, species which should therefore be called « *Mycobacterium phlei* (Lehmann and Neumann, 1899, *pro parte*) ».

The most important characters of this species are the following ones: rod bacterium, with nucleus, acidfast with some young cyanophil, form grampositive; it grows on all the common media at temperatures included between 20°C. et 52°C., with an optimum at 48°C.; it grows at pH between 5,5 and 8,8 with an optimum at pH 6.

It grows in liquid media at the surface; in Dubos' medium or in shaken cultures it grows in depth forming globular bodies. In solid media it forms round, notched colonies, having a radially folded surface and an elevated center.

It forms an orange pigment having the maximum of absorption at 460-463 m $\mu$  and secondary bands at 430-440 m $\mu$  and 480-490 m $\mu$  (in chloroform) Such a pigment is formed by three epiphasic carotenoids, particularly by leprotine and  $\alpha$ -carotene, and by an acid carotenoid.

The *Myc. phlei* does not fluidize the gelatin; it does not reduce the nitrates to nitrites; it does not produce indol, it does not coagulate the milk, it produces hemolysis on blood-agar.

When it is grown in synthetic media, it uses as carbon source: amylic alcohol, butylic alcohol, ethylic alcohol, adonitol, erythritol, glycerol, mannitol, sorbitol, arabinose, xylose, galactose, glucose, levulose, mannose, trehalose. It does not use: acetone, methyl alcohol, dulcitol, inositol, arbutine, esculin, salicin, rhamnase, sorbose, lactose, maltose, saccharose, dextrin, inuline, raffinose.

The *Myc. phlei* is lysed by *Phagus phlei* (P. and O.).

The *Myc. phlei* is not pathogenous to mice, rats, guinea pigs, rabbits, pigeons, chicken, frogs, carps. It does not produce lesions on the choriollantoic membrane of the chick embryo, but it multiplies on its surface.

**Zusammenfassung.** — Unter dem Namen *Mycobacterium phlei* (Lehmann und Neumann, 1899) werden von Laboratorien der ganzen Welt Arten bezeichnet, die sehr oft sehr verschieden voneinander sind.

Lehmann und Neumann gaben den Namen *Mycobacterium phlei* einer Gruppe von Stämmen, von denen wir aber heute wissen dass sie zu verschiedenen Arten gehören; und doch, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sie diesen Namen besonders für die Art schufen, die Moeller vom *Phleum pratense* isolierte, scheint es besser den Namen *Mycobacterium phlei* nur für diese Art zu bewahren, sodass dieselbe unter dem Namen «*Mycobacterium phlei* (Lehmann und Neumann, 1899, *pro parte*)» zu bezeichnen ist.

Die wichtigsten charakteristiken dieser Art sind folgende: stäbchenförmiger Keim, nucleiert, säurefest, mit irgendeiner jugendlichen cyanophilen Form, grampositiv; wächst auf allen üblichen Nährböden bei Temperaturen zwischen 20° und 52° C., mit grösstem Wachstum bei 48° C. und pH zwischen 5,5 und 8,8, am besten pH 6.

In flüssigen Nährböden wächst diese Art an der Oberfläche; im Dubos Boden und in geschüttelten Böden erfolgt das Wachstum in der Tiefe unter Bildung von kleinen kugelförmigen Körpern.

In festen Nährböden bildet sie rundliche Kolonien, mit in kleinen radial gerichteten Falten gelegter Oberfläche und aufwärts ragendem Zentrum.

Es entsteht eine Bildung von starkem orangenfarbigem Pigment mit höchster Absorption bei 460-463 m $\mu$  und mit sekundären Banden bei 430-440 m $\mu$  (in Chloroform). Dieses Pigment besteht aus drei epiphasischen Carotinoiden, insbesondere Leprotin und  $\alpha$ -Carotin, ausserdem mit einem Carotinoid, das einen sauren Charakter aufweist.

Das *Mycobacterium phlei* verflüssigt nicht die Gelatine und reduziert die Nitrate auf Nitrite; ergibt kein Indol, koaguliert nicht die Milch, gibt Hämolyse auf Blutagar.

In synthetischen Nährböden benutzt sie als Kohlenstoffquellen die folgenden Substanzen: Amylalkohol, Butylalkohol, Aethylalkohol, Adonitol, Erythritol, Glycerin, Mannitol, Sorbitol, Arabinose, Xylose, Galaktose, Glycose, Lävulose, Mannose, Trehalose. Sie benutzt nicht die folgenden Substanzen: Aceton, Methylalkohol, Dulcitol, Inositol, Arbutin, Aesculin, Salycin, Rhamnose, Sorbose, Lactose, Maltose, Saccharose, Dextrin, Inulin, Raffinose.

Das *Mycobacterium phlei* ist liesirt bei *Phagus phlei* (P. und O.).

Das *Mycobacterium phlei* ist nicht pathogen für die folgenden Tieren: Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Tauben, Hühner, Frösche, Karpfen.

## S O M M A R I O

- 1) Introduzione — 2) Premesse storiche — 3) Problema tassonomico — 4) Rivista della letteratura — 5) Discussione sulla letteratura — 6) Propositi di ricerca, materiale e metodi -- 7) Morfologia citologica — 8) Proprietà tintoriali e affinità chimiche — 9) Morfologia delle colonie e delle patine — 10) Caratteristiche colturali — 11) Pigmento — 12) Attività biochimiche — 13) Fagosensibilità — 14) Ricerche immunologiche — 15) Patogenicità — 16) Conclusioni.

### 1) INTRODUZIONE.

Il *Mycobacterium phlei* è senza dubbio il batterio acidoresistente più studiato dopo i bacilli tubercolari. Questo germe, infatti, è stato scelto da molti ricercatori quale rappresentante del così detto gruppo dei paratubercolari e quale termine di raffronto tra i micobatteri patogeni e quelli saprofiti.

Allo stato attuale dei fatti, però, noi non siamo in grado di specificare che cosa i vari autori abbiano voluto indicare con il nome di *Mycobacterium phlei*, così, sino ad oggi, non avevamo elementi validi e sufficienti per identificare un ceppo di nuovo isolamento come un ceppo di *Mycobacterium phlei*.

Per questi motivi abbiamo compiuto uno studio bibliografico e sperimentale per definire i limiti della specie *Mycobacterium phlei*.

### 2) PREMESSE STORICHE.

Nell'anno 1897, Petri comunicava di aver isolato dal burro un germe acidoresistente, analogo al tubercolare vero, ma colturalmente diverso. Egli descriveva dettagliatamente tale germe — che il Moeller indicava successivamente (1899) col nome di *Butterbacillus* — soltanto nel successivo anno 1898.

Si trattava di un microbo a bastoncino incurvato, privo di ramificazioni, che cresceva bene a 37°C, pur essendo capace di vegetare anche a temperatura ambiente; che dava, su agar, colonie rotonde, poco caratteristiche, o una patina leggermente giallastra, dapprima umida, più tardi rugosa e che, col tempo, diveniva giallo-arancio; che, su gelatina, cresceva lentamente senza fluidificarla; che, in brodo, emanava un odore putrido; che produceva indolo; che era patogeno per le cavie solo se inoculato loro in dosi massive o contemporaneamente a burro.

Nello stesso anno 1898, Moeller descriveva con maggiori particolari due germi, isolato il primo dall'erba di prato, *Phleum pratense* (in te-

desco *Timotheusgras*) e che chiamava *Timothee-Bacillus*, il secondo da sterco (in tedesco *Mist*) di bovini, che chiamava *Mist-Bacillus*. Tale grafia veniva da lui cambiata in *Timotheebacillus* e *Mistbacillus* in un successivo lavoro del 1899, nel quale dava al primo germe anche il nome di *Grasbacillus I*, in contrapposto a *Grasbacillus II*, dato a un altro e diverso acidoresistente isolato pure dall'erba.

Dalla descrizione del Moeller si rileva che il *Timotheebacillus* o *Grasbacillus I* è un bastoncino spesso incurvato, talora ramificantesi due o tre volte, con granulazioni che ne fanno aumentare il diametro trasverso; la sua lunghezza è di 1-4  $\mu$ , mentre la larghezza è di circa 0,2-0,4  $\mu$ . E' fortemente acido e alcool-resistente: non si decolora sottoponendolo per più minuti all'azione dell'acido solforico al 40%. E' grampositivo. Vegeta bene a 37°C. come a temperatura ambiente. Su agar glicerinato dà, dopo 36-48 ore, colonie bianco-grigiastre, secche, squamose, poco aderenti, friabili. Le colonie fondono tra loro dando una patina squamosa. Le colonie sono sul principio bianche, più tardi divengono bianco-grigiastre, per assumere, verso il terzo o quarto giorno, una tonalità gialla. Col tempo, la patina invade tutto l'agar risalendo sulle pareti. Le colture in brodo rimangono chiare; sulla superficie del liquido si forma, in tre o quattro giorni, una pellicola sottile, bianco-grigiastra, secca e opaca, che sale lungo le pareti del recipiente per 2 o 3 cm. Agitando leggermente, si staccano frammenti che affondano. Su brodo glicerinato l'aspetto dei veli è analogo; soltanto il colore cambia: diviene più rossastro, arancione. Su patata si ha la crescita più lussureggiante: si formano colonie nodulari; secche, friabili, giallastre. Per infissione su agar e su gelatina, cresce lungo il canale d'innesto e poi in superficie, dando colonie giallo-rossastre. Non fluidifica la gelatina nè il siero di bue. Cresce in 5 giorni in latte, nel quale forma, in superficie, un sottile anello giallastro; dopo 8 giorni il latte acidifica. Inoculato in cavie dà infiltrazioni nel punto d'inoculazione con centro caseoso ricco di germi acidoresistenti; ingrossamento delle ghiandole linfatiche; noduli nella milza, nei polmoni (nei quali si possono anche rinvenire caverne), nelle meningi. I conigli sono ugualmente recettivi; non lo sono, invece, i ratti, i gatti, i piccioni e i polli.

Sempre dalla descrizione del Moeller, si rileva, invece, che il *Mistbacillus* è un bastoncino ricurvo, talvolta ramificato e disposto a Y, fortemente acido-resistente, specie allorchè è giovane <sup>(1)</sup>; vegeta bene a 37-38° C.; ma cresce anche a temperatura ambiente; cresce in due-tre giorni su agar glicerinato dando piccole colonie rotonde, dapprima bianco-

---

<sup>(1)</sup> Nel riferire i lavori dei vari AA. rispettiamo la terminologia da essi adoperata anche se questa può sembrare superata.

grigiastre, poi giallognole al centro ove si nota una piccola rilevatezza, spesso crateriforme; col tempo, il colore diviene giallo-oro o giallo-ocra; su patata cotta è giallo-grigiastro. Per infissione, cresce lungo il canale d'innesto, sia in agar sia in gelatina che non fluidifica; anche il siero di bue non viene intaccato. In brodo, si ha coltura lussureggiante dopo 2 giorni e intorbidamento seguito da sedimentazione gialla e più tardi da una pellicola superficiale. Il brodo non emana odore, in esso non si forma indolo. Il germe cresce in latte, che colora in giallo-rosso, dando luogo a un anello giallo-ocra intorno al vetro. Il latte si acidifica in 4 giorni. Azione patogena pressochè analoga al precedente.

Quasi contemporaneamente al secondo lavoro di Moeller, ne compariva uno di Lubarsch (1899) che aveva tentato di isolare, da infusi di *Phleum pratense*, il *Timotheebacillus*. Egli isolò in realtà un acidoresistente che intorbidava il brodo, sedimentando e chiarificandolo soltanto dopo parecchie settimane; che su terreni solidi dava patine la cui pigmentazione si compiva tardivamente e non era mai intensa, seppure di tonalità giallo-rossastra; che su patata non dava colture lussureggianti; che morfologicamente si presentava a bastoncino, talvolta clavato, molto raramente ramificato. Il Lubarsch non saggiò la patogenicità del ceppo da lui isolato, ma saggiò quella del ceppo originale di Moeller concludendo che « è del tutto impossibile, attraverso le ricerche istologiche e microparassitarie, distinguere con sicurezza il tubercolo da timoteo dal tubercolo vero ».

Sulla base di queste quattro differenti osservazioni Lehmann e Neumann creavano nel 1899 la specie *Mycobacterium phlei*, giustificandola con le seguenti parole: « L'erba timoteo si chiama scientificamente *Phleum pratense* L. Noi raggruppiamo qui i microrganismi pervenutici in 1-2 ceppi sotto i nomi di "Mistpilz" di Moeller, "Graspilz" I o *Timotheegras* di Moeller, "Butterpilz" di Petri. Attraverso la limitata descrizione di Petri, si arguisce che egli abbia spesso incontrato anche il *Myc. lacticola*; egli non differenzia le due forme. Noi crediamo non si debba dare soverchia importanza alle insignificanti differenze esistenti tra questi ceppi (brodo uniformemente intorbidato o soltanto con deposito). Anche il "Timotheepilz" di Lubarsch va evidentemente incluso qui ».

La creazione, da parte di Lehmann e Neumann, della specie *Myc. phlei* è stata veramente un atto di coraggio, giacchè dalla descrizione dei quattro germi di Petri, Moeller e Lubarsch non si possono per davvero trarre dati probativi per concludere che i detti germi fossero identici e per di più in coltura pura. Lehmann e Neumann non davano « soverchia

*importanza alle insignificanti differenze»* riscontrate tra i ceppi *Mistbacillus* di Moeller e quello di Lubarsch, da una parte e tra il *Butterbacillus* di Petri e il *Timotheebacillus* di Moeller dall'altra: il primo gruppo intorbida il brodo, il secondo no. Noi oggi sospettiamo vivamente che le culture di acidoresistenti intorbidanti il brodo fossero inquinate e stimiamo anche che l'odore putrido delle colture di Petri fosse dovuto a inquinamento. Del resto, gli stessi Lehmann e Neumann affermano che i germi isolati da Petri erano misti, giacchè in parte si rapportavano al *Myc. lacticola* e in parte al *Myc. phlei*.

Fonte di perplessità sulla purezza dei germi di Moeller ci è data anche dai reperti anatomopatologici ottenuti da lui e dal Lubarsch: Moeller ottenne nelle cavie caverne polmonari e Lubarsch afferma che tra tubercolo da bacillo di Koch e tubercolo da *phlei* non esiste differenza alcuna.

Per questi motivi c'è da domandarsi se le colture di Moeller fossero realmente pure, o se fossero addirittura inquinate con tubercolare vero. Lo stesso Petri lo sospetta, come lo sospettavano Hormann e Morgenroth (1898) per un altro germe acidoresistente da essi isolato dal burro e che sperimentalmente si comportava talvolta come quelli di Moeller e di Lubarsch.

Altra fonte di perplessità sta nel fatto che la Rabinowitsch (1898), avuti dal Moeller i due primi germi in questione, li riconobbe identici al proprio *Butterbacillus* (1897) e a quello di Petri; oggi, però, noi sappiamo che il germe della Rabinowitsch appartiene al gruppo del *lacticola* e non alla specie *Myc. phlei*.

I dati caratteristici elencati da Lehmann e Neumann per il «*Myc. phlei* (Moeller) L. e N.», ripetendo alla lettera l'indicazione tassonomica della nuova specie da essi creata, sono i seguenti:

«Aspetto microscopico: dopo 3-4 giorni di coltura i bastoncelli sono molto corti e spessi; essi ricordano molto, a questo stadio, il *Corynebacterium pseudodifterico*. Più tardi diventano più lunghi, talvolta clavati, e si ramificano anche, e non si possono perciò distinguere dalle due specie precedenti (*Myc. planum* e *Myc. perrugosum*). Immobili. Colorazione, intensità di crescita, comportamento verso l'ossigeno come il *Mycobacterium lacticola* [si colora con i metodi del bacillo di Koch, prende il gram, cresce su tutti i terreni, lentamente a temperatura ambiente, più rapidamente in termostato; ossigeno necessario] (1).

Piastre di agar glicerinato. In pochi giorni colonie rosso-arancio a

---

(1) I brani entro parentesi quadre non sono nel testo originale; vengono aggiunti per chiarezza del lettore riferendosi ad altri paragrafi del libro di L. e N.

margini lisci, ma ondulati, senza formazione di pieghe: umide, brillanti. Microscopicamente colonie trasparenti con centro più scuro e disegno a ciocca di capelli. Verso la periferia esiste una zona delicata, trasparente, più o meno friabile, con un margine frangiato o crenato. Più tardi l'interno della colonia diviene più scuro e più opaco; solo al margine si circonda di un velo leggero e delicato.

Coltura per striscio su agar glicerinato. Lussureggiante, umido, rosso-arancio vivo, patina omogenea, che col tempo mostra sporgenze nodulari, e più tardi ancora, nelle colture molto vecchie, si pieghetta e non può più esser distinto, fuorchè nella colorazione [non viene precisato in che cosa si differenzi la colorazione] dal *Myc. lacticola perrugosum*. Per striscio su gelatina, il pieghettamento non è mai così pronunciato e, in generale, la crescita in gelatina è un po' più scarsa.

Nelle colture in brodo si ha talvolta una pellicola sottile, altrimenti esse sono molto variabili, il liquido è spesso quasi chiaro, con un tenue deposito arancione, che, per agitazione, si erge a colonna torta. Altre volte si ha un leggero intorbidamento passeggero. Ugualmente in brodo zuccherato.

Coltura in latte. Identica a *Myc. lacticola* [non è coagulato, col tempo diviene trasparente e talvolta gelatinoso, sui margini si deposita un pigmento arancio-chiaro].

Coltura su patata. Come la coltura per striscio su agar glicerinato. Traccie d'indolo. Non si forma anidride solforosa nè gas. Acidificazione come *Myc. lacticola* [debole produzione d'acido, corrispondente a 0,6 cm<sup>3</sup> di soluzione 1/10 di idrato sodico in 10 cm<sup>3</sup> di brodo glucosato al 2%]. Non produce liquefazioni ».

La descrizione di Lehmann e Neumann non collima in tutto con quella data dagli scopritori dei diversi germi riuniti dai due Autori nella unica specie di « *Mycobacterium phlei* ».

Questa discordanza è forse dovuta al fatto che Lehmann e Neumann hanno in parte dedotto la loro descrizione da osservazioni proprie. Nella parte generale sui « micobatteri che crescono rigogliosamente a temperatura ambiente » si legge, infatti, questa frase: « Noi abbiamo investigato, col Dr. Kumulis, questo gruppo in tutti gli esemplari che abbiamo potuto ottenere, in tutto 13 ceppi. Attraverso comparazioni minuziose e sistematiche, essi si raggruppano in 2 specie, una delle quali presenta 2 o 3 forme ». Le due specie debbono evidentemente essere il *Myc. lacticola* e il *Myc. phlei*, e le 2 o 3 forme il *Myc. lacticola*  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

3) PROBLEMA TASSONOMICO.

Da queste prime premesse storiche sorge evidente il problema tassonomico: la specie *Mycobacterium phlei* creata da Lehmann e Neumann si riferisce al germe *Butterbacillus* di Petri, ai due ceppi di Moeller, a quelli di Lubarsch o a quelli « erhalten » (« ottenuti » per invio dai vari Autori o « ottenuti » per isolamento? Nell'edizione francese del Lehmann e Neumann si legge « que nous avons-pu isoler ») da Lehmann, Neumann e Kumulis?

Se ci si riferisce ai germi di Petri, e di conseguenza a quelli della Rabinowitsch, noi sappiamo oggi trattarsi di *Mycobacterium lacticola*; se ci si riferisce ai germi di Moeller e di Lubarsch, noi dobbiamo sospettare fossero in parte inquinati o differenti tra loro; se ci si riferisce ai germi studiati da Lehmann e collaboratori, non possiamo dire a quale germe l'appellativo di *Mycobacterium phlei* sia stato effettivamente imposto.

Vi è perciò un'imprecisione originale che ci lascia perplessi dinanzi alla vera individualità del *Mycobacterium phlei*, perplessità che non è semplicemente formale, giacchè noi abbiamo potuto constatare come esistono nei laboratori ceppi di micobatteri sicuramente diversi tra loro e indicati con lo stesso nome di *Mycobacterium phlei*; citiamo un solo esempio: presso la *National Collection of Type Cultures* di Londra sono conservati, tra gli altri, due ceppi di *Mycobacterium phlei*, il 54 e il 525; tali due ceppi, come vedremo meglio in seguito, sono totalmente differenti tra loro: uno, il 54, può realmente rapportarsi a quella specie che correntemente è nota col nome di *Mycobacterium phlei*; l'altro, invece, è probabilmente un *Mycobacterium lacticola*.

In linea di massima, gli autori che hanno lavorato sul *Myc. phlei* si riferiscono al ceppo *Timotheebacillus* di Moeller conservato nei vari laboratori. Tutti i lavori americani sulla biochimica di questo acidoresistente sono stati fatti — come riferiscono Chargaff, Pangborn e Anderson, 1931, — con il ceppo originale di Moeller, consegnato da questi nel Sanatorio di Malzig, al dott. S. J. Maher che lo trasferì, nel settembre 1904, in America consegnandolo a E. R. Baldwin il quale lo passò, nel giugno 1923 a J. D. Aronson dell'Henry Phypps Institute; da qui il ceppo venne mandato, il 13 febbraio 1925, alla H. K. Mulford Company che lo passò alla Parke Davis and Company il 16 febbraio 1928 e all'Hygiene Laboratory il 24 maggio 1930. Il ceppo in questione ha preso il nome, strada facendo, di « H. K. Mulford N. 1589 » (lavoro di Chargaff e collaboratori), di « Mulford » (Hunton, Funk e White, 1931), di ceppo « Parke Davis and Company » (lavori di Coghill e

Bird, 1929, e Coghill, 1931), o di ceppo « 02145 » della Parke Davis and Co. (F. G. Petrik, 1946).

Si può dire, quindi, che con il nome di *Mycobacterium phlei* si sia ormai soliti indicare la specie batterica isolata da Moeller dal *Phleum pratense* e da lui indicata con i nomi di *Timotheebacillus* e *Grasbacillus I.*

Nonostante, quindi, che il nome specifico di *phlei* dato dal Lehmann e Neumann a una serie di micobatteri differenti tra loro, sia tassonomicamente un *nomen confusum*, se non addirittura *dubium* (Cap. IV, Reg. 3 del Codice di nomenclatura batterica, ed. 1946), pure possiamo accoglierlo e conservarlo dato che la maggior parte degli autori lo hanno in seguito attribuito a un ceppo ben conosciuto e ancora conservato in molti laboratori, ceppo compreso tra quelli a cui Lehmann e Neumann diedero originariamente l'appellativo di *Mycobacterium phlei*, nome specifico, quindi, che, *pro parte* (Reg. 15 del Codice di nomenclatura batterica), può rimanere.

#### 4) RIVISTA DELLA LETTERATURA

Consideriamo adesso quali sono le nostre conoscenze sul *Mycobacterium phlei*. Da quanto abbiamo riferito nella parte storica, dobbiamo considerare come prima ed attendibile descrizione del *Mycobacterium phlei* soltanto quella fatta dal Moeller per il suo *Timotheebacillus* che abbiamo più sopra riportata.

Successivamente, pochi sono i lavori su questo germe, possiamo anzi dire che ve ne sono soltanto tre, in cui si ripeta in maniera originale la descrizione del micobatterio, e precisamente i lavori di Braun, Stamatelakis e Kondo (1924), di Büttner (1926) e di Jensen (1934).

Tutti gli altri lavori riguardano questo o quel problema, questa o quella particolarità.

##### a) *Morfologia e colture.*

Braun, Stamatelakis e Kondo lavorarono con il ceppo originale di Moeller che ebbero da Kolle. Ecco la descrizione che ne danno:

''Con la comune colorazione del Gram si vedono, da agarcolture, bastoncini di diversa lunghezza, del tutto corti o di lunghezza media; la forma è molto varia, la colorazione è molto ineguale: nel corpo di batteri scolorati si vedono spesso granuli neri-turchino scuro. Con la colorazione dello Ziehl-Neelsen si rinvengono bastoncini scolorati e colorati in rosso. Il bacillo del timoteo cresce bene sia a 22° che a 37° negli usuali terreni contenenti brodo. Nei comuni terreni all'agar forma, dopo alcuni giorni, una patina rigogliosa, secca, biancastra, grinzosa. Nel brodo si forma una pellicola che risale lungo le pareti di vetro. Sul siero di Loeffler si forma una patina gialla-chiara, spessa, friabile. In questo terreno non si formano fermenti triptici.

*Nelle colture per infissione in gelatina cresce soltanto in superficie e non fluidifica la gelatina. In terreni contenenti triptofano (brodo-tripsina secondo Frièber) esso forma una pellicola delicata; formazione di indolo non è rivelabile. In brodo glucosato cresce solo in aerobiosi, e non in condizioni di anaerobiosi. Le colonie su agar comune si presentano, dopo alcuni giorni, come una pellicola secca, irregolarmente limitata, che nel mezzo è brunastra e sul margine bianco giallastra; a debole ingrandimento si vede un margine ondulato, finemente sfrangiato; la superficie è grinzosa. Su agar glicerinato il bacillo del timoteo forma, a 37° C. e dopo alcuni giorni, una patina ondulata, secca, spessa, bianco-giallastra. A 22° C. cresce bene, ma non così rapidamente come a 37° C. Dopo lunga incubazione forma nei suddetti terreni un pigmento giallastro. Non sono rivelabili amilasi e lipasi attive sul grasso di bue e di maiale. Su piastre di agar, nelle quali è stato aggiunto sangue, defibrinato e lavato, di coniglio, si ha, dopo due o tre giorni d'incubazione, emolisi [fenomeno che era stato già osservato dal Raubitschek nel 1908, almeno per gli estratti alcoolici o eterici del germe in questione]».*

Büttner ha lavorato con 7 ceppi da lui isolati da foglie di tasso, da terra ricca di foglie in decomposizione, da torba, da terreno di bosco, da terra di vaso, da terra di campo, da terra concimata. Tutti questi ceppi, analoghi tra loro, si presentavano a bastoncelli, spessi (sino a 1,1  $\mu$ ), per lo più corti, clavati, simili al difterico, disposti l'uno parallelo all'altro, spesso ad angolo, con ramificazioni e formazioni filiformi già nelle giovani colture, e forme involute ingrossate al centro o leggermente incurvate, lunghe e spesse e con granulazioni nei corpi cellulari mal colorati. In agar glicerinato si avevano colonie giallo-bruno sino all'arancio, che andavano dall'opaco allo splendente, semi-sferiche, cercinate con formazione di anelli. A debole ingrandimento le colonie giovanissime erano filiformi, più tardi rotonde con gettate; le vecchie colonie avevano i margini netti e un centro scuro. Per striscio su agar si aveva lo stesso aspetto e, in più, formazione di pieghe. In brodo glucosato si aveva una pellicola spessa, non pieghettata e risalente sul vetro di odore sgradevole; era spesso presente un sedimento che, per agitazione, si ergeva avvoltolandosi a colonna. In brodo glicerinato: sottile pellicola, forte intorbidamento a deposito spesso, giallo. Su patata: coltura rigogliosa, opaca o risplendente rosso-arancio, a superficie scabrosa ed elevata a margine lobato. Discreta produzione di indolo e idrogeno solforato.

Jensen ha lavorato con due ceppi: uno indicato come «ceppo autentico», ma del quale non dà la provenienza; l'altro — contrassegnato col n. 282 — isolato dal suolo nella Nuova Galles del Sud (Australia) da Griffith. I due ceppi, però, non erano identici. Morfologicamente, sia l'uno che l'altro si presentavano a bastoncelli piccoli, pressochè dritti, di 0,5-0,7  $\mu$  per 1,5-4  $\mu$ , non varianti molto col variare dei terreni o dell'età. Il ceppo autentico mostrava una netta crescita a zig-zag, mentre il 282 aveva tendenza a produrre forme a catena. Ramificazioni, seppure presenti, erano rare. Il ceppo autentico era più acidoresistente dell'altro, il quale, dopo un giorno di coltura in agar-asparagina o in agar-destroso, presentava soltanto una minoranza di cellule acido-resistenti; dopo due o tre giorni, l'acido-resistenza era buona, ma marcatamente granulare; nel latte, dopo 7 giorni, era completa, ma in brodo soltanto parziale. Colturalmente il ceppo autentico era ruvido ed aveva poca rassomiglianza col ceppo liscio del suolo. In agar-asparagina si aveva buona crescita sino a divenire abbondante; il ceppo autentico dava colonie ampie, a margini lobati, a superficie piatta, schiacciata, secca, rugosa; il 282 dava colonie ristrette, convesse, lisce, umide, lucenti; ambedue bianche e poi giallo-

ocera. In agar-destroso si presentava come in agar-asparagina, ma con crescita migliore e maggior ruvidezza pel ceppo autentico. In patata, buona crescita sino all'abbondante, con colore giallo-grigiastro e aspetto granulare per il ceppo autentico, liscio e lucente per il 282. In gelatina: crescita granulare giallastra nell'infissione; colonie in superficie gialle, rugose; non liquefazione. In brodo, il ceppo autentico dava una pellicola secca, bianca, e più tardi gialla, non intorbidava il liquido; il 282 intorbidava dapprima uniformemente, poi dava una pellicola vischiosa color crema e un sedimento. In latte, si aveva una sottile pellicola giallastra sulla superficie e lungo le pareti della provetta; il latte veniva leggermente chiarificato, diveniva semitrasparente e viscido dopo 45-60 giorni; reazione alcalina. Il 282 cresceva in tutti i terreni molto più rapidamente del ceppo autentico.

Ambedue i ceppi utilizzavano bene il nitrato e l'ammoniaca sebbene l'asparagina e il peptone fossero superiori. Il nitrato era ridotto a nitrito, fortemente per il ceppo autentico, lievemente per il 282; il quale ultimo dava una lieve acidità in presenza di glicerina e mannite, e una debole reazione in presenza di arabinoso e destroso, il ceppo autentico non dava acidità. Reazione ottimale: pH 6,8-7,2; il 282 seguitava a crescere pH 4,3 e acidificava una soluzione di destroso e di cloruro di ammonio a pH 5,8-3,9; le corrispondenti cifre per il ceppo autentico erano pH 5,3-5,6 e pH 4,2. Crescita eccellente a 37°C.

Accanto a queste tre descrizioni sistematiche di *Mycobacterium phlei*, vero o ritenuto tale, vi è ancora una serie di lavori in cui, accidentalmente o intenzionalmente, si studia questo germe in rapporto a questo o quel problema.

Sulla morfologia portò un contributo di scarsa entità Schulze (1899), mentre numerosi altri autori, che citiamo in appresso per altri contributi originali, vi accennano riportando i dati già forniti in precedenza.

Sull'*acidoresistenza* lavorarono: Nikitine (1901), che dimostrò come, trattato il timoteo prima della colorazione con un solvente dei grassi, perdesse la sua a.r.; Cantacuzène (1905-b), che osservò come, nelle giovani colture di timoteo, una gran parte (talvolta la metà) dei germi fosse sprovvista di a.r.; mentre nelle colture più vecchie tale numero diminuiva e, in quelle di tre settimane, tutti i bacilli fossero acidoresistenti (e in ciò è d'accordo il Creuzè, 1938); Frei e Pokschinchewsky (1911), che osservarono come il timoteo, coltivato in terreni acidi, perdesse l'acidoresistenza che riacquistava se lo si coltivava in terreni alcalini; Pfanneastiel (1922), che constatò come, estraendo con il miscuglio etere-acetone diversi acidoresistenti, variasse la loro resistenza alla decolorazione e come, per il timoteo, la quantità di sostanze estraibili fosse bassa a paragone dei tbc. veri; Kirschner, Malkani e Milachewitch (1930), i quali constatarono come la semina ripetuta del timoteo in terreni contenenti poca saponina o sapone, non comporti nè la perdita, nè la diminuzione dell'acidoresistenza, la quale si perde aggiungendo alle colture filtrato di aspergillo; Darzins (1932), che dimostrava come, decolorando il « bacillo di Moeller » (quale?) con il solfito di sodio al 20% esso resistesse 24 ore, mentre, trattandolo con cloroformio, perde la sua a.r.; Hauduroy (1938) che, studiando il modo di formazione dei veli di *Myc phlei*, osservò come gli elementi bacillari a.a.r. seminati dessero nascita ad elementi non a.a.r. presentandosi sotto l'aspetto di fibre flessuose anastomizzate le une con le altre e composte sia di bacilli, sia di una sostanza omogenea [probabilmente analoga a quella rivista da Bretey, Browaey e Dervichian nel 1944 e da loro indicata col nome generico di *film*]; col procedere dell'invecchiamento, queste fibre ridiventano a.a.r., dapprima in punti localizzati, poi nel loro insieme; Darzins, che dimo-

strava successivamente (1939) come, aggiungendo ai terreni di coltura carotene, il *Myc. phlei* divenisse maggiormente a.r. e come, col diminuire del suo pigmento, di cui  $\beta$ -carotene costituisce la parte principale, diminuisse anche la sua a.r., dovuta, inoltre, alla elevazione del punto di fusione delle sostanze grasse contenute nel germe; Bretey e Browaeys (1945) che, ripetendo le osservazioni di Hauduroy sull'a.r. dei veli, constatarono come la *moltiplicazione* del timoteo avvenisse per scissiparità vera e per gemmazione « *si l'on entend par là que, dans le premier cas, les deux cellules filles ont les mêmes propriétés, alors que dans le second elles diffèrent par la taille et par leur colorabilité* ».

Soltanto lo Shigiga (1910) ha lavorato sull'*alcaliresistenza* del timoteo, la quale sarebbe positiva.

Osservazioni sulle *colture* furono fatte da pochi, specificatamente soltanto da Creuzè (1938), il quale affermava che, all'infuori della maggior velocità di sviluppo, nessuna differenza colturale esisteva tra il timoteo e il tubercolare vero per quello che riguardava il colore, la secchezza, l'aspetto pieggettato dei veli, la scagliosità delle colonie. Nell'ultima edizione del Bergey (1948), Reed si riferisce, per i caratteri colturali del *Myc. phlei*, a quanto pubblicarono Moeller e Jensen ammettendo, però, che il timoteo intorbida il brodo e non produce indolo.

Precise ricerche furono fatte sulle *temperature di crescita* del *Myc. phlei*. Mentre gli antichi autori più sopra enumerati si limitavano di solito ad affermare che il timoteo cresce bene a 37°C. ed è capace di vegetare anche a temperatura ambiente, Schlossberger e Pfannenstiel (1920) e Thomson (1932) più tardi stabilirono con esattezza la temperatura massima alla quale il *Myc. phlei* era capace di vegetare, stabilendola a 54-55°C.; mentre la Gordon (1937) stabiliva in un'ora il tempo di sopravvivenza del *Myc. phlei* esposto a 60°C.

Sulle *mutazioni e sulle varianti* del timoteo compirono osservazioni: Haag (1927) che poté contraddistinguere, su sette ceppi da lui isolati, due varianti spontanee: un *Myc. phlei planum* cremoso, umido, lucente, rosso-arancio, e un *Myc. phlei perrugosum*, cercinato, secco, opaco, rosso-arancio, sino al rosso-carminio; Bynoe (1931) che trovò una forma R e una S; Warschawsky (1934) che, conservando sospensioni di *Myc. phlei* in ghiacciaia, riuscì ad ottenere, in 14ª giornata, forme R e S; Cooper (1934), infine, che ci parla di un ceppo da lui dissociato in un tipo « bianco » e in un tipo « cromogenico », senza dirci come ottenne tali varianti.

Sulla *resistenza* del *Myc. phlei* verso *sostanze chimiche* hanno lavorato: Uhlenhut (1908), che notò come il timoteo resistesse a soluzioni concentrate di antiformina; Walther (1930), che osservò come il timoteo venisse ucciso dall'acido solforico al 10%; Abel (1939), che constatò invece come il *Myc. phlei* fosse debolmente resistente all'antiformina e all'acido solforico, relativamente resistente all'acido cloridrico, fortemente resistente all'acido ossalico; Valette e Liber (1941), che lo cimentarono con i sali biliari constatando come la resistenza verso il glicolato e il desossicolato fosse molto minore di quella verso il colato e il taurocolato.

La *filtrabilità* del *Myc. phlei* sarebbe possibile secondo Jelin (1927), il quale afferma che gli elementi filtrabili sono cianofili e soltanto dopo 15 giorni di coltura divengono acidoresistenti, e secondo Ninni (1931, a e b) il quale avrebbe anche osservato (1932) che i filtrati sono tanto più ricchi in ultravirus quanto più ricchi essi sono in proteine e sostanze colloidali; la filtrabilità non sarebbe invece possibile secondo Cooper (1934).

b) *Metabolismo.*

Ricerche sulla *utilizzazione degli zuccheri* da parte del *Myc. phlei* furono iniziate da Kendall, Day e Walker (1914) i quali, usando destrosio, mannite e glicerina in brodo comune, non constatarono variazioni nella produzione di ammoniaca, e da Schlossberger e Pfannenstiel (1920) i quali operarono su agar addizionato di zuccheri senza ottenere, però, alcuna differenziazione usando lattosio, maltosio, saccarosio, glucosio e mannite. I tentativi di Merrill (1930) di studiare l'utilizzazione degli zuccheri, sciolti in brodo di carne, seguendo la curva di variazione del pH non furono neppur essi molto lusinghieri; ma, allorchè il Merrill stesso sostituì (1931 *a* e *b*) a un terreno biologico un terreno sintetico, potè, in linea di massima, confermare ciò che Söhngen (1913) aveva, già osservato, e cioè che il *Myc. phlei* (usava un ceppo di origine sconosciuta), come tutti gli altri micobatteri, è un bacillo eterotrofo non esigente, nel senso che esso è capace di vegetare in un terreno sintetico in cui la sorgente di carbonio è organica e quella di azoto inorganica; potè d'altro canto osservare che il *Myc. phlei* utilizzava come sorgente di carbonio il glucosio, il fruttosio, il galattosio, l'arabinosio, la mannite, la glicerina, l'alcool etilico, l'acido lattico, l'acido citrico, l'acido acetico, ma non il maltosio, il saccarosio, il lattosio, il raffiniosio, l'inulina e la salicina. Tali ricerche furono riprese ed estese dalla Gordon sola (1937) e dalla Gordon e Hagan (1938) i quali videro che, usando la tecnica del Merrill, il *Myc. phlei* era capace di utilizzare anche la sorbite e il trealosio. Söhngen, dal canto suo, aveva osservato che il *Myc. phlei* poteva, in terreno sintetico, assumere il carbonio da benzina, petrolio e paraffina.

Sulla *respirazione* del *Myc. phlei*, hanno lavorato ancora Ebina e Nakamura (1937), i quali si limitarono a dire che essa è più attiva di quella del tubereolare, nonchè Edson e Hunter (1943 e 1947) e il solo Edson (1947), i quali sperimentarono col *Myc. phlei* 525 della N.C.T.C. di Londra e con due altri ceppi identici tra loro ed ottennero risultati diversi da quelli degli altri AA. come, per esempio, la non utilizzazione del fruttosio e della glicerina, il che non può meravigliare quando si pensi che il 525 non è, come già detto e come meglio vedremo in seguito, il *Myc. phlei*.

Sul *cambiamento del pH*, durante la coltura, lavorarono Long e Major (1921) i quali, utilizzando il ceppo originario di Moeller, constatarono come il timoteo coltivato in brodo-peptone-glicerina alcalinizzasse il mezzo; uguali risultati ottennero usando, al posto del peptone, alanina, che è contenuta nel peptone, e propionamide che non vi è contenuta. Ad analoghi risultati giunsero Weinzirl e Knapton (1927) nonchè lo stesso Merrill (1930).

Sugli effetti della *concentrazione di O<sub>2</sub>* nei terreni, lavorò il Kondo (1925) il quale constatò come la crescita del timoteo venisse poco influenzata dalla concentrazione dell'O<sub>2</sub> nel terreno adoperando brodo-glicerinato, mentre tale influenza si faceva sentire adoperando terreni con ammoniaca, acetato e glicerina.

Ulteriori studi sul *metabolismo* del *Myc. phlei* furono fatti da Kendall, Walker e Day (1914), i quali dimostrarono l'attività lipolitica e proteolitica del *Myc. phlei*; da Stephenson e Whetham (1922) i quali studiarono su terreno sintetico il metabolismo delle sostanze grasse e delle proteine del timoteo constatando come il massimo sviluppo del germe, valutato attraverso la quantità di N proteico e di sostanze lipoidee formate, si raggiunga allorchè la fonte idrocarbonata (ammoniaca) è integralmente consumata; d'altro canto gli stessi autori osservavano più tardi (1924) che il *Myc. phlei* è capace di consumare anche le sostanze grasse; da Wolff (1925), il quale calcolò le quantità minime di Mg, K, Na, S, N, Ph e C necessarie alla

crescita del *Myc. phlei* nei terreni sintetici; da Reed e Rice (1928 e 1939) che studiarono l'influenza del ferro, somministrato sotto forma di cloruro o di solfato, sullo sviluppo e la crescita del *Myc. phlei*; da Bass e Johnson (1929) che constatarono come il *Myc. phlei*, coltivato in terreno sintetico di Long, raggiunga il suo sviluppo completo in due o tre settimane e come non produca che una quantità molto piccola di zuccheri riduttori sino al periodo di autolisi; da Prickett e Massengale (1931), i quali videro come l'ergosterolo attivo o inattivato avesse un effetto stimolante sulla crescita del *Myc. phlei*, che pure non contiene ergosterolo; da Ingraham e Steenbock (1935), i quali, abbassando nel terreno di coltura la concentrazione degli ioni K o fosfato, ottennero un aumento d'intensità del colore dei veli colturali, e aumentando la concentrazione dei sali ferrici ebbero un'anticipata formazione di pigmenti; saggiarono altresì gli effetti della sostituzione della fonte di C e di quella di N sulla formazione del pigmento; da di Raimondo e Ortali (1948), i quali constatarono come il *Myc. phlei* sintetizzasse amide nicotina; da Spallicci (1948), che constatò come l'aggiunta di filtrati di *Myc. phlei* alle colture del medesimo ne accelerasse lo sviluppo; da Odier (1949) che vide come lo ftiocolo e il 2-metil-naftochinone, pur non essendo per il *Myc. phlei* fattori di crescita, ne favorissero lo sviluppo.

### c) *Composizione chimica.*

Numerose sono le ricerche sulla *composizione chimica del Myc. phlei*.

Sul suo contenuto in grassi lavorarono Long e Campbell (1922) su ceppi indicati con i nomi di *Dungbacillus*, *Grasbacillus*, *Grass III bacillus* e *Timotybacillus* ottenendo risultati sconcertanti tra loro, che vanno da un minimo del 20,2% di lipidi per peso secco di *Timotybacillus* a un massimo di 34,7% per il *Dungbacillus*; Pangborn e Anderson (1936), i quali constatarono come i principali costituenti della cera del timoteo fossero gli acidi grassi molto attivi otticamente, e come, nella porzione insaponificabile, fossero presenti due alcool otticamente attivi, e nella porzione idrosolubile trealosio e glicerina; Prudhomme (1914), che studiò l'indice di jodio dei grassi del *Myc. phlei*, indice alto: 26,2; Peck e Anderson (1941), che dimostrarono come il principale composto eterosolubile della cera del timoteo fosse l'acido fleimicolic.

Sul suo contenuto in *acido nucleinico* ha lavorato Coghill (1931), il quale ne ha estratto dal *Myc. phlei* circa il 2%; per idrolisi da tale acido si ottiene guanina, adenina, uracile e citosina, ma non timina; esso contiene, poi, il 20% di pentoso, il che farebbe concludere che l'acido nucleinico del *Myc. phlei* è di natura vegetale in netta distinzione dal bacillo di Koch che conterrebbe un acido nucleinico di tipo animale. Petrik (1946) constatava come l'acido nucleinico di due ceppi di *Myc. phlei* (l'8 del Cornell Vet. College e l'originale di Moeller) consistesse largamente in acido del tipo desossiriboso.

Sul *pigmento* del *Myc. phlei* ha lavorato Chargaff (1930 e 1933) che constatò come questo germe contenga tre pigmenti, due dei quali sono idrocarburi colorati: il  $\beta$ -carotene e il  $\gamma$ -carotene; Ingraham e Steenbock (1935) che identificarono, invece,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene e criptoxantina; Darzins (1939) che afferma essere il  $\beta$ -carotene il costituente maggiore del pigmento; Takeda e Ohta (1939), i quali, lavorando con un ceppo del Kaiserlich Institut für Infektionskrankheiten, ottennero un acido carotenoide carbonico,  $\alpha$ -carotene,  $\gamma$ -carotene e un carotenoide nuovo cristallizzato che chiamarono «leprotina»; non rinvennero, invece,  $\beta$ -carotene e criptoxantina. Più recentemente Turian dimostrava (1950) come la

produzione dei pigmenti carotenoidi fosse esaltata, nel *Myc. phlei*, dalla presenza di ferro e manganese, e inibita (1950) dalla difenilamina. Il Turian identificava (1950) inoltre nel *Myc. phlei* un carotenoide acido vicino all'astacina e ch'egli chiama crisofleina.

Il *Myc. phlei* dovrebbe anche contenere *vitamina B<sub>1</sub>* giacchè animali mantenuti in dieta avitaminica B riprendono e aumentano di peso aggiungendo alla dieta stessa *Myc. phlei*, come constatò Damon (1923 e 1924).

Sui *polisaccaridi* del *Myc. phlei* fecero ricerche Masucci e McAlpine (1930), i quali ne isolarono uno che, nella idrolisi, dava mannosio e d-rabinosio.

Il contenuto di *azoto nel Myc. phlei* venne determinato da Coghill e Bird (1928) i quali rinvennero il 13,2% di frazione idrosolubile e il 15,8% di frazione alcalisolubile.

Un'analisi chimica completa del *Myc. phlei* (ceppo originale di Moeller) venne, infine, compiuta da Chargaff, Pangborn e Anderson (1931) i quali raccolsero 1602 patine di *Myc. phlei* per g 3173,3 ottenendo i seguenti dati: fosfatidi: 0,59; grassi solubili in acetone: 2,75; polisaccaride: 3,90; cera solubile in cloroformio: 4,61; cera gialla: 0,37; pigmento: 0,05; lipidi, in totale, 8,37; residui batterici secchi: 87,70.

Sugli *estratti metilici* di *Myc. phlei* lavorò Isaïcu (1925), il quale dimostrò come tali estratti venissero neutralizzati dagli organi di origine mesodermica o endodermica, ma non da quelli di origine ectodermica.

Roulet, Wildler e Zeller (1946) hanno constatato la presenza, in un *Myc. phloei* (sic) non definito, di un enzima capace di ossidare parecchi  $\alpha$ -ossiacidi-1, e di un enzima (Roulet e Zeller 1948) capace di demolire i peptidi-1.

#### d) *Immunità.*

La *paratubercolina* del *Myc. phlei* venne dimostrata da Irimescu (1905) il quale la preparò sterilizzando una vecchia coltura, concentrandola e filtrandola; con tale paratubercolina egli ebbe aumento di temperatura nelle cavie tubercolizzate e nell'uomo tubercoloso. Queste prove furono confermate da Lange B. e Lange E. (1922), ma non da Boquet e Nègre (1926), i quali non ottennero alcuna reazione inoculando paratubercolina da *Myc. phlei* in cavie tubercolizzate, e tubercolina vera in cavie e conigli trattati ripetutamente con *Myc. phlei*; Crawford (1926), lavorando con il timoteo di Moeller, ebbe risultati per lo più incerti e negativi; Alexa (1928) osservò che cavie sensibilizzate con il *Myc. phlei* reagiscono all'inoculazione intradermica della paratubercolina corrispondente, ma non alla tubercolina vera, mentre cavie tubercolizzate reagiscono lievemente anche alla paratubercolina; Nègre e Valtis (1931) osservarono come, inoculato a cavie infettate con *Myc. phlei* un estratto acetone di *Myc. tuberculosis*, si attivassero le lesioni da *Myc. phlei* e la moltiplicazione di questo nelle lesioni; Huntoon, Funk e White (1931) comparando l'azione di tubercolina standard OT con quella delle proteine MA 400, derivate dal tuberculare umano e dal timoteo, osservarono la similarità delle reazioni con i tre prodotti. Thomson (1932) ottenne con estratti di *Myc. phlei* reazione cutanea positiva in cavie sensibilizzate con *Myc. phlei* e reazione d'intensità minore anche nelle cavie sensibilizzate con altri a.r.; Laporte (1941), infine, ottenne con paratubercolina da *Myc. phlei*, reazioni cutanee positive in cavie sensibilizzate col germe omologo o col tuberculare, e reazioni pressochè negative usando tubercolina vera e cavie sensibilizzate col *Myc. phlei*. Freund e Waiter (1944), infine, constatarono come, inoculando a cavie bacilli uccisi del timoteo e sospesi in emulsioni di olio di paraffina e acqua, le cavie stesse divenissero sensibili alla tubercolina umana.

Immunologicamente è stato visto che il *Myc. phlei* contiene almeno un *antigene* comune con il *Myc. tuberculosis* e con numerosi acidoresistenti: Deilmann (1911), infatti, osservò come il siero dei tubercolosi fosse capace di fissare il complemento in presenza di una sospensione di *Myc. phlei* o di altri bacilli a.r., soltanto che, con un dato siero, il grado di fissazione non è lo stesso per i diversi germi, il che permetterebbe, secondo l'A., di stabilire una scala di parentela fra i diversi micobatteri; anche Much e Leschke (1911) fecero presso a poco le stesse osservazioni; Schlossberger e Pfannenstiel (1920) non riuscirono a differenziare, con l'agglutinazione, il *Myc. phlei* dagli altri a.r.; ugual risultato negativo ottennero Twort, Todd e Perkins (1924); Wilson (1925), invece, ed Ebina (1940) ottennero una differenziazione usando il metodo della saturazione delle agglutinine.

Weber e Titze (1907), inoculando a vitelli grandi quantità di timoteo, riuscirono ad elevare leggermente la resistenza di questi contro il tubercolare bovino.

Lindner (1914) non riuscì a immunizzare contro la tubercolosi vaccinando con timoteo cavie e conigli, nè a curare animali tubercolizzati con iniezioni di timoteo; Krause e Baldwin (1914) avrebbero osservato che, reinoculando il timoteo a cavie già inoculate con lo stesso ceppo si avrebbe in esse una reazione anafilattica in contrasto con quanto successivamente affermavano Boquet e Nègre e Valtis (1929-b), Boquet e Valtis (1930) i quali, nelle reinfezioni con *Myc. phlei*, avrebbero rilevato una diminuzione delle reazioni immunitarie verso il germe omologo.

#### e) *Potere patogeno.*

Numerosi sono i lavori sul *potere patogeno* del *Myc. phlei*. Dopo le prime osservazioni positive di Moeller (1898) e di Lubarsch (1899), riferite nelle premesse storiche, si occuparono dell'argomento: Mayer (1899), che riuscì ad esaltare le capacità patogene del timoteo, inoculandolo con burro, e ottenendo (1900) tubercoli caseificati e cellule giganti; Hölscher (1901), che non ottenne nessuna lesione inoculandolo per via peritoneale, mentre ebbe tubercoli, simili a quelli da corpi estranei, inoculandolo per via endovenosa; Potet (1902), che non ottenne nessuna lesione nelle cavie inoculate per via sottocutanea, ma ascessi locali, nel fegato e nella milza, nelle cavie inoculate per via endoperitoneale; Kayser (1902), che ottenne invece una malattia acuta guaribile, ma con reperto anatomo-patologico simile a quello tubercolare vero; Weber (1903) i cui tentativi furono senza risultati; Rodet e Galavielle (1905) che, con forti dosi di *Myc. phlei* inoculate endovena, provocarono talvolta la morte, talvolta una malattia passeggera; essi usarono cavie, conigli, vitelli e capre constatando come l'organo più colpito fosse il rene, che presentava noduli tubercoliformi nella corticale e nella midollare; come nel polmone si avessero granulazioni analoghe alle granulazioni grigie dovute al *Myc. tuberculosis*, e come il *Myc. phlei*, inoculato sotto la pelle, provocasse un ascesso che si vuotava e guariva rapidamente; Calmette e Guérin (1905), che introdussero timoteo nelle mammelle di una capra poco prima che partorisce, e i cui piccoli, dopo la nascita, succhiarono il latte infetto senza subirne danni apparenti: uno di questi piccoli venne sacrificato in 45ª giornata: all'autopsia presentò una catena ganglionare mesenterica molto voluminosa; latte della capra infettata venne inoculato nella dose di mezzo cm<sup>3</sup> ad alcune cavie, le quali morirono dopo due mesi in stato di cachessia, con piccoli ascessi nel punto d'inoculazione e con una peritonite adesiva; Bezançon e Philibert (1905), che ottennero, inoculando il *Myc. phlei* nel peritoneo delle cavie, peritonite fibrosa con aderenze perispleniche e periepatiche; Cantacuzène (1905 a e c), che, a differenza di altri autori, sarebbe riuscito a provocare una infezione acuta, mortale in 24 ore, iniettando nel peritoneo forti dosi

di *Myc. phlei* a caviae giovani; la dose non mortale provocherebbe una peritonite cronica accompagnata da disturbi generali; il riassorbimento completo dei batteri e la guarigione delle lesioni si effettuerebbe in sei settimane; istologicamente si noterebbero polinucleati e cellule giganti; Stancaneanu (1909), che avrebbe ottenuta, inoculando *Myc. phlei* nell'occhio, una cheratite analoga a quella tubercolare differenziandosi da questa solo per l'evoluzione che, col *Myc. phlei*, tende al riassorbimento, col *Myc. tuberculosis* alla necrosi; Lindner (1914), che non è riuscito a dimostrare la patogenicità del *Myc. phlei* anche inoculando a forti dosi, sia per via sottocutanea che per via peritoneale, a caviae e conigli; Kolle, Schlossberger e Pfannenstiel (1921) che affermano possibile la virulentazione del timoteo sino a dare tubercolosi generalizzata, con formazione di noduli caseosi, mediante passaggi di cavia in cavia; Limousin (1924) che, inoculando andovena nei conigli forti dosi di *Myc. phlei*, ottenne piccole granulazioni bianche nei reni dove, con una speciale colorazione, mise in evidenza in un individuo morto con fenomeni paralitici, grosse forme clavate che non prendevano però lo Ziehl; Boquet (1927), che nega qualsiasi azione patogena al *Myc. phlei*; Jelin e Feldmann (1928), che osservarono come il *Myc. phlei* producesse negli organi parenchimatosi fenomeni infiammatori con riformazione di noduli nei polmoni e nel fegato, noduli che (Jelin, 1929) consterebbero di due zone, una centrale necrobiotica ed una periferica, formate di cellule epiteliali e poliblasti, raramente cellule giganti; Alexa (1928), che afferma come l'inoculazione sottocutanea o endoperitoneale di *Myc. phlei* provochi una suppurazione locale, mentre l'iniezione endovenosa la formazione di granuli a predominanza renale e polmonare, evolvente verso la guarigione con sclerosi; Bertrand, Bablet e Bloch (1938) inoculando il *Myc. phlei* per via endocerebrale nel coniglio osservarono come in questo si producessero lesioni analoghe a quelle provocate dal tubereolare umano; Vaiculescu (1939) che, riprendendo le antiche esperienze di Mayer, già riferite, riconferma l'accresciuto potere patogeno del *Myc. phlei* nella cavia, inocolandolo incorporato a burro; Bertrand e Bablet (1942), infine, che non ottennero alcuna lesione inoculando il *Myc. phlei* per via intracerebrale a scimmie inferiori, contrariamente a quanto avevano ottenuto qualche anno prima (1938), in collaborazione col Bloch, nei conigli.

Sulla sorte del *Myc. phlei* ingerito dagli animali, hanno lavorato Boquet (1927), il quale ne dimostrò l'assorbimento da parte dell'intestino e l'eliminazione per le vie biliari sostenendo che tale ciclo è puramente fisiologico e indipendente da qualsiasi lesione intestinale od epatica; da Nélis e van Boeckel (1928 *a* e *b*) e da Nélis (1929 *a* e *b*, e 1930) che lo confermarono per la cavia e il coniglio adulti e per i giovani, dimostrando come in questi l'assorbimento per via intestinale fosse più facile e più rapido: tali ricerche di Boquet e suoi allievi sono, in certo qual modo, in contrasto con quelle successive dello stesso Boquet e Saenz (1930), i quali affermano che i *Myc. phlei* somministrati *per os* penetrano nell'organismo attraverso la regione tonsillare e che, dopo un'ora dalla somministrazione, i batteri si rinvennero nei gangli linfatici annessi all'apparato digerente.

L'inoculazione per via tracheale non cambia la sorte dei *Myc. phlei* che verranno, secondo Boquet, Nègre e Valtis (1930), in parte assorbiti dalla circolazione linfatica e sanguigna ed infine bloccati negli organi lontani come particelle inerti e distrutti. La sorte dei germi inoculati in peritoneo e sottocute è stata seguita nelle caviae dal Saenz (1929), il quale osservò come essi passassero nel torrente circolatorio più rapidamente nel primo caso che nel secondo, ma come la bacillemia durasse sette giorni, nell'inoculazione endoperitoneale, e solo pochi minuti in quella sottocutanea; e nel topo dal Lafon (1942), il quale constatò come i germi venissero bloccati dai gangli ed ivi distrutti entro cinque giorni.

5) DISCUSSIONE SULLA LETTERATURA

Da quanto siamo andati esponendo, risulta chiaramente come, allo stato attuale dei fatti, tracciare un quadro preciso, particolareggiato e definitivo del *Myc. phlei*, non sia possibile, e ciò per la molteplicità di reperti riferiti, per il contrasto che tra tali reperti spesso esiste e per la mancanza di elementi di sicurezza che permettano, dinnanzi a un micobatterio non determinato, di stabilire se esso appartenga o no alla specie *Myc. phlei*.

Dalla descrizione di alcuni autori risulterebbe, infatti, che il *Myc. phlei* intorbida il brodo (Moeller per il *Mistbacillus*, Lubarsch per un ceppo isolato dal *Phleum pratense*, Büttner per i ceppi da lui isolati, Jensen per il ceppo 282, Reed), mentre dalle descrizioni di altri autori risulterebbe che in brodo il *Myc. phlei* non intorbida, ma dà una pellicola superficiale (Moeller per il *Timotheebacillus*, Lehmann e Neumann per i ceppi studiati con Kumulis; Braun, Stamatelakis e Kondo per il ceppo originale di Moeller, Jensen per il « ceppo autentico »); a parte il contrasto esistente tra gli stessi autori: Büttner non ha intorbidamento in brodo glucosato ma lo ha in brodo glicerinato, Jensen ha intorbidamento con un ceppo, non lo ha con un altro.

Le colture in latte acidificherebbero secondo Moeller, alcalinizzerebbero secondo Jensen.

Il *Myc. phlei* produrrebbe tracce di indolo secondo Lehmann e Neumann, discreta quantità secondo Büttner; non ne produrrebbe secondo Braun, Stamatelakis e Kondo, e secondo Reed.

Il timoteo sarebbe identico al tubercolare per il colore delle sue colonie, la secchezza della sua patina, l'aspetto pieghettato dei suoi veli, discostandosene solo per la rapidità di sviluppo, analoga, tuttavia, a quella di alcuni tubercolari avirulenti (Kreusé); il timoteo avrebbe, invece, un pigmento bianco-grigiastro con tonalità gialla (Moeller), giallastro (Braun, Stamatelakis e Kondo), giallo-ocra (Jensen), giallo-burro sino all'arancio (Büttner), rosso-arancio (Lehmann e Neumann).

Tale pigmento conterrebbe, secondo Chargaff, Ingraham e Steenbock,  $\beta$ -carotene, che sarebbe addirittura il costituente maggiore del pigmento stesso secondo Darzins; Takeda e Ohta, in contrapposto, negano la presenza di  $\beta$ -carotene nel pigmento del *Myc. phlei*. Il *Myc. phlei* utilizzerebbe il fruttosio e la glicerina secondo Merrill, Gordon, Gordon e Hagan, non li utilizzerebbe secondo Edson, Edson e Hunter.

Quando passiamo a considerare il potere patogeno del timoteo abbiamo, da un lato, chi lo afferma: Moeller, Lubarsch, Kayser, Cantacuzène, Stancaneanu, Bertrand, Bablet e Bloch, Alexa e via dicendo; dal-

l'altro lato chi lo nega del tutto: Hölscher, Lindner, Calmette e Guérin, Bertrand e Bablet e via di seguito; senza considerare l'incongruenza di alcuni autori i quali ora affermano che il *Myc. phlei* non è patogeno e più oltre dicono che lo è: Calmette e Guérin, per esempio, i quali hanno scelto, in una serie di loro esperienze, il timoteo come tipo di a.r. non patogeno, e non patogeno riuscì per piccole capre che lo succhiarono insieme al latte, mentre quello stesso latte riuscì patogeno per le cavie; Bertrand e Bablet non ebbero azione patogena inoculando il *Myc. phlei* per via endocerebrale nelle scimmie inferiori; quattro anni prima, però, gli stessi Bertrand e Bablet, in collaborazione col Bloch, affermavano che il *Myc. phlei* inoculato intracerebralmente nei conigli produceva lesioni analoghe a quelle del tubercolare vero.

Come spiegare questo insieme di dati contrastanti — e non ne abbiamo citati che pochi, gli altri il lettore li avrà spigolati da sè nella rivista della letteratura — se non sospettando che i vari autori abbiano lavorato con germi diversi ritenuti tutti uguali tra loro, o con colture miste?

Del resto, quali dati ha oggi un ricercatore per controllare se un batterio acido-resistente che a lui giunge con la denominazione di *Myc. phlei* L. e N. sia realmente tale?

Sino ad oggi si è parlato di *Myc. phlei* soltanto perchè, sulla etichetta di un ceppo in collezione, era scritto flei, o fléol, o timoteo, o *Timotheebacillus*. Molti autori prudenti, nel cominciare le loro ricerche, le hanno riferite ad un ceppo: gli autori americani al ceppo originale avuto direttamente da Moeller; e quelle sono le ricerche più attendibili; purtroppo sono le meno numerose.

Allo stato attuale dei fatti, quindi, noi non possiamo dire esistano dati morfologici e biologici precisi ed accettabili atti a determinare la specie dell'acidoresistente noto con il nome di *Myc. phlei*. Possiamo soltanto intravedere un filo conduttore che si diparte dalla prima osservazione di Moeller e che ci permette di discernere un batterio scarsamente acidoresistente allorchè è alle prime ore di coltura, fortemente allorchè vecchio, che dà colture pigmentate che passano dal giallo all'arancio, che cresce rapidamente sui comuni terreni, ch'è capace di vegetare a 50°C. e di utilizzare soltanto alcune determinate sostanze come fonti di carbonio.

#### 6) PROPOSITI DI RICERCA, MATERIALE E METODI.

Così stando le cose, e nel tentativo che andiamo perseguendo di portare un po' di chiarificazione tra le specie del genere *Mycobacterium*, ci siamo proposti di delimitare i confini della specie *phlei*.

Le ricerche di cui al presente studio, non sono state condotte sopra un determinato numero di ceppi da noi ricevuti come *Myc. phlei*, e ritenuti a priori essere tali, ma le abbiamo praticate sperimentando con tutti gli acidoresistenti in nostro possesso, e precisamente con quelli che abbiamo elencato in una nostra precedente monografia (Penso, Cattaneo, Morellini e Ortali, 1948) tra i « ceppi di collezione » e tra i « ceppi di nuovo isolamento ». Da quell'epoca, però, i 121 ceppi di collezione sono saliti a 140 e gli 808 ceppi di nuovo isolamento superano il migliaio.

Di tutti questi ceppi è stata presa in considerazione la sensibilità a dosi differenti di PAS (Cattaneo, Morellini, Ortali e Penso, 1949), la presenza e il colore del pigmento, la temperatura massima di coltura, la necessità o meno di fattori di crescita, l'utilizzazione degli idrati di carbonio, la sensibilità ai diversi fagi antimicobatterici da noi isolati (Ortali 1948, Penso e Ortali 1948, Ortali e Penso 1949, Penso e Ortali 1949). In base ai risultati ottenuti noi abbiamo riunito i ceppi che avevano identiche e analoghe proprietà in altrettanti gruppi.

Attraverso questa selezione abbiamo così distinto, tra gli altri, un gruppo di acido-resistenti formato dai seguenti ceppi: B 10, Crottin, Fleol, Fléole Lausanne, L 619, Lâennec 3, Moeller *Mycobacterium phlei* 54, Timoteo, Vip 27 e Vip 28.

Questi undici ceppi presentavano caratteristiche che potevano farli riavvicinare al ceppo originale di Moeller: il *Timotheebacillus*.

Per questo motivo abbiamo considerato gli undici ceppi in questione come veri *Myc. phlei* e come tali li abbiamo studiati. Passiamo ora a descriverli e a sistematizzarli facendo, però, subito notare come tra questi undici ceppi manchi il *Myc. phlei* 525 della NCTC proveniente dal National Biological Museum di New York, germe che abbiamo studiato e che nulla ha a che fare con gli undici precedenti; per le caratteristiche esso è da includersi invece, nel gruppo del *Myc. lacticola*, sul quale avremo occasione d'intrattenerci a suo tempo.

## 7) MORFOLOGIA CITOLOGICA.

Il *Myc. phlei* presenta, nei preparati allestiti su vetrino, una morfologia cellulare analoga a quella di tutti gli altri germi dello stesso genere: batteri a bastoncino diritto o incurvato, piegati ad angolo, talvolta a clava o a manubrio, a oliva o coccoidi (fig. 1 e 2).

Queste diverse forme possono rinvenirsi tutte nello stesso preparato di un solo ceppo. Alcuni determinati stipiti, però, possono abbondare più di una forma che di un'altra: il Crottin e il Phlei 54, per esempio, hanno più

frequentemente forme olivari e coccoidi che non gli altri ceppi (fig. 3).

Forme filamentose e forme ramificate, di regola, non si rinvencono nè su preparati fatti da colture giovanissime, di 12-24 ore, nè su preparati fatti da vecchie colture di più mesi. Di regola, abbiamo scritto, perchè qualche rara forma appena ramificata, o qualche rarissimo filamento è dato vederlo, come è possibile casualmente rinvenire forme globulari piriformi.

La lunghezza di questi germi varia da 1 a 3  $\mu$  e il loro spessore da 0,4 a 0,8  $\mu$ .

Se l'aspetto morfologico del *Myc. phlei* è quello che or ora abbiamo detto, tale aspetto compie una evoluzione caratteristica se noi osserviamo, su vetrino, i germi di una stessa coltura tutti i giorni e per più giorni di seguito.

Dopo 24 ore di coltura i germi sono di solito a bastoncino diritto o leggermente incurvato, più o meno lunghi — secondo i ceppi — e piuttosto spessi. Verso il terzo giorno, i germi assumono un aspetto più snello, si allungano leggermente, gli apici divengono aguzzi, il batterio assume un aspetto bananiforme e nel suo interno compare un grosso granulo lungo all'incirca un micron e mezzo (fig. 4 e 5), visibile a fresco e nei preparati colorati. Tra il terzo e il quarto giorno tutti i germi sono in genere così granulati, mentre i singoli individui assumono un aspetto che ricorda, grosso modo, quello degli sporozoi malarici. Il granulo sembra essere più spesso del corpo batterico, che in quel punto protunde, e in ogni germe vi è di solito un solo granulo. A volte, però, è dato vederne anche due e persino tre (fig. 5, *a* e *b*). In talune forme si direbbe che i due granuli sono frutto di una divisione; essi, poi, sono presenti, sia nelle forme cianofile che in quelle acidoresistenti. Tali forme granulate durano poco; raggiunto l'apice della frequenza, decrescono rapidamente, i granuli rimpiccoliscono, sembrano riassorbiti, e già al quinto o sesto giorno si ha una percentuale minima, o addirittura la scomparsa delle forme granulate, senza che si abbia a notare la comparsa di forme coccoidi. E' bene qui osservare come, nei ceppi in cui predominano le forme coccoidi, gli elementi granulati siano molto più rari e presenti soltanto nelle forme allungate. Dopo la scomparsa dei granuli, si hanno forme bastoncellari tipiche, abbastanza grandi, e che tali restano in seguito senza dar luogo alle forme granulate che si rinvencono talvolta come elementi di eccezione.

Lo studio morfologico mediante il microscopio elettronico, dà ragguagli di maggior precisione.

Il microscopio mostra, infatti, come il *Myc. phlei* sia provvisto di una membrana cellulare che avvolge uniformemente tutto il germe (fig. 6). Tale

membrana pericellulare è perfettamente liscia e risulta evidente durante la demolizione fagica del germe (fig. 7). Il citoplasma batterico è omogeneamente compatto, scarsamente trasparente agli elettroni (60.000 volts) e mostra una porzione periferica più trasparente. All'interno del protoplasma si mettono in evidenza una serie di corpi sferici (fig. 8 e 9) che praticamente non lasciano passare gli elettroni. Tali corpi, di diversa grandezza e disposti senza ordine, sono generalmente più piccoli dei corpi analoghi che si rinvencono nel germe della tubercolosi umana (fig. 10); nella demolizione fagica del germe, essi non vengono attaccati, permangono all'interno della membrana pericellulare svuotata dal resto del suo contenuto, o si riversano all'esterno integri nel loro aspetto e nella loro scarsa trasparenza agli elettroni (fig. 11 e 12).

Il granulo centrale, visibile in un determinato momento nei germi osservati al microscopio ottico, è visibile anche al microscopio elettronico, dove compare sotto forma di un corpo allungato a superficie morfiche che fa ingrossare lo spessore del germe nel punto in cui esso si rinviene. Le dimensioni del corpo osservato al microscopio elettronico corrispondono a quelle del granulo osservato al microscopio ottico. Anche la maggior lunghezza del germe, la sua snellezza, la sua trama più delicata vengono confermati dalla osservazione elettronica, che mostra in questi germi un protoplasma meno compatto e più permeabile agli elettroni (fig. 13).

Se questa è la morfologia che il *Myc. phlei* presenta dopo essere stato stemperato e steso su vetrino coprioggetto, ben diversa è la morfologia ch'esso presenta nell'ambito della colonia in cui cresce e si moltiplica.

Operando, infatti, con la tecnica delle microcolture, di cui si dirà più oltre, noi possiamo seguire la morfologia cellulare del *Myc. phlei* dal momento in cui un individuo isolato comincia a vegetare.

Noi vediamo, così, come nel primo periodo di vegetazione il singolo germe emetta piccole ramificazioni, quasi ognuna di esse gemmasse dal corpo batterico (fig. 14). Le entità ramificate che non risultano si ispessiscono e si allungano (fig. 15), e seguitano a ramificarsi dando filamenti molto lunghi e contorti (fig. 16).

Dopo 48 ore di coltura, le singole unità si ispessiscono notevolmente lungo l'asse centrale dando alla periferia sottili e delicate ramificazioni (fig. 17 e 18); in seguito si formano lunghi filamenti (fig. 19) provvisti di ramificazioni brevi, disposte quasi sempre alternativamente sui due lati dell'asse principale dei filamenti; questi finiscono per riunirsi a cordone, i cordoni si riuniscono tra loro, impedendo l'ulteriore osservazione microscopica sulla struttura morfologica dei singoli individui.

Osservando le colture giovani a più forte ingrandimento (fig. 20 e 21) si osserva come, nell'interno dei filamenti, siano presenti granuli analoghi a quelli che si osservano nei preparati allestiti su vetrini, e segmenti che sembra delimitino le singole unità batteriche così come siamo soliti osservare nei preparati per stemperamento e striscio; e che così sia, lo è dimostrato dal fatto che, nelle microcolture colorate col metodo di Robinow, la netta separazione dei singoli individui è bene evidente nell'interno dei filamenti (fig. 22 e 23).

Un fatto strano è che, nelle microcolture, i germi si presentano sempre in filamenti più o meno ramificati, mentre, nei preparati allestiti con la comune tecnica batteriologica, i germi sono sempre isolati e singoli. Evidentemente, nello stemperamento e nello strofinio sul vetrino, i filamenti si spezzano e i singoli elementi che li compongono si disperdono sulla superficie. Data la costanza del fatto, si deve ammettere la estrema fragilità dei filamenti o, per lo meno, della membrana che tiene uniti i singoli individui componenti il filamento.

#### 8) PROPRIETÀ TINTORIALI E AFFINITÀ CHIMICHE.

Il *Myc. phlei* si colora abbastanza facilmente con tutti il comuni coloranti usati in batteriologia. Col bleu di metilene si colora tenuamente in azzurro mentre i granuli, quando ci sono, assumono intensamente il colore.

Il *Myc. phlei* è essenzialmente acidoresistente (colorazione di Ziehl-Neelsen), ma questa acidoresistenza non è sempre totale ed evolve con l'età della coltura. Nelle prime 24 ore — operando su colture in agar brodo glicerinato — prevalgono senz'altro le forme cianofile. Questa prevalenza non ha un indice fisso: a volte è del 90%, a volte del 75%, a volte del 60%; ma prevalenza c'è. Col passare dei giorni i rapporti s'invertono; a partire di solito dal quinto giorno prevalgono le forme acido ed acool resistenti che, dopo il settimo giorno, costituiscono l'assoluta maggioranza. Qualche rara forma cianofila permane tuttavia.

Le forme granulate descritte precedentemente possono essere sia cianofile che acidoresistenti. Il granulo è più intensamente cianofilo o più intensamente acidoresistente del rimanente protoplasma.

Morfologicamente, non si notano differenze alcune tra germi cianofili e germi acidoresistenti.

Il *Myc. phlei* è sempre grampositivo. Non vi è rapporto tra cianofilia o acidoresistenza e Gram. Le forme granulate sono anch'esse grampositive, con la particolarità che il granulo assume più intensamente il colore.

Trattando i germi con acetone e con HCl/N a caldo per 15 minuti,

i corpi sferici, presenti nel loro interno e visibili al microscopio elettronico, non scompaiono.

La colorazione di Robinow, nonostante riesca difficoltosa con questi germi, permette di ottenere ogni tanto buoni preparati, specie se si ha cura di fissarli in alcool metilico, di sgrassarli in cloroformio, rilavarli in alcool metilico prima di cominciare il trattamento alla Robinow. Anche col metodo del Robinow modificato da Knaysi, Hillier e Fabbri (1950) si ottengono buoni preparati.

Con l'una o l'altra di queste tecniche si mette bene in evidenza il granulo centrale, già descritto in precedenza, e che, per questo fatto, deve interpretarsi come formazione nucleare del germe. Detto granulo è intensamente rosso, su fondo rosso più chiaro, con il metodo di Ziehl-Neelsen; violetto-scuro su fondo meno carico, col metodo del Gram; azzurro su fondo rosa-pallido, col metodo del Robinow (fig. 39).

Abbiamo praticato la colorazione alla Robinow anche sulle microcolture ottenendo buoni preparati nei quali si osservano formazioni nucleari all'interno dei singoli individui riuniti nei filamenti (fig. 22 e 23) e più tardi all'interno dei filamenti intrecciantesi tra loro (fig. 24). Nelle colonie di 48 ore, allorchè facile è riscontrare un grosso tronco centrale da cui si dipartono sottili filamenti ramificantisi (fig. 17 e 18), le formazioni nucleari si stipano all'interno del tronco centrale (fig. 25). Nelle microcolonie sviluppantesi sino a una entità più complessa, le formazioni nucleari sono presenti soprattutto negli elementi periferici e quindi più giovani (fig. 26).

#### 9) MORFOLOGIA DELLE COLONIE E DELLE PATINE.

Nei terreni solidi, il *Myc. phlei* dà colonie caratteristiche: rotondeggianti, a margine frastagliato e sinuoso, a superficie molto rugosa, pieghettata e festonata; le pieghe hanno sempre andamento radiale, convergendo verso il centro sopraelevato; nel loro insieme, perciò, le colonie assumono ognuna un aspetto a montagna (fig. 27). Tale aspetto permane anche nella visione microscopica delle colonie (fig. 28).

Dal punto di vista morfologico, una sola variante abbiamo osservato: quella di colonie più rotondeggianti delle precedenti, poco rilevate a fondo leggermente mammellonato e con margini sempre frastagliati, ma meno accidentati (fig. 29). Altra caratteristica di queste colonie è quella di avere la fascia marginale sottilissima (fig. 30), trasparente e costituita da uno strato monocellulare di germi; questa fascia fa sembrare che la colonia sia provvista di un alone. Questo tipo di colonie si

osservano soprattutto nei primi giorni di coltura; in seguito esse evolvono trasformandosi con l'invecchiamento in colonie del tipo normale (diciamo « normale », perchè di gran lunga le più frequenti), di modo che, a un certo momento, è possibile osservare, le une accanto alle altre, colonie dei due tipi (fig. 31).

Le patine del *Myc. phlei* hanno sempre un fondo uniforme, sebbene granuloso, sul quale emergono pieghe che finiscono col ricadere su se stesse, dando luogo ad ammassi cerebriformi. Colonie e patine sono quasi sempre apigmentate all'inizio, per divenire color giallo-uovo, giallo-arancio, giallo-arancione carico (fig. 41).

Nei terreni liquidi normali (brodo semplice, glucosato e glicerinato, Sauton), il *Myc. phlei*, seminato in superficie, forma dapprima un velo che si trasforma presto in un feltro molto spesso, intensamente pieghettato (fig. 32), e che risale su per le pareti del recipiente (fig. 33).

Nei terreni liquidi per colture in profondità (terreno di Dubos) il *Mycobacterium phlei* dà una crescita granulare che sedimenta in una massa cremosa.

Nei terreni liquidi coltivati in agitazione il germe cresce omogeneamente dando, però, sul principio, finissimi aggregati che si trasformano, in quarta giornata, in masse globulari (fig. 34), più o meno allungate, talvolta ramificate (fig. 35 e 36). Ognuna di queste masse globulari può considerarsi come una colonia costituita da elementi per lo più acido-resistenti alla periferia, cianofili al centro (fig. 40).

Tutti gli undici ceppi da noi studiati hanno caratteristiche analoghe, salvo il ceppo di Moeller che dà con maggiore frequenza colonie mammellonate.

Con la tecnica delle microcolture — di cui si dirà nel paragrafo seguente — è possibile seguire la morfologia evolutiva delle colonie a partire da un singolo individuo: questo comincia col ramificarsi, mentre il corpo originario si allunga, s'ispessisce e nuove ramificazioni si formano; si ha, alla fine, una serie di filamenti più o meno contorti che si riuniscono tra loro in colonie per costituire l'impalcatura della colonia macroscopica.

#### 10) CARATTERISTICHE CULTURALI

Il *Myc. phlei* cresce con facilità su tutti i terreni liquidi e solidi, sia sintetici che biologici.

Sui terreni solidi dà uno sviluppo visibile già dopo 24 ore, sviluppo che aumenta sensibilmente dopo 48 ore, raggiungendo il suo massimo

verso l'8° o il 10° giorno, cioè coltivando a 37° C.; ove la temperatura d'incubazione aumenti, aumenta anche la velocità e il rigoglio di crescita; questo fenomeno è stato studiato e analizzato nei suoi particolari sulle colture in terreno liquido e di esso parleremo più oltre.

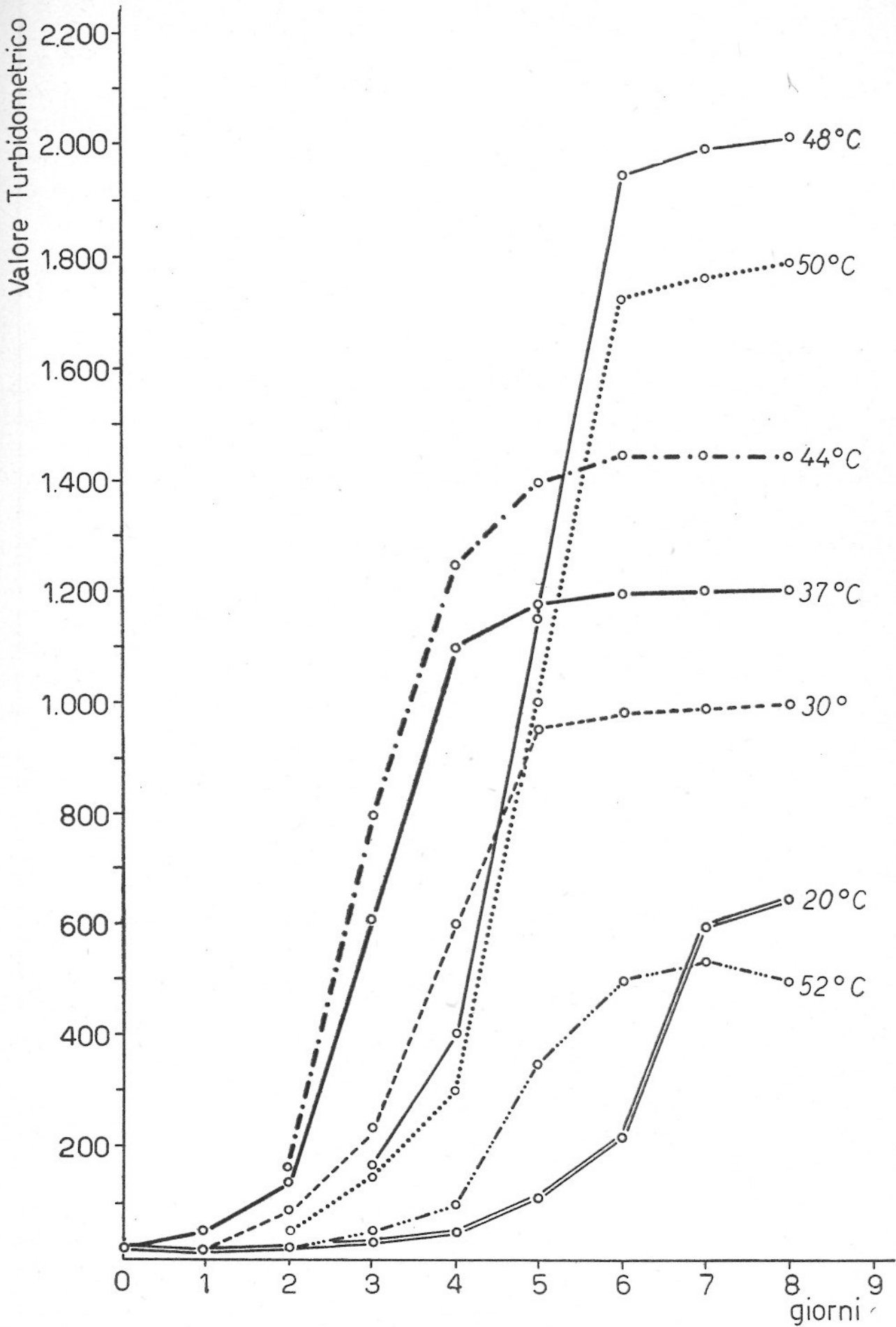
Con la tecnica delle microcolture è possibile seguire la formazione delle colonie partendo da una singola cellula, come abbiamo già precedentemente descritto e illustrato (figg. 14-26).

La tecnica da noi impiegata allo scopo è stata la seguente: sopra l'estremità di un vetrino coprioggetti — preventivamente sterilizzato — si distende una goccia di sospensione diluita di *Myc. phlei*. Il vetrino viene quindi introdotto dentro un tubo di agar inclinato, e la sua estremità infissa a coltello nell'agar stesso. I germi sul vetrino crescono abbondantemente nella porzione a contatto con l'agar, e meno intensamente nella porzione subito al di sopra dell'agar. Volendo osservare la crescita dei germi, si asporta delicatamente il vetrino: la porzione al di sopra dell'agar non viene in nessun modo alterata ed i rapporti di contiguità restano integri.

Sui comuni terreni liquidi (brodo semplice o glicerinato, brodo patata, Sauton) il *Myc. phlei* cresce in superficie (la semina è facile giacchè i frustoli galleggiano senza difficoltà): si forma da prima un velo liscio che successivamente s'increspa, s'ispessisce e risale lungo le pareti del recipiente, lasciando limpido il liquido sottostante (fig. 33). Nelle colture di circa un mese, si formano al di sotto del feltro, sottili e delicate stalattiti che si staccano e cadono al fondo. Il brodo rimane sempre limpido.

In terreno di Dubos, il *Myc. phlei* cresce in profondità, intorbido omogeneamente il bordo, così da permettere lo studio turbidometrico delle colture e la stesura di curve di crescita. Abbiamo potuto così studiare il comportamento del germe coltivato a diverse temperature: 20°, 30°, 37°, 48°, 50°, 52° C.; constatando come (grafico 1) il *Myc. phlei* raggiunga concentrazioni M (massime) sempre più elevate man mano che aumenta la temperatura in cui si coltiva, sino ai 48° C. A 50° C. la concentrazione M diminuisce; a 52° C. precipita a valori molto bassi, cosicchè si può dire che l'optimum di temperatura di crescita per il *Myc. phlei* è 48° C, pur essendo possibile la sua coltura tra i 20° e i 52° C.

D'altro canto, la fase di latenza si prolunga notevolmente con basse temperature. Analizzando, però, il diagramma di cui alla fig. 40, si osserva come tale prolungamento si avveri, sebbene in minori proporzioni, anche per le temperature di 48° e 50° C. Ove si tenga presente, però, che le prove sono state condotte con un ceppo ormai da anni abi-



Graf. 1 - Curve di crescita del *Mycobacterium phlei* coltivato a diverse temperature in terreno di Dubos

tuato a crescere a 37° si può sospettare si sia formata, nel ceppo di origine, una variante adattata ai 37° C.

Per confermare questa ipotesi ed eliminare una possibilità di errore, abbiamo coltivato il ceppo per dieci passaggi successivi a 48° stabilendone nuovamente la curva di crescita: la concentrazione M è rimasta invariata, mentre la fase di latenza si è notevolmente abbreviata sovrapponendosi quasi a quella ottenuta con il ceppo originale coltivato a 37°C. (grafico 2).

La temperatura di 48° è veramente, quindi, la temperatura optimum di crescita per il *Myc. phlei*.

Abbiamo studiato, poi, il variare della curva di crescita in rapporto col variare del pH, onde stabilire l'optimum di questo. Abbiamo allo scopo eseguito due serie di esperimenti: una, operando con terreni aventi un pH di partenza differente e seguendo l'evoluzione di tale pH durante la curva di crescita (grafico 3), l'altra operando con terreni aventi ugualmente pH di partenza differenti, ma non cambiabili durante la crescita del germe, poichè tamponati (grafico 4). Tutte le esperienze sono state eseguite su colture in agitazione.

Dalla prima serie di esperienze abbiamo potuto constatare come seminando il *Myc. phlei* su terreni di coltura aventi pH inferiori a 5, il germe praticamente non si sviluppi pur notandosi qualche lieve spostamento del pH che, come nel caso riportato nella fig. 42, da 4,5 è passato a 5.

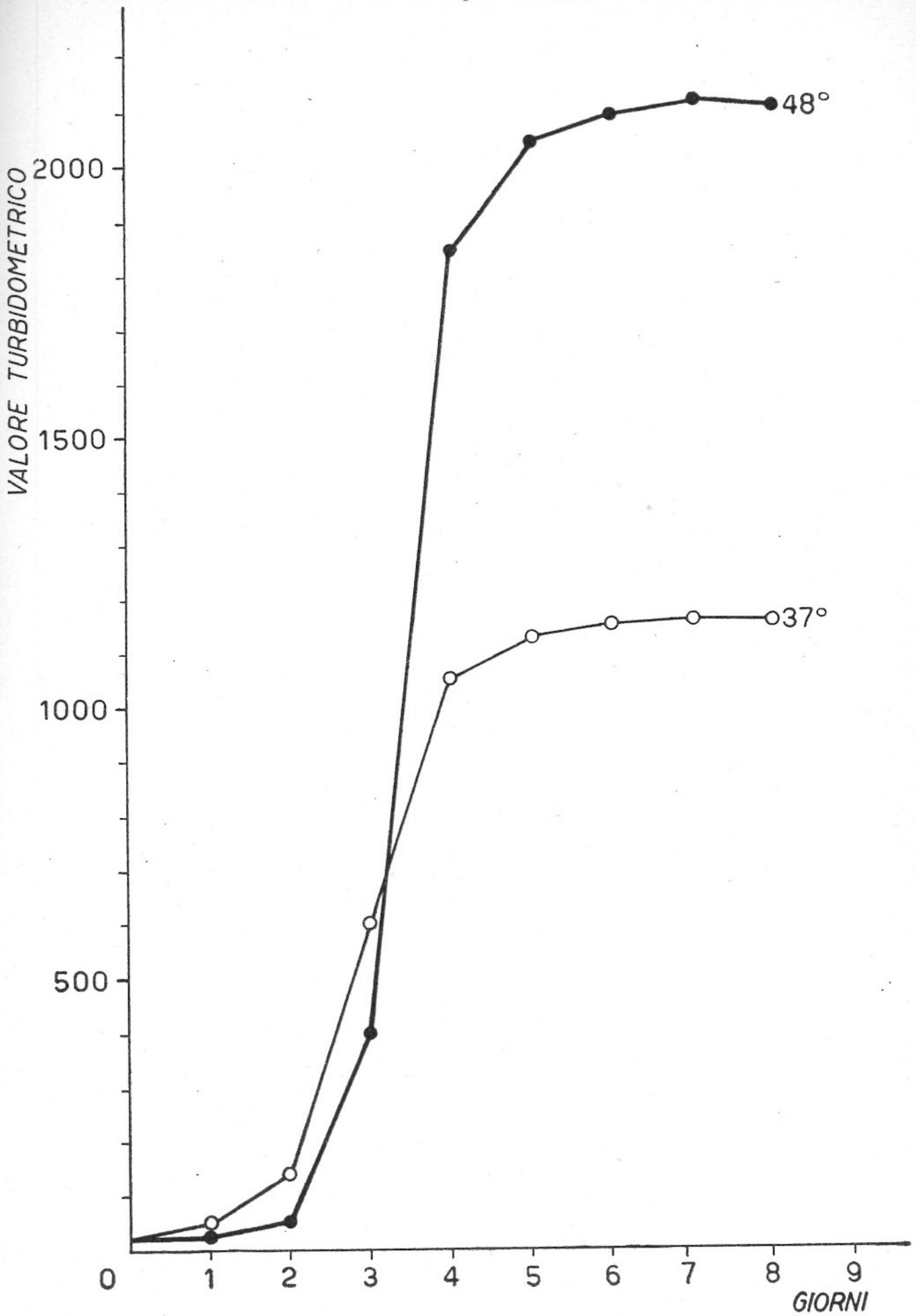
Il germe è invece capace di svilupparsi soltanto quando il pH di partenza del terreno è superiore a 5,5, ma non a 9.

Tra pH 5,5 e 8,8 sono comprese le possibilità di sviluppo del *Myc. phlei*, possibilità che non evolvono tutte nella stessa maniera, ma differiscono notevolmente le une dalle altre. Il tempo di latenza più breve e la concentrazione M più elevata si hanno soprattutto con i pH di partenza compresi tra 6 e 7. L'optimum si ha intorno a pH 6; le fasi di latenza più lunghe si hanno con pH inferiore a 6 o superiore a 8,5.

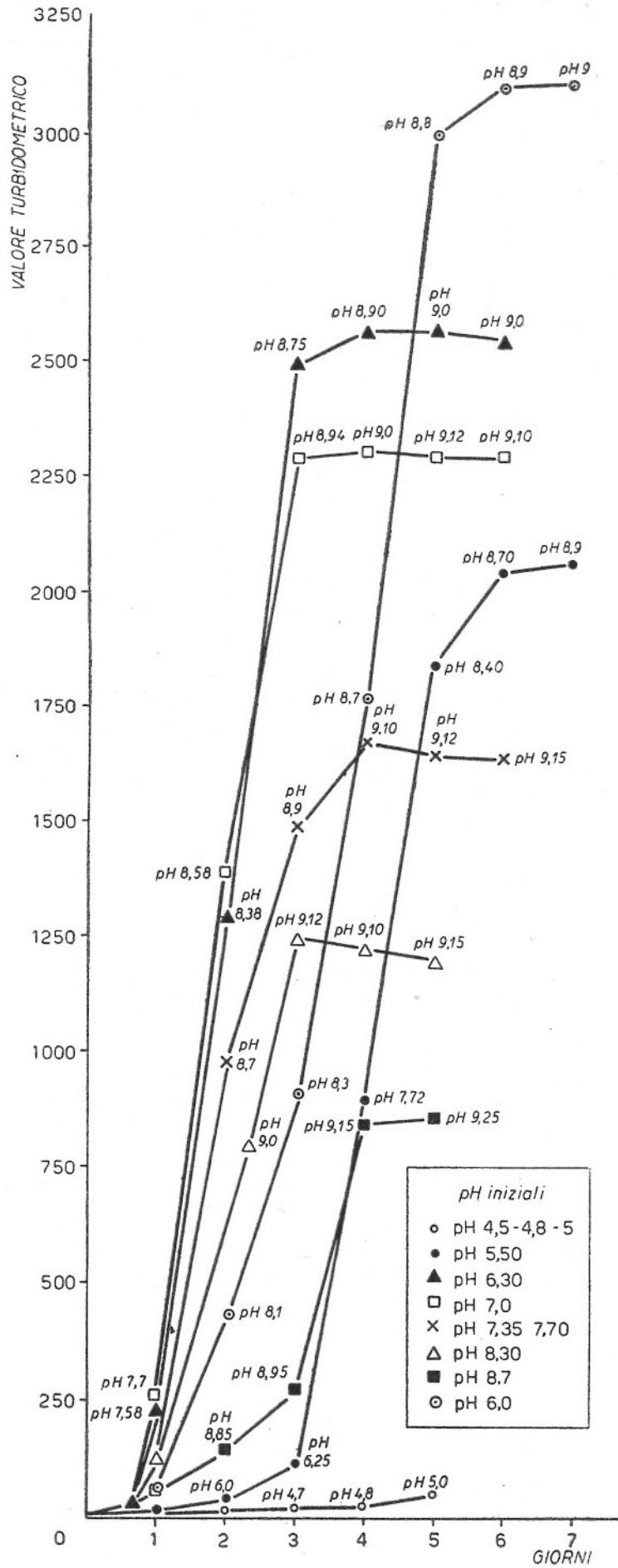
La concentrazione M più elevata si ottiene con pH 6; concentrazioni M elevate si ottengono anche con pH compresi tra 5,5 e 7.

Interessante è seguire i cambiamenti del pH durante la coltura. Nelle prime 12 h. il pH resta immutato; i primi cambiamenti si hanno dopo 24 h, alla fine cioè della fase di latenza.

Con pH di partenza 6 si è avuto, dopo 24 h., pH 6,9; con pH 6,5, pH 7,2; con pH 7, pH 7,7; con pH 7,5, pH 8; con pH 8,4, pH 8,5; con pH 9, pH 9. Il che ci dice come il pH evolva verso valori più alti e come lo scarto tra il valore di partenza e il valore riscontrato dopo 24 h. sia più forte nei terreni il cui pH di partenza era più basso.



Graf. 2 - Curve di crescita del *Mycobacterium phlei* coltivato a 48°C per dieci passaggi successivi, paragonata alla curva ottenuta coltivando a 37°C (terreno di Dubos)



Graf. 3 - Curve di crescita del *Mycobacterium phlei* coltivato in brodo a pH iniziali diversi (colture in agitazione)



Fig. 1. - *Mycobacterium phlei*. Forme prevalentemente bastoncellari (1000 diametri).



Fig. 2. - *Mycobacterium phlei*. Forme arcuate, angolari, ramificate (1000 diametri).

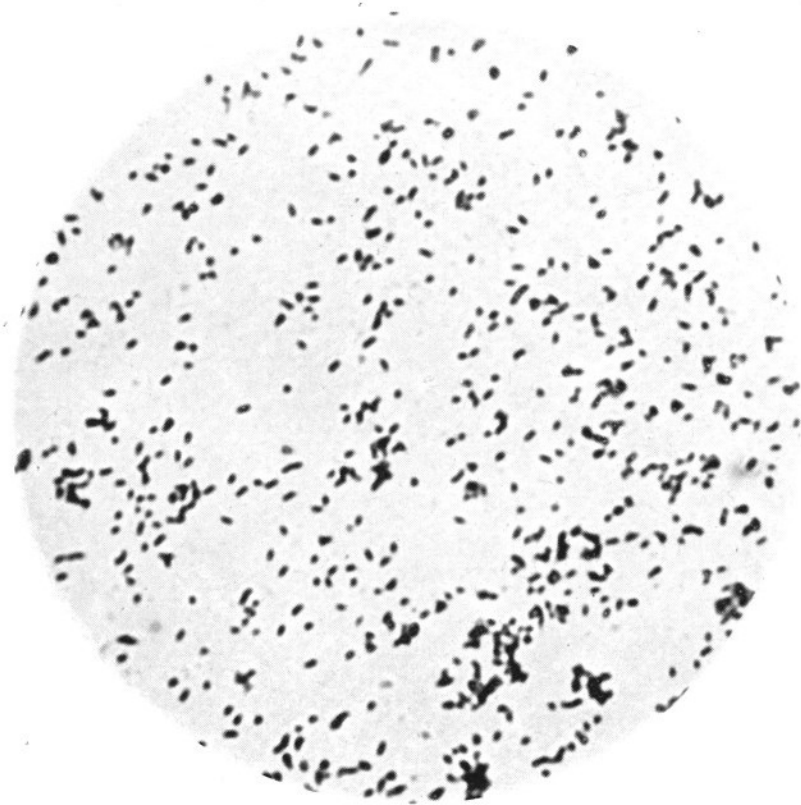


Fig. 3. - *Mycobacterium phlei*. Forme prevalentemente coccoidi (1000 diametri).



Fig. 4. - *Mycobacterium phlei*. Individui allungati, arcuati e provvisti di granulo centrale; notare come la porzione contenente il granulo sia più larga della rimanente porzione cellulare (1000 diametri).

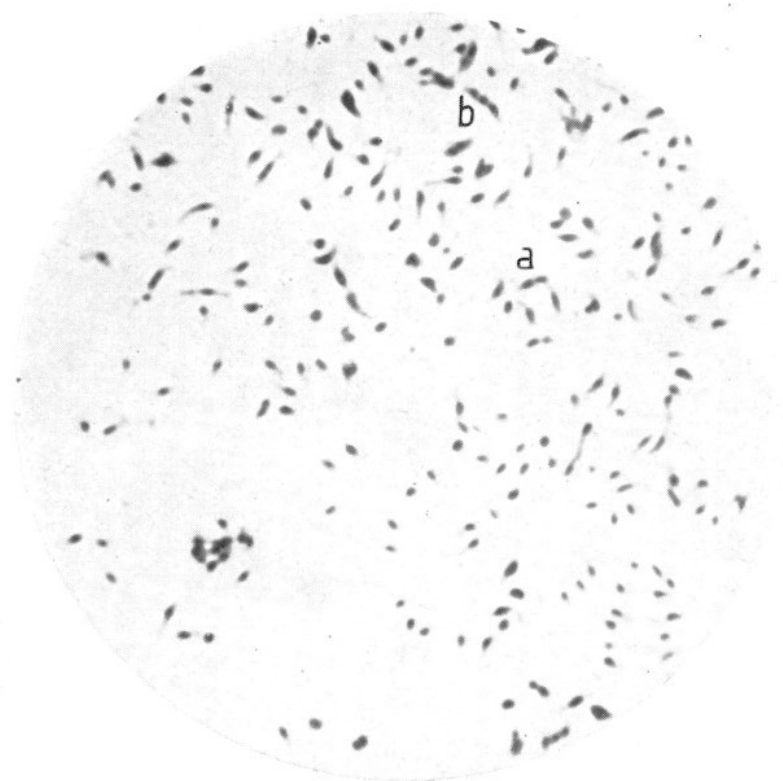


Fig. 5 - *Mycobacterium phlei*. Individui con due (a) e tre (b) granuli interni (1000 diametri).

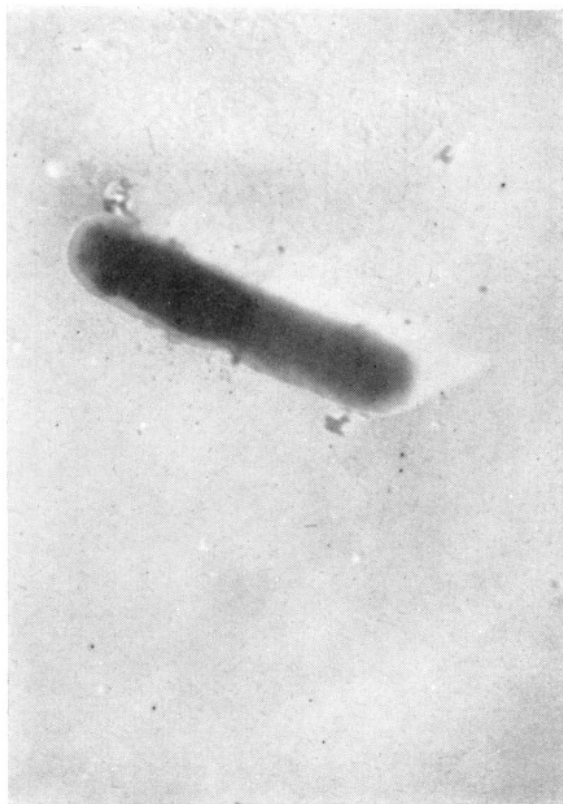


Fig. 6. - Fotografia elettronica di *Mycobacterium phlei*: è nettamente visibile la membrana pericellulare.

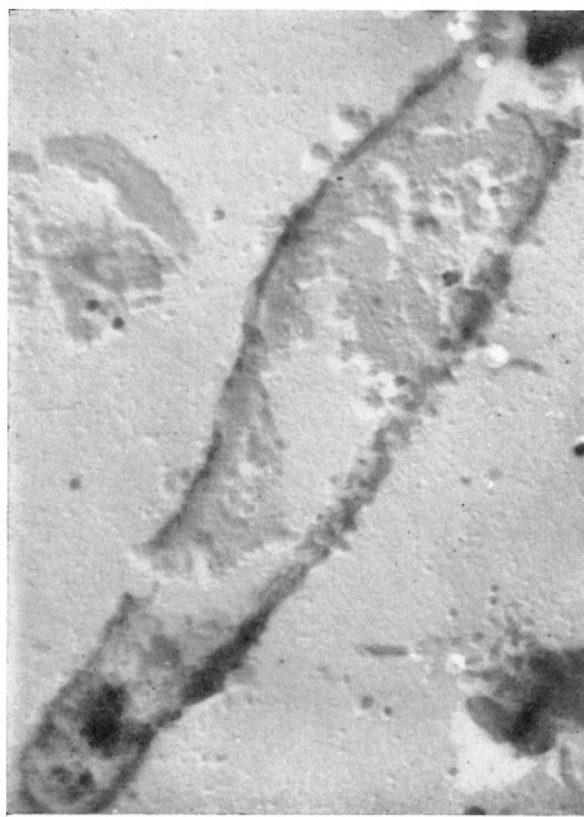


Fig. 7. - Membrana cellulare di *Mycobacterium phlei* lisato da *Phagus phlei*.



Fig. 8. - Fotografia elettronica di *Mycobacterium phlei*: notare i corpi sferici interni scarsamente permeabili ai raggi elettronici.



Fig. 9. - Controtipo della figura precedente.



Fig. 10. - Fotografia elettronica di *Mycobacterium tuberculosis var. hominis*: notare come i corpi sferici interni siano molto più grandi di quelli del *Mycobacterium phlei*.

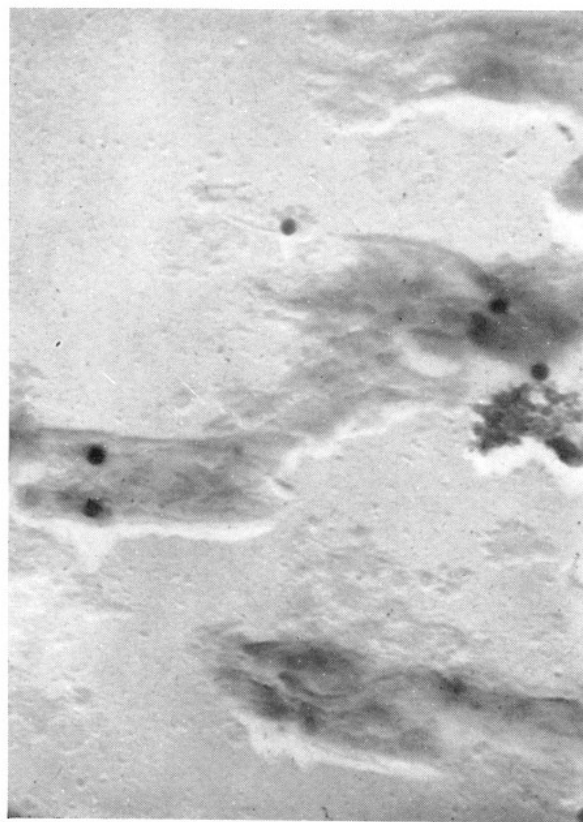


Fig. 11. - Lisi fagica di *Mycobacterium phlei*: notare come i corpi sferici interni non siano attaccati dai fagi.

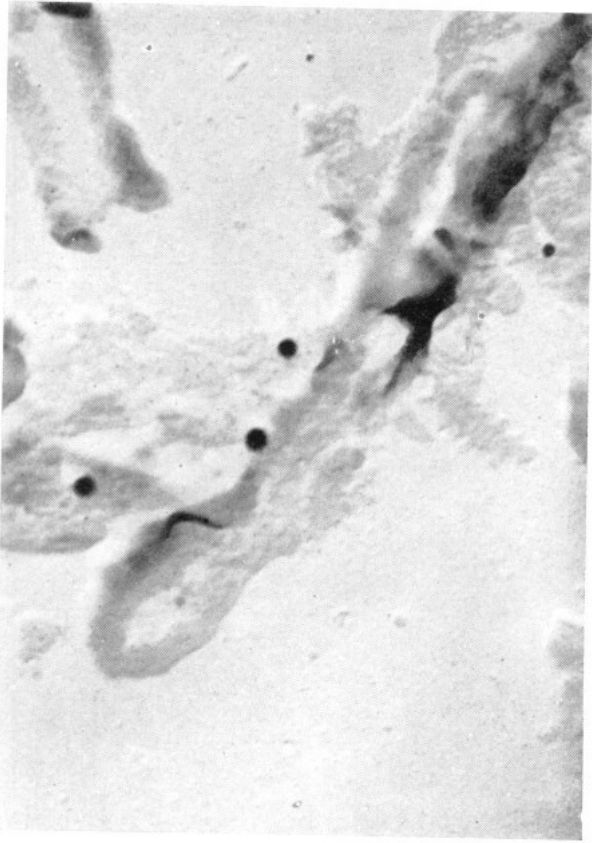


Fig. 12. - Corpi sferici di *Mycobacterium phlei* liberatisi durante la lisi fagica.

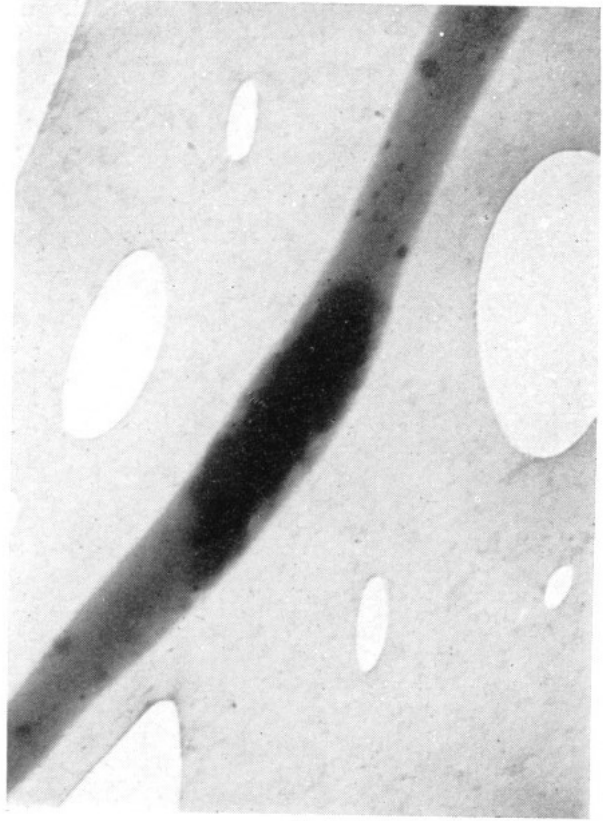


Fig. 13. - Fotografia elettronica della porzione centrale di un *Mycobacterium phlei* provvisto di granulo; la porzione contenente il granulo è più larga del resto del batterio.



Fig. 14. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (dopo 12 ore): prime ramificazioni (400 diametri).



Fig. 15. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (di 24 ore): i filamenti batterici si allungano e nuove piccole ramificazioni si formano dai rami primitivi (400 diametri).

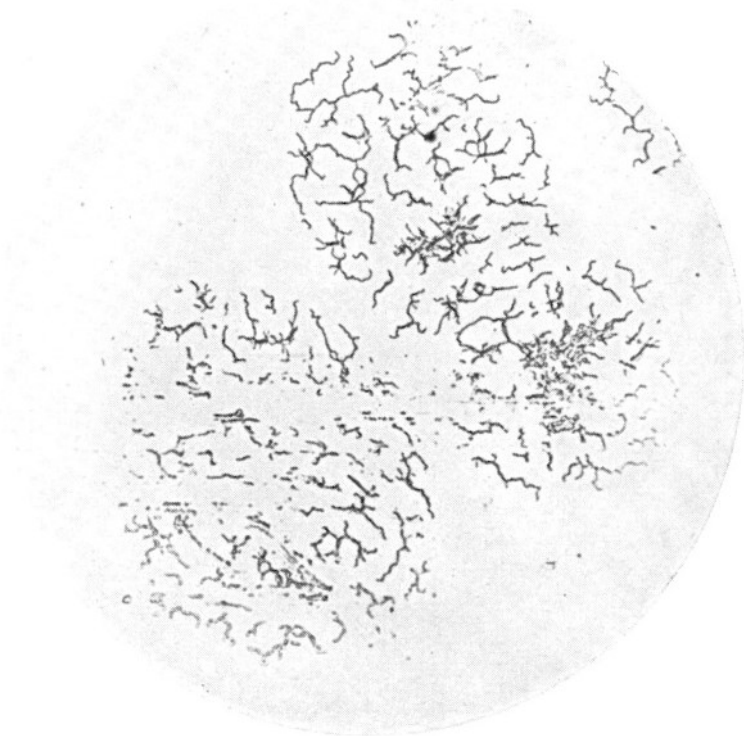


Fig. 16. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (dopo 24 ore): i filamenti si sono ulteriormente allungati, e così le ramificazioni secondarie (400 diametri).

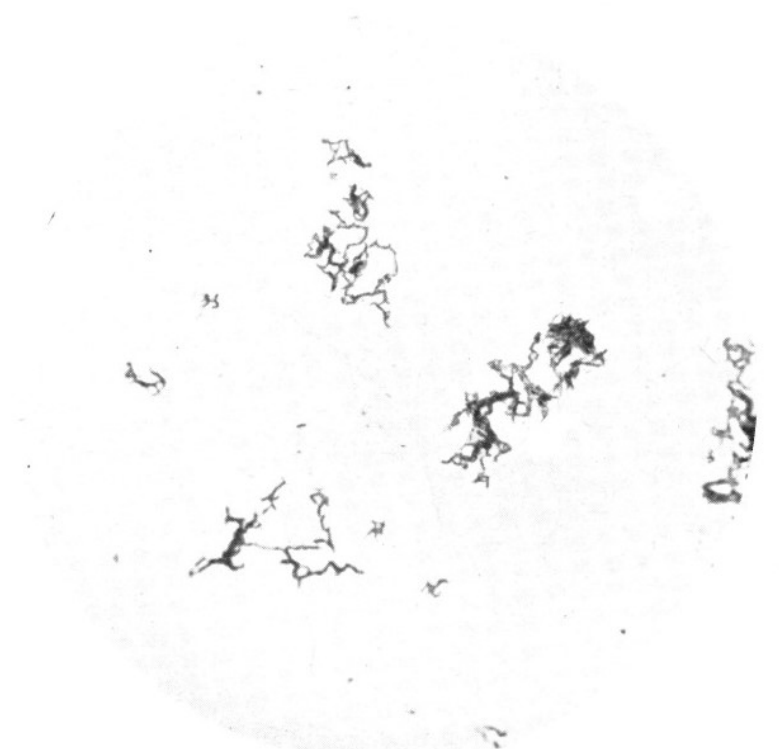


Fig. 17. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (di 48 ore): l'asse centrale dei filamenti si ispessisce (500 diametri).



Fig. 18. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (dopo 48 ore): ulteriore ispessimento dell'asse centrale e delle prime ramificazioni (500 diametri).



Fig. 19. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (dopo 48 ore): filamenti lunghi provvisti di ramificazioni brevi (500 diametri).

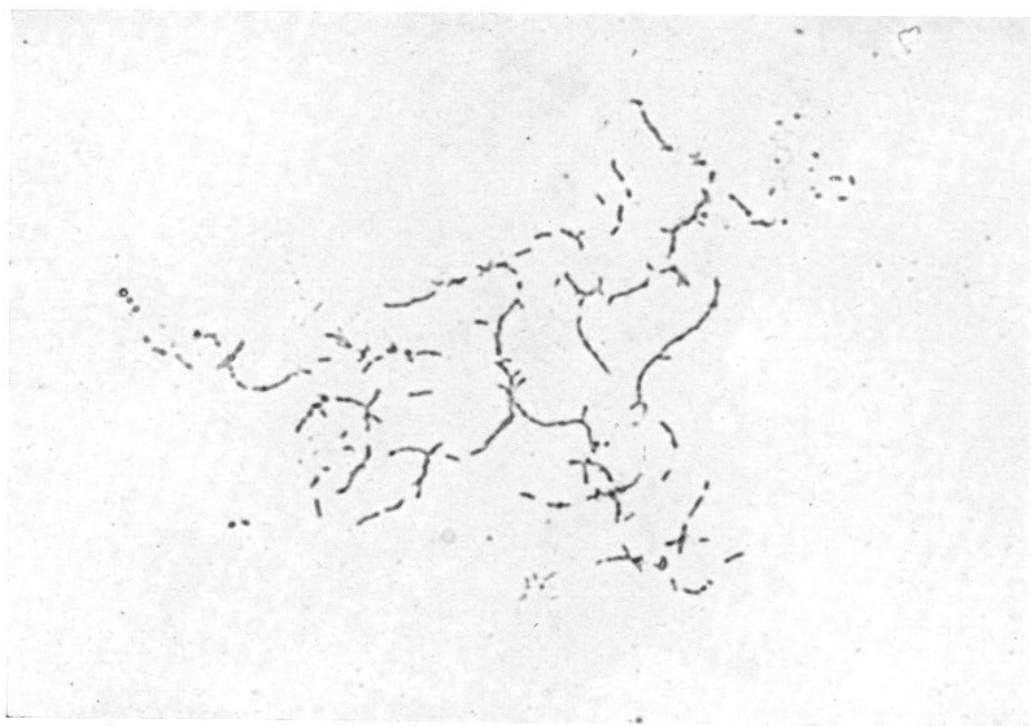


Fig. 20. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* di 24 ore (a più forte ingrandimento delle figg. 15 e 16): nell'interno dei filamenti si scorgono spazi che delimitano i singoli germi, molti dei quali presentano granuli (500 diametri).

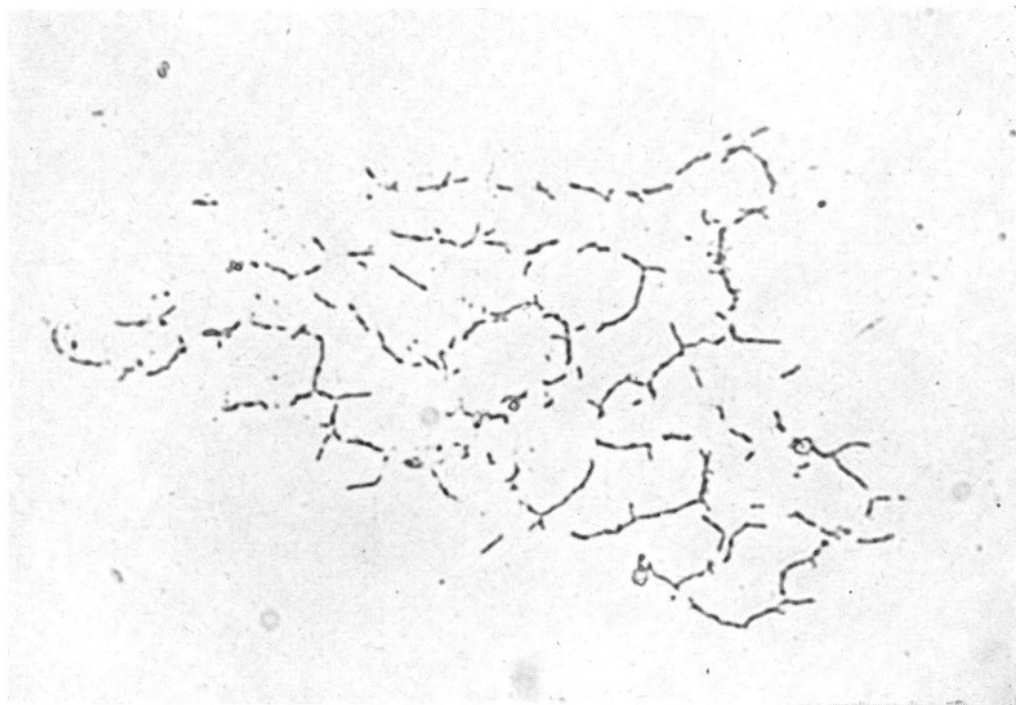


Fig. 21. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* di 24 ore (a più forte ingrandimento delle figg. 15 e 16): nell'interno dei filamenti si scorgono spazi che delimitano i singoli germi, molti dei quali presentano granuli (500 diametri).

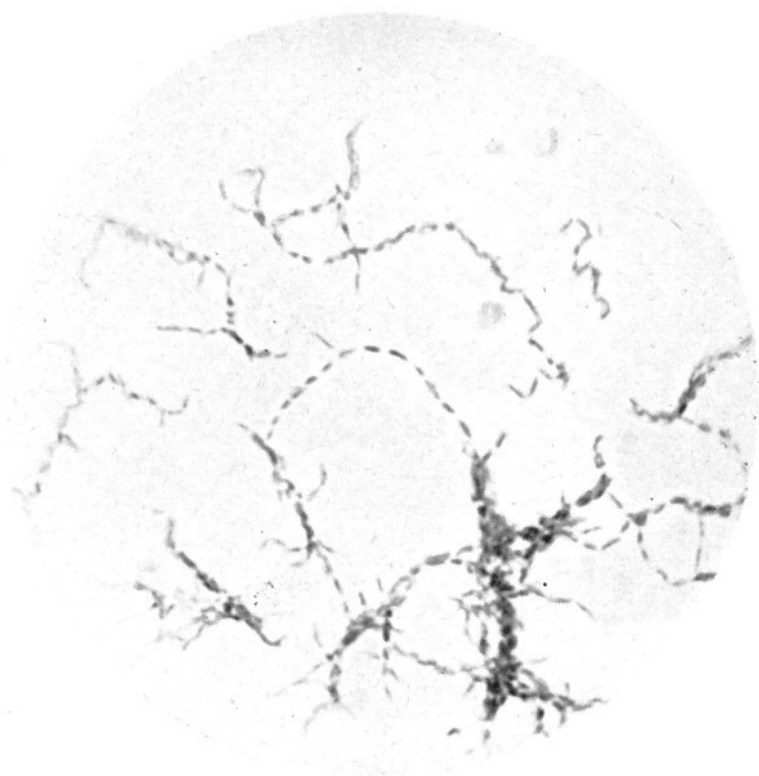


Fig. 22. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (di 24 ore) colorata col metodo di ROBINOW: nell'interno dei filamenti i singoli individui sono nettamente separati gli uni dagli altri; qua e là, alcune formazioni nucleari (1200 diametri).

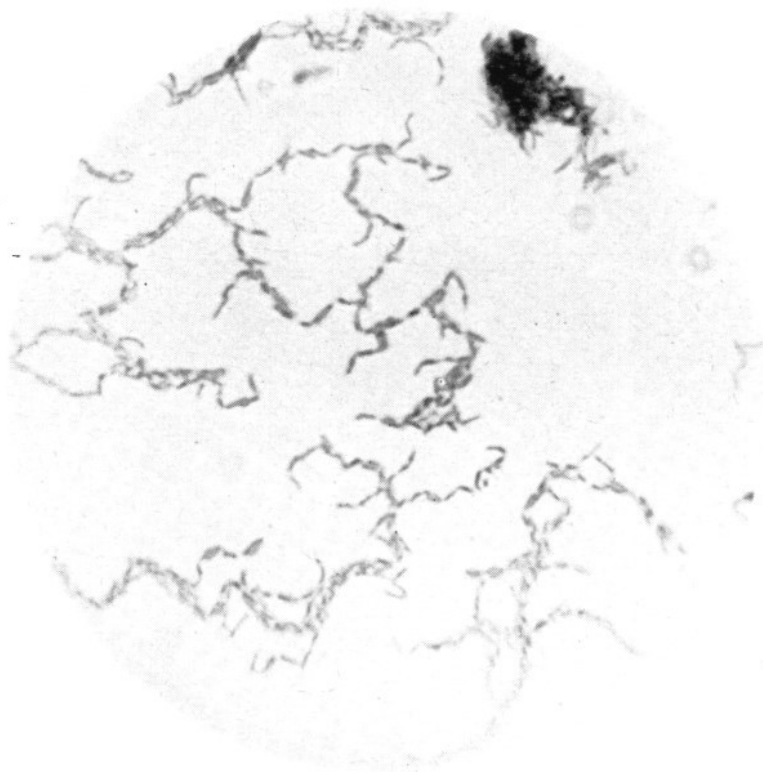


Fig. 23. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (di 24 ore) colorata col metodo di ROBINOW (1200 diametri).

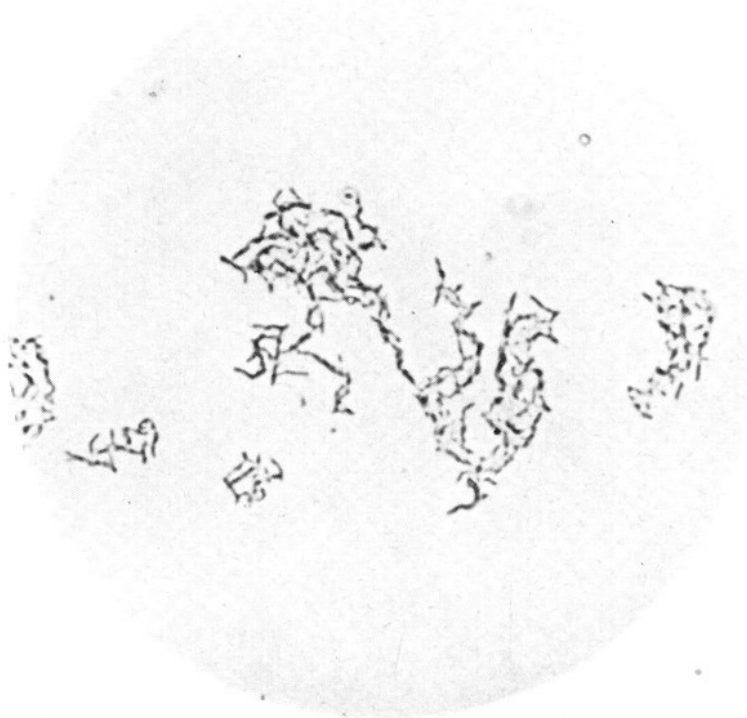


Fig. 24. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (di oltre 24 ore) colorata col metodo di ROBINOW: osservare le formazioni nucleari (480 diametri).

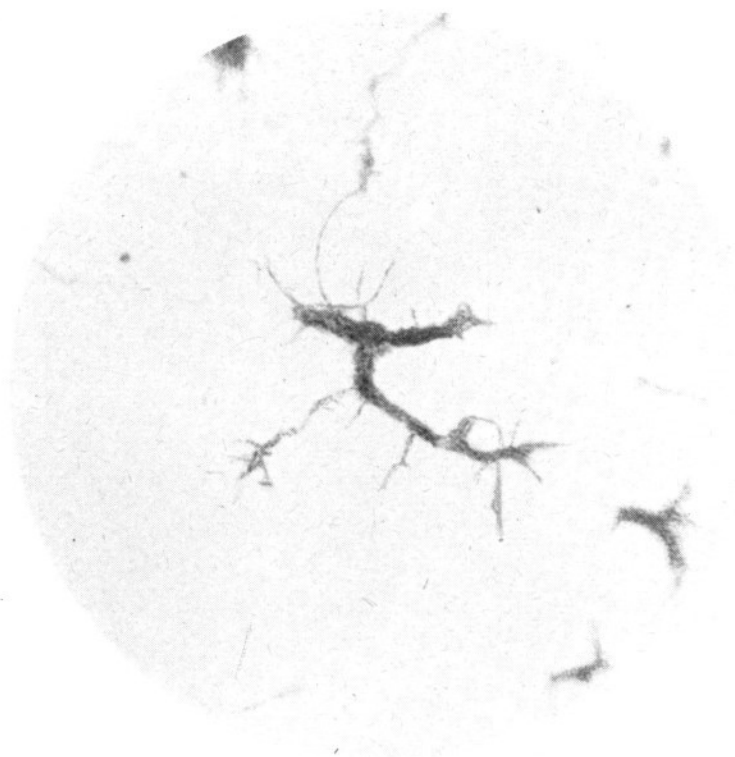


Fig. 25. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* (di 48 ore) colorata col metodo del ROBINOW: osservare le formazioni nucleari sparse nell'interno dei filamenti ispessiti (600 diametri).

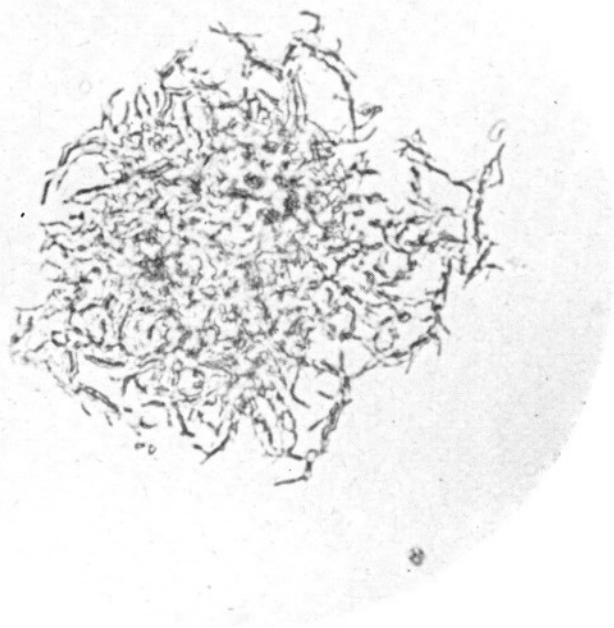


Fig. 26. - Microcoltura di *Mycobacterium phlei* colorata con il metodo del ROBINOW: le formazioni nucleari sono soprattutto presenti negli elementi periferici (380 diametri).

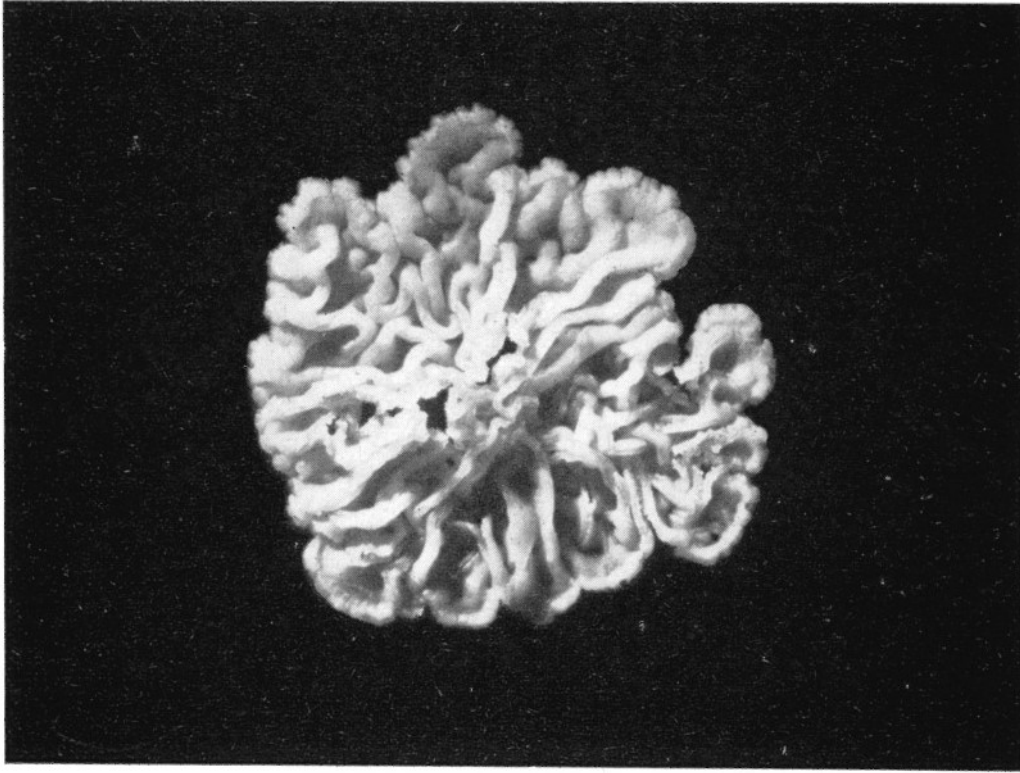


Fig. 27. - Colonia di *Mycobacterium phlei*: osservare l'andamento radiale delle pieghe e il centro elevato.

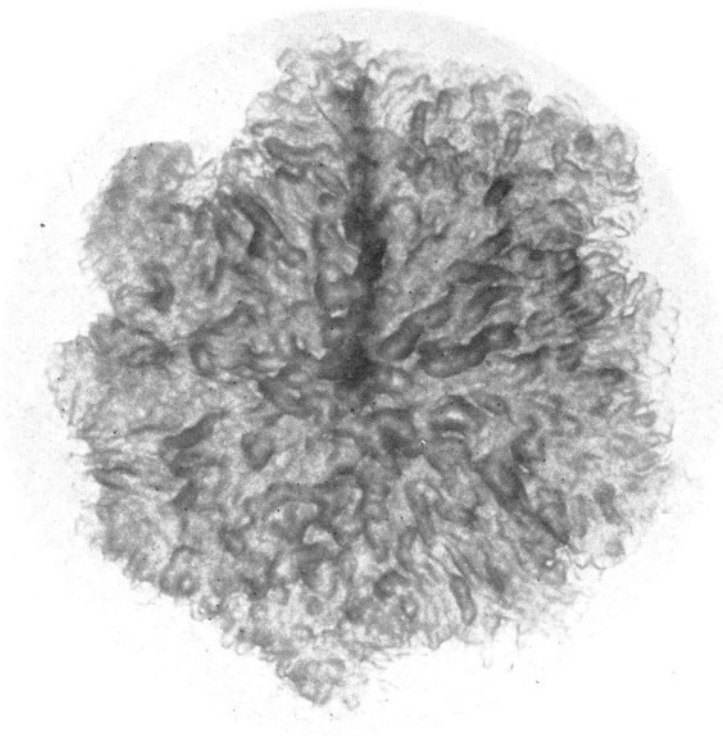


Fig. 28. - Colonia di *Mycobacterium phlei* vista al microscopio.

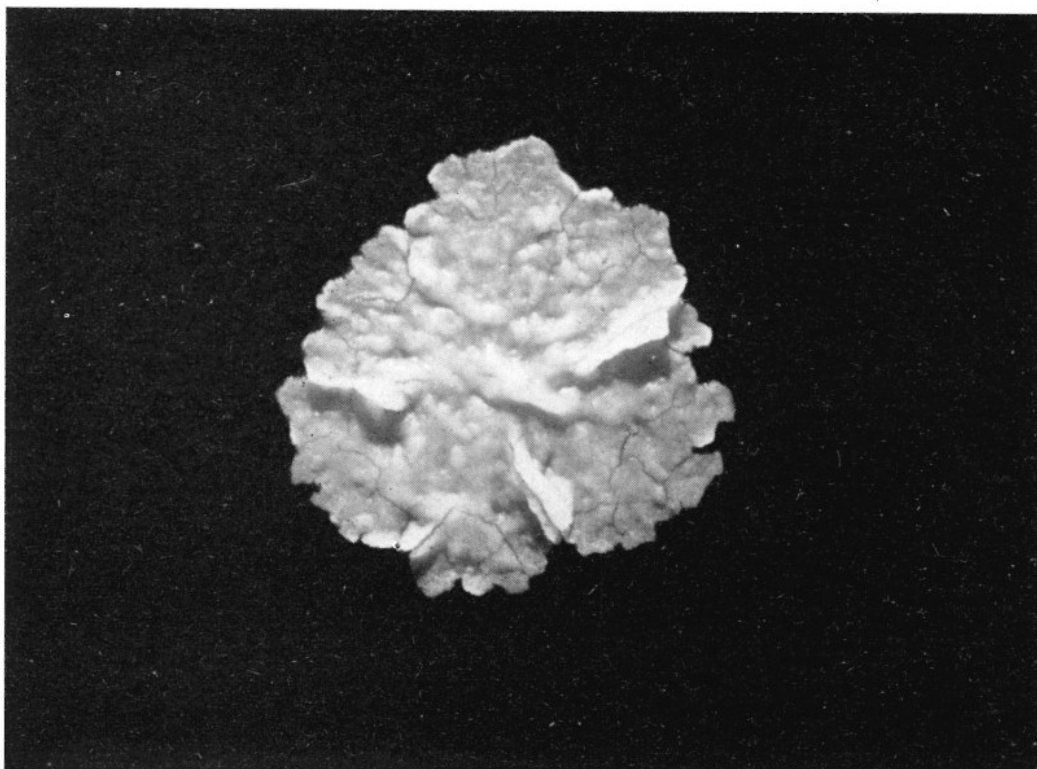


Fig. 29. - Colonia di *Mycobacterium phlei*, variante a fondo liscio.

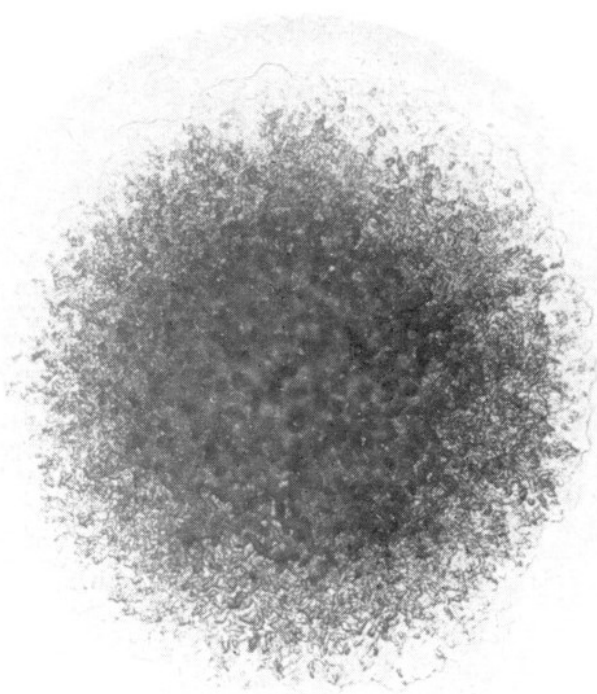


Fig. 30. - Colonia di *Mycobacterium phlei*, variante a fondo liscio osservata al microscopio: notare la fascia marginale sottilissima.

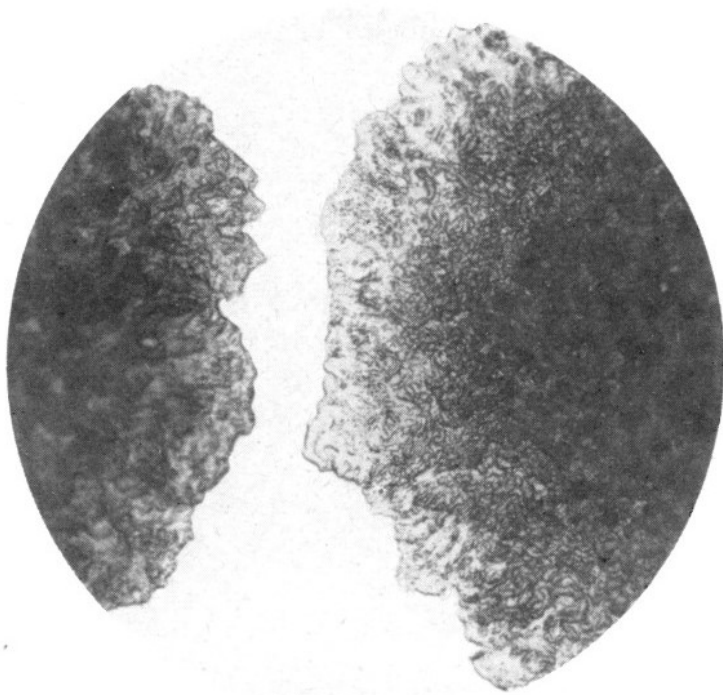


Fig. 31. - Osservazione microscopica del margine dei due differenti tipi di colonie di *Mycobacterium phlei*.



Fig. 32. - Coltura di *Mycobacterium phlei* in terreno liquido, fotografato dall'alto: osservare la compattezza del feltro.

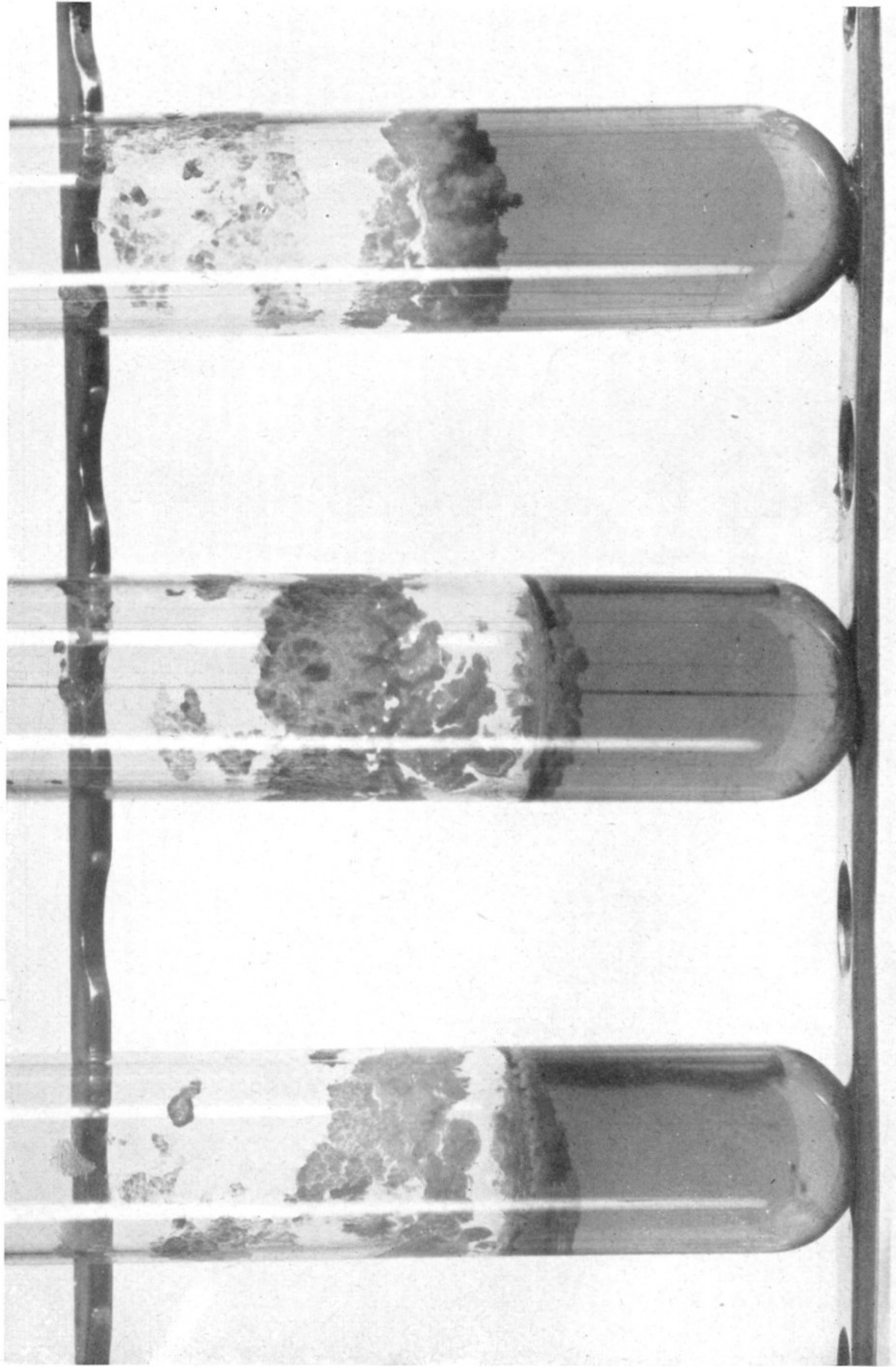


Fig. 33. - Coltura di *Mycobacterium phlei* in terreno liquido: notare come la coltura risalga lungo le pareti del recipiente rimanendovi aderente e come il brodo rimanga limpido.

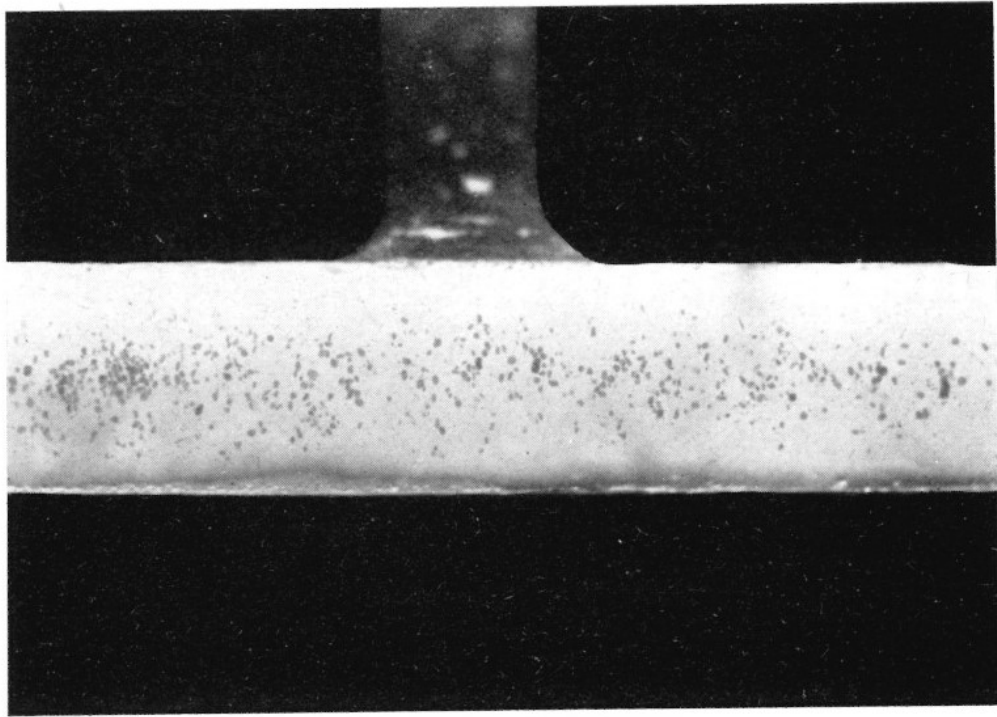


Fig. 34. - Agregati globulari di *Mycobacterium phlei* coltivato in agitazione.

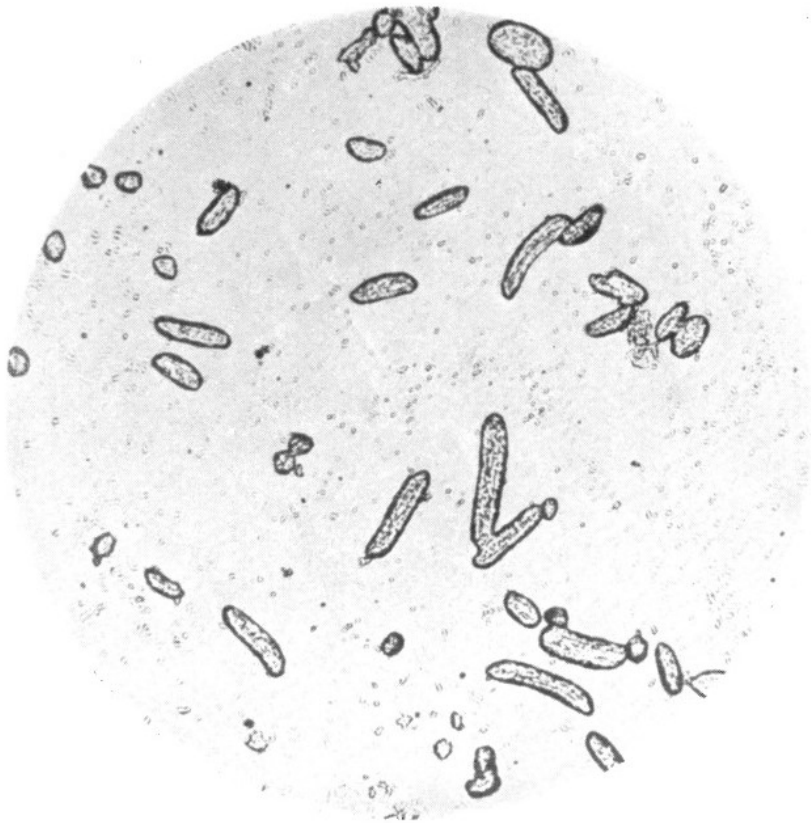


Fig. 35. - Microfotografia degli aggregati globulari; sul fondo una quantità di germi isolati (250 diametri).

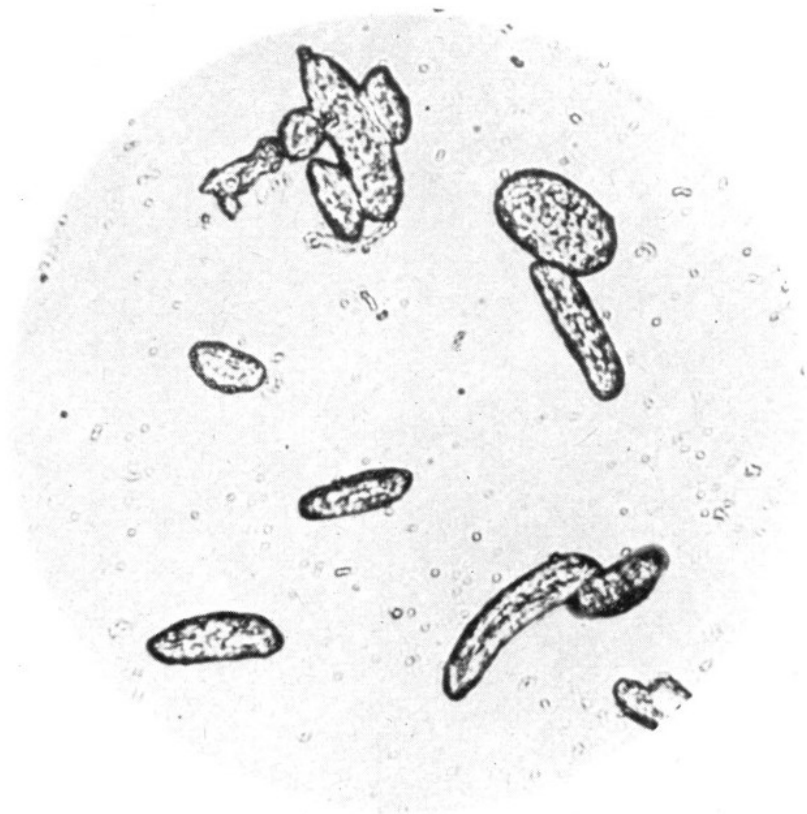


Fig. 36. - Microfotografia di una parte del campo precedente (500 diametri).

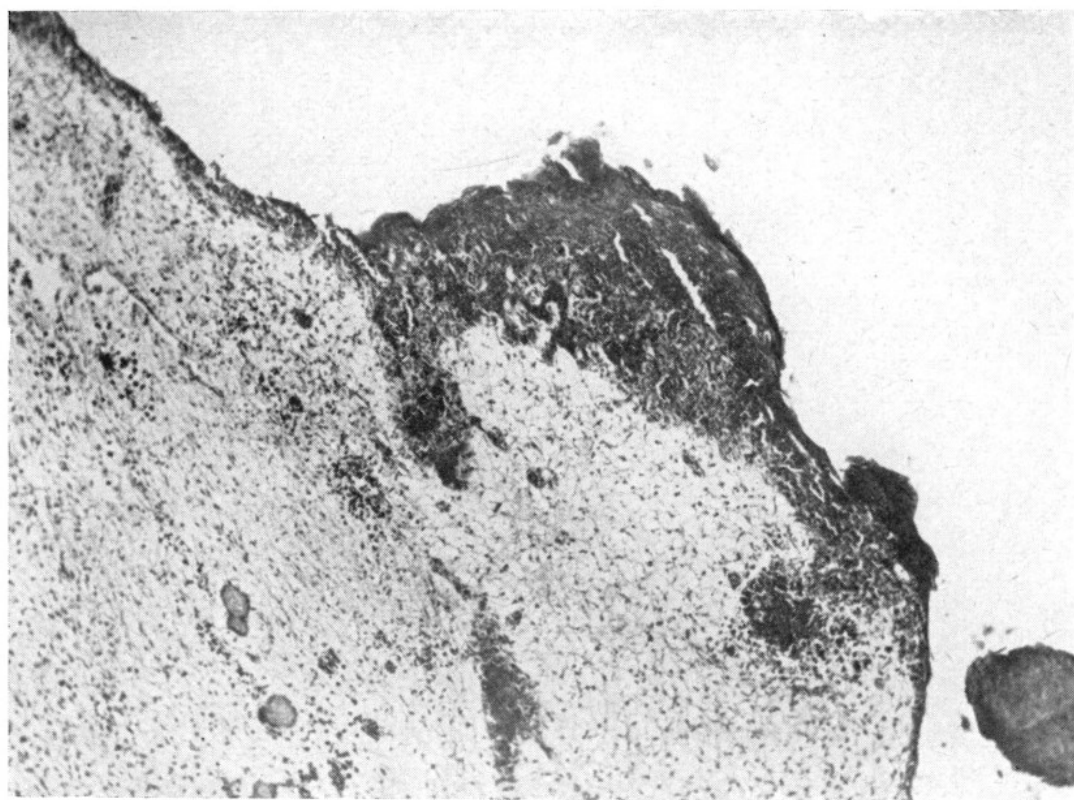


Fig. 37. - Microfotografia di una membrana corioallantoidea di embrione di pollo inseminata con *Mycobacterium phlei*: nessuna lesione sulla membrana, mentre i germi si sono intensamente moltiplicati (masse più scure).

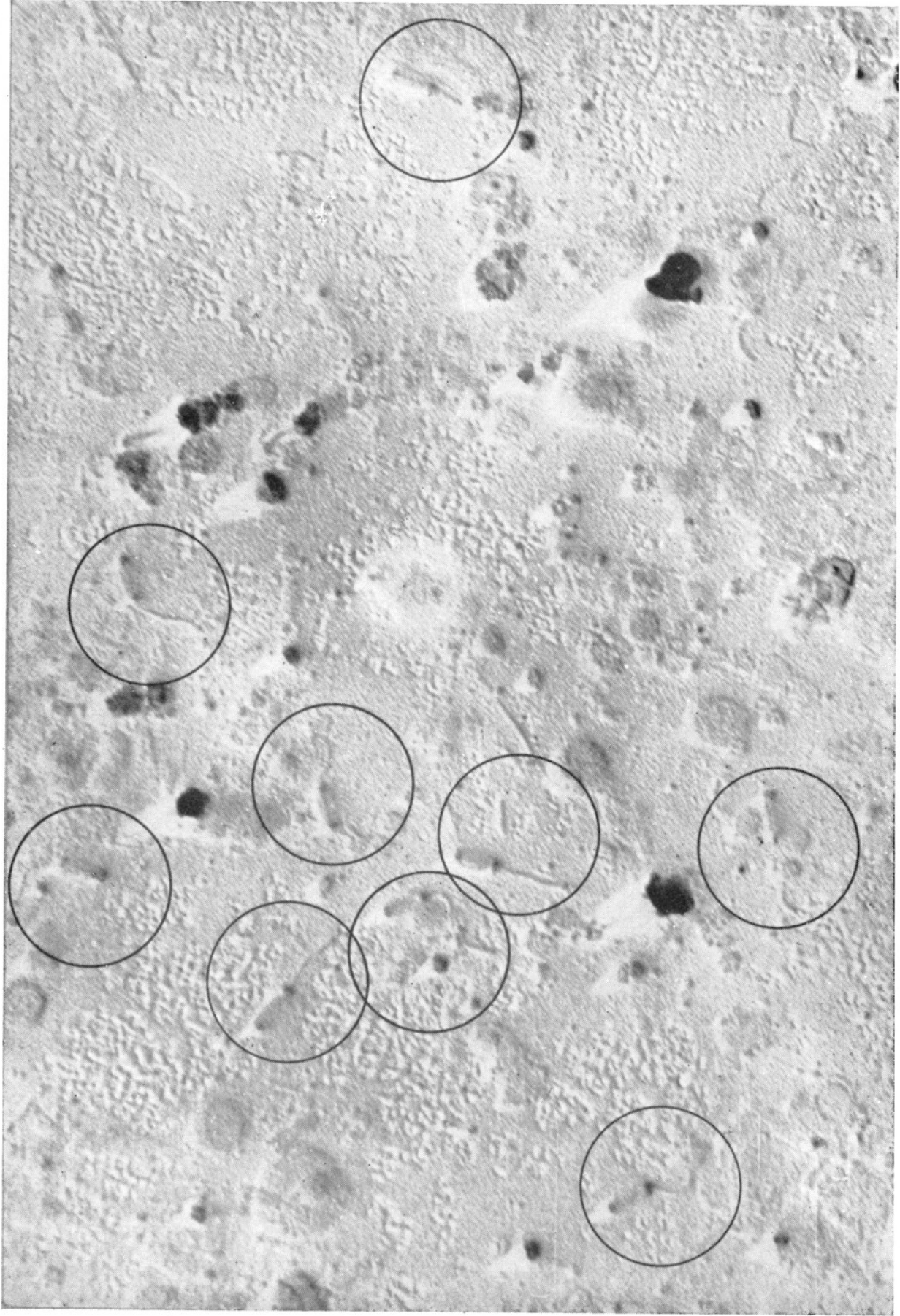


Fig. 38. - *Phagus phlei*.

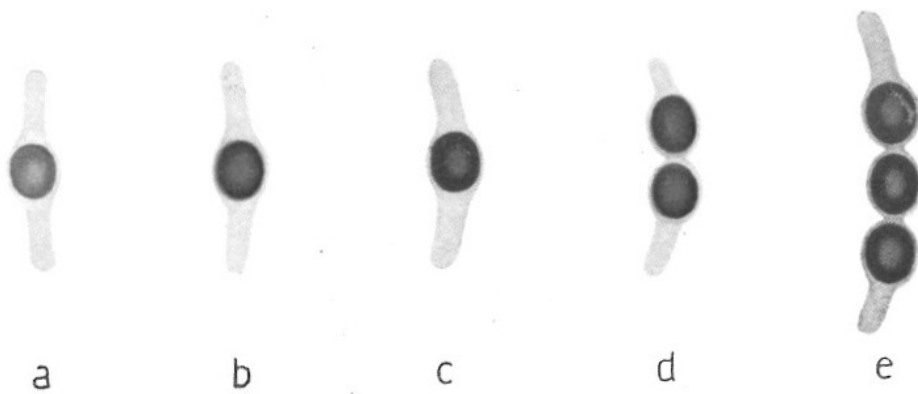


Fig. 39. - Disegno semischematico di *Mycobacterium phlei* con granulo centrale e colorato con diverse tecniche: a) colorazione di Robinow; b) colorazione di Ziehl-Neelsen; c) colorazione del Gram; d) colorazione di Ziehl-Neelsen (individuo con due granuli); e) colorazione del Gram (individuo con tre granuli).

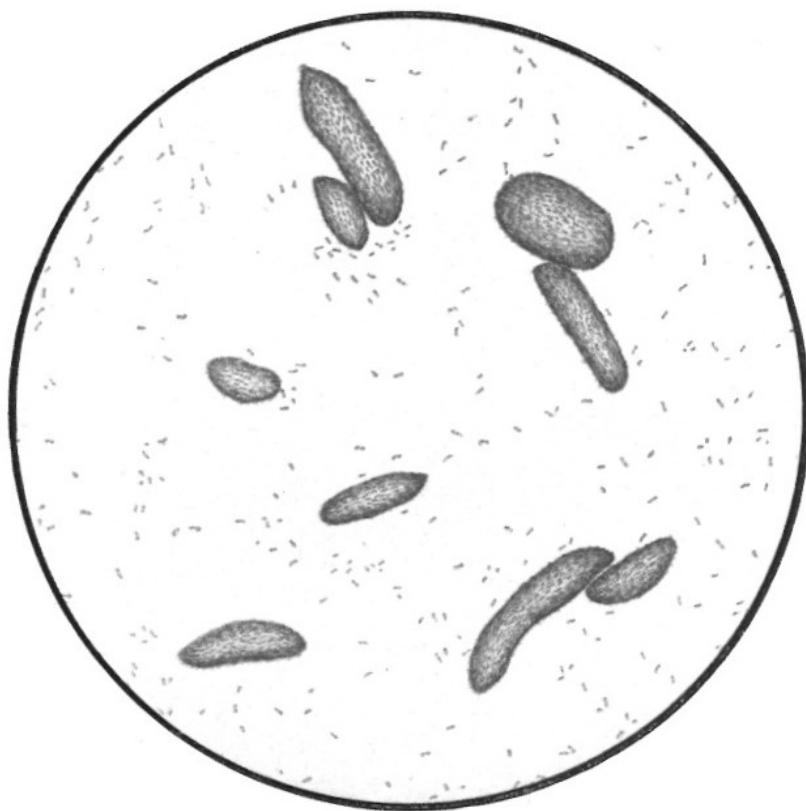


Fig. 40. - Disegno semischematico della microfotografia riportata nella fig. 36: notare gli ammassi globulari, costituiti da germi acidoresistenti e cianofili, e la miriade di germi acidoresistenti sparsi nel campo (colorazione di Ziehl-Neelsen).

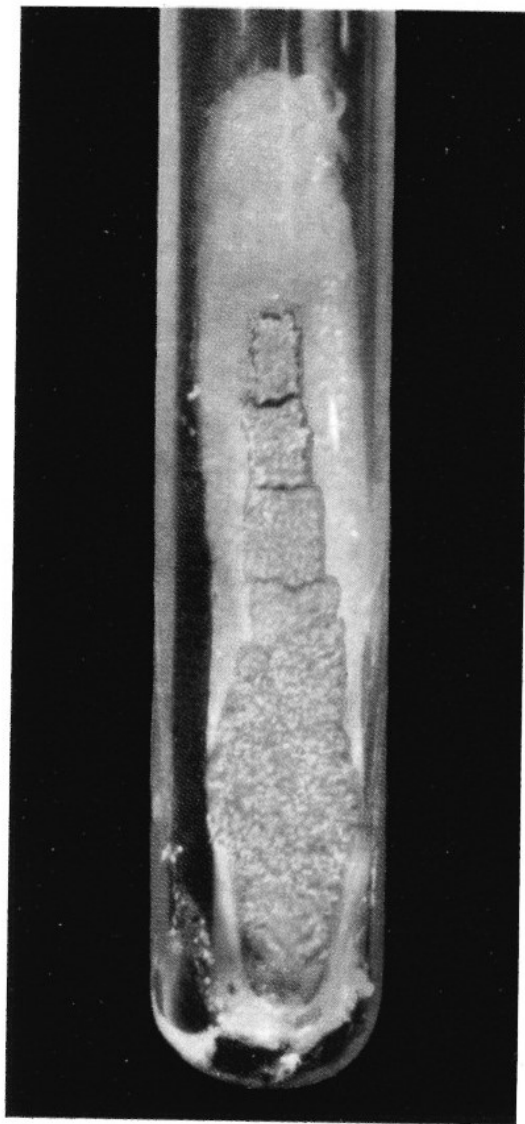
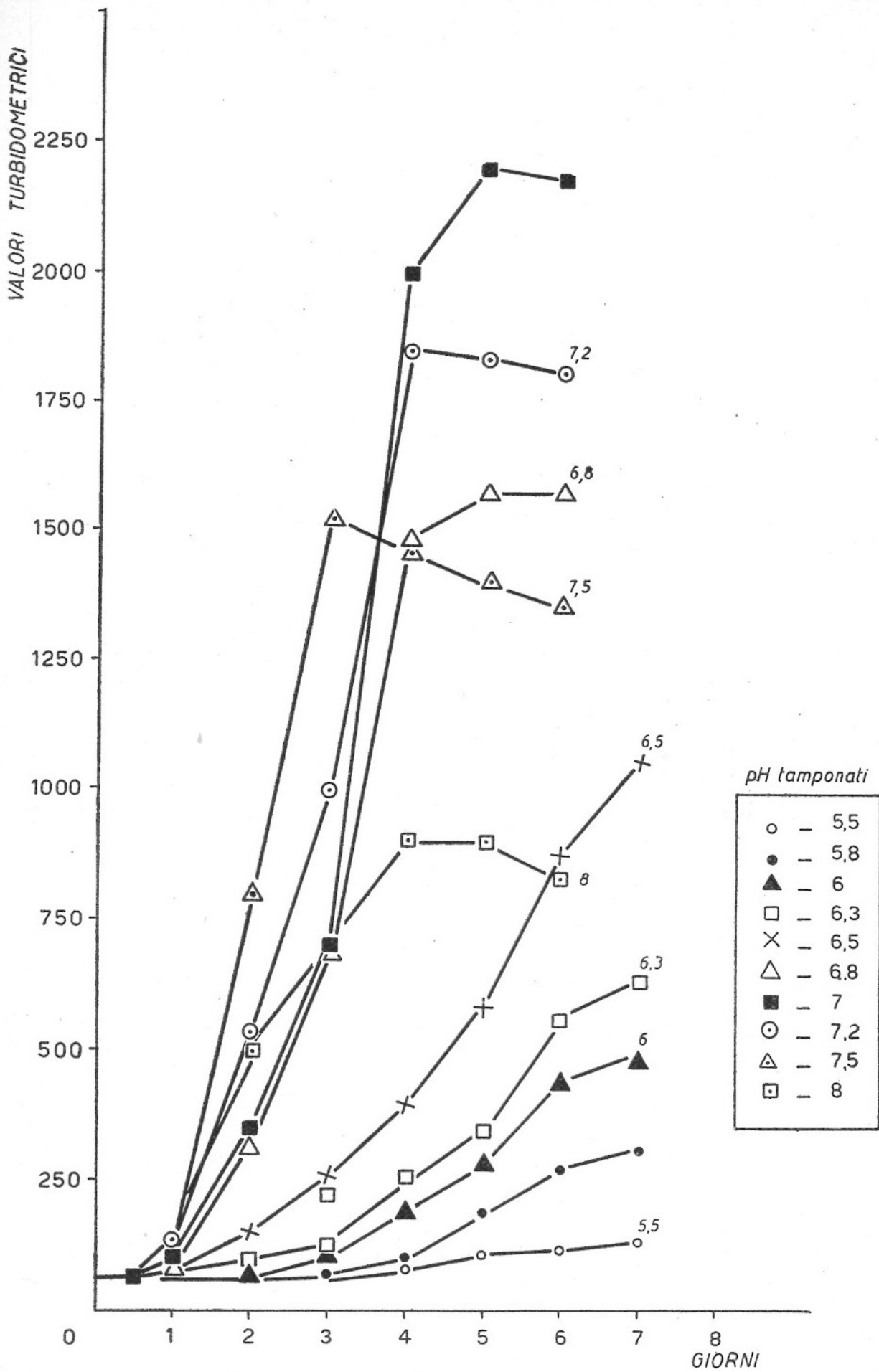


Fig. 41. - Patina di *Mycobacterium phlei* su Petraghani  
(dopo 3 mesi di permanenza a temperatura ambiente).



Graf. 4 - Curve di crescita del *Mycobacterium phlei* coltivato in brodo a pH tamponato (colture in agitazione)

Altro dato di fatto riscontrato è che in tutti i casi, la fase logaritmica si compie tra pH 7,5 e pH 8,7 - 8,9 e che la crescita si arresta — ossia si raggiunge la concentrazione *M* — allorchè il pH raggiunge il valore di 9.

Operando con terreni tamponati, si constata una lenta, graduale e scarsissima crescita con pH compresi tra 6,8 e 7,5 con un optimum per il pH 7, e di nuovo scarsa crescita con pH 8. I valori assoluti delle concentrazioni *M* che si ottengono con terreni tamponati sono sempre inferiori a quelli che si ottengono con terreni non tamponati.

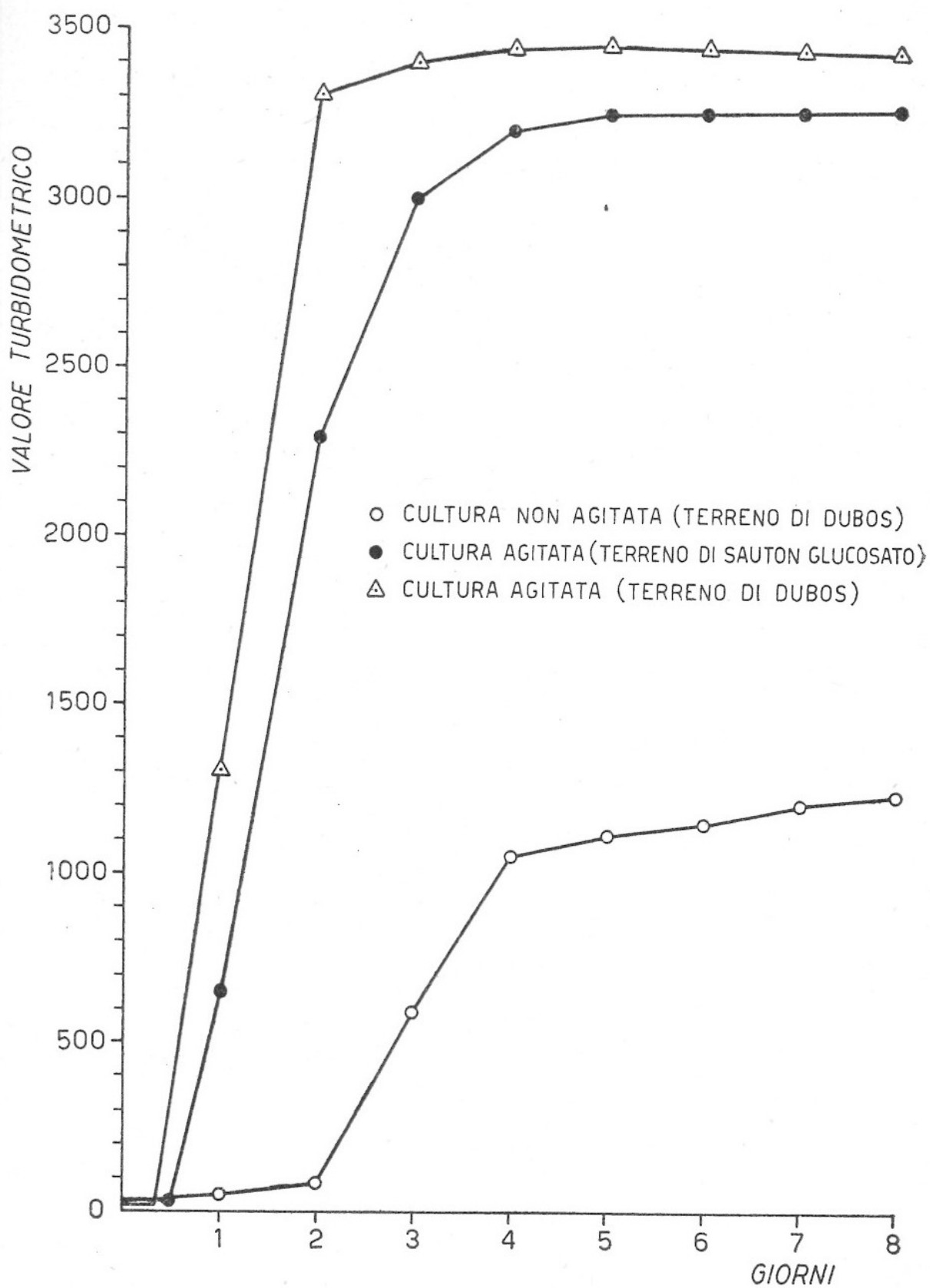
Evidentemente nella crescita del *Myc. phlei* debbono entrare in giuoco una serie di enzimi capaci di espletare la propria azione entro limiti pHmetrici ben determinati. Senza entrare nel merito dei fenomeni osservati, sui quali avremo occasione di intrattenerci altrove, ci limitiamo alla loro semplice constatazione che ci permette di rilevare come il *Myc. phlei* sia capace di vegetare in terreni il cui pH è compreso tra 5,5 e 8,5 con un optimum di pH 6 per i terreni non tamponati, di pH 7 per i terreni tamponati.

Coltivando, infine, il *Myc. phlei* in agitatore — col nostro metodo delle colture in tubi a T agitati lungo l'asse maggiore del tubo in ragione di 100 colpi al minuto —, si ottengono, con qualsiasi terreno liquido si operi, sospensioni omogenee il cui studio turbidometrico permette di stabilire come la fase di latenza sia notevolmente minore e come la *concentrazione M* *raggiungibile* sia circa tre volte superiore a quella ottenibile senza agitazione su terreno di Dubos. Con questa tecnica di coltura, scarsa differenza esiste tra le curve ottenibili coltivando in agitazione il *Myc. phlei* su terreno di Sauton o su terreno di Dubos (grafico 5). Tale tipo di esperienza ci dice quale importanza abbia l'areazione per lo sviluppo del *Myc. phlei*.

## 11) PIGMENTO.

Il *Myc. phlei* dà origine a un pigmento di tonalità gialla, che aumenta **via** via con l'invecchiare delle colture: le colture giovanissime sono apigmentate; in due o tre giorni però esse assumono un colore giallo torlo d'uovo cotto, che si intensifica sino al giallo arancione. I veli su terreni liquidi si comportano analogamente.

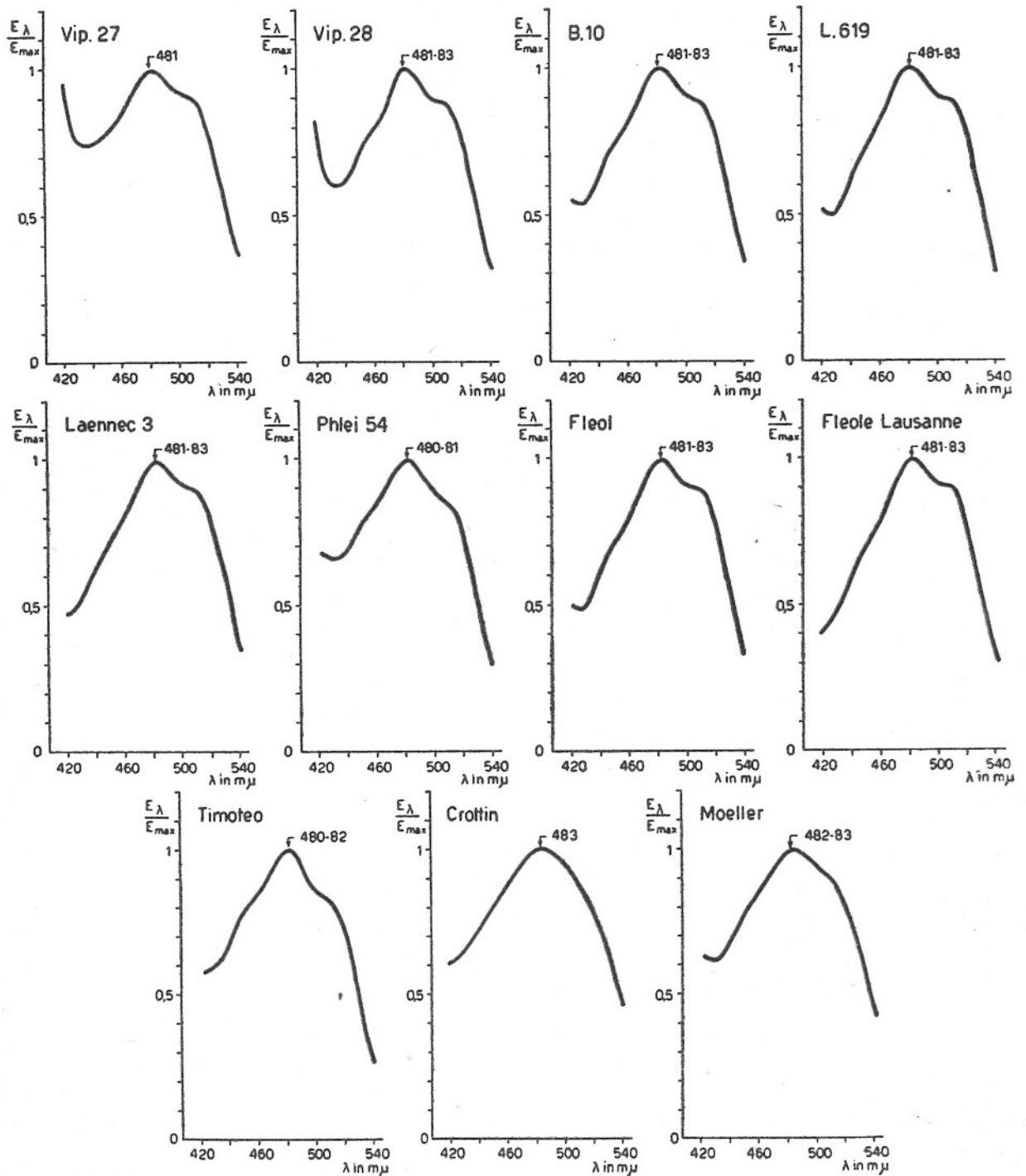
L'intensità del colore varia leggermente col variare del terreno di coltura. Su terreni sintetici (Sauton, Lutz, Merrill) si ha pigmentazione leggera e delicata; su terreni biologici, particolarmente all'uovo, si ha pigmentazione intensa. Su patata, anche glicerinata, si ha scarsa produzione di pigmento.



Graf. 5 - Curve di crescita del *Mycobacterium phlei* coltivato in agitazione e in quiete

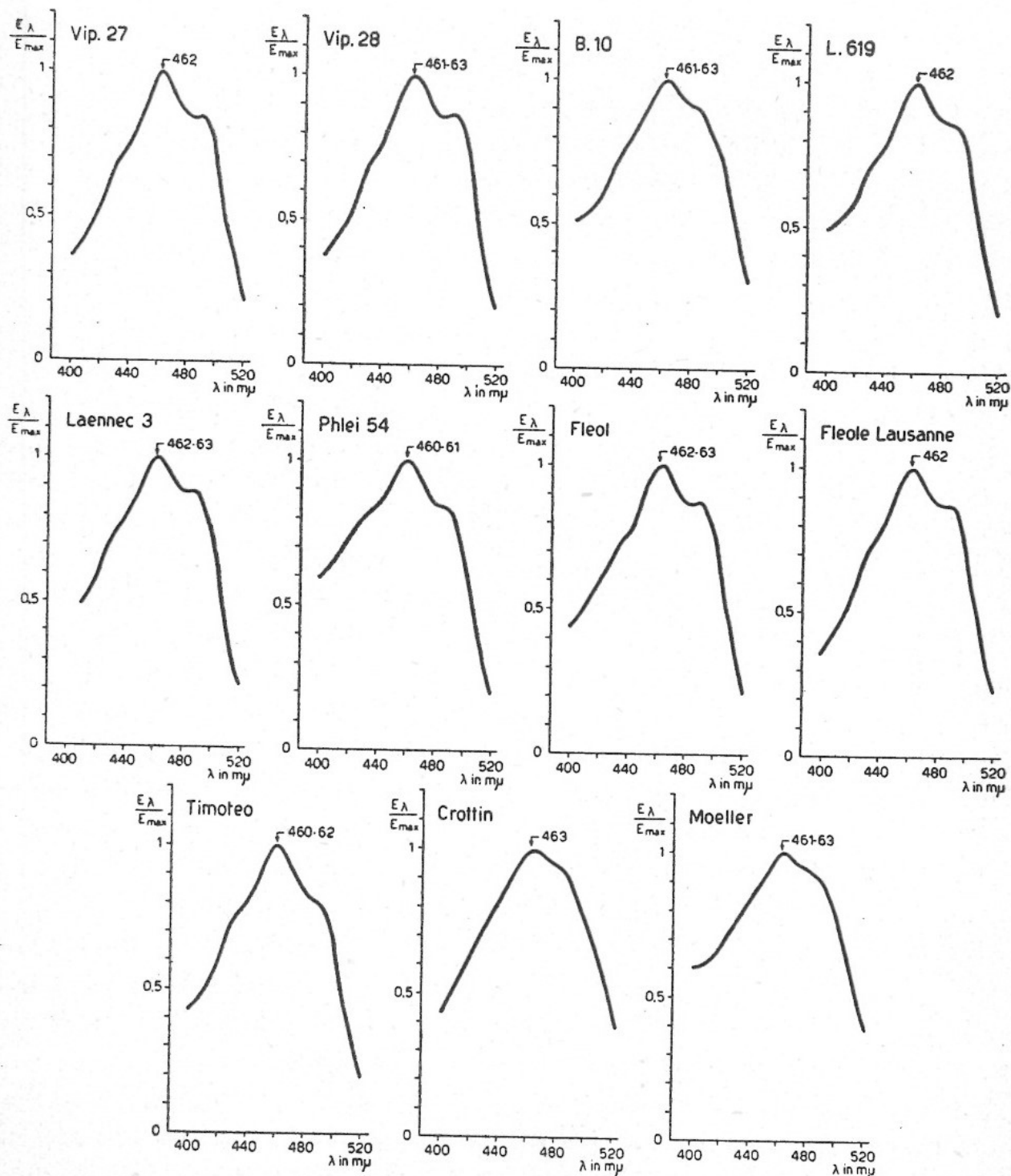
Il pigmento del *Myc. phlei* è solubile in etere, cloroformio, benzolo, solfuro di carbonio, alcool e acetone e dà positiva la prova lipocianica: colorazione azzurra con acido solforico concentrato. Non è solubile in acqua. Si tratta, quindi, di carotenoidi. Ciò è confermato dall'analisi spettrofotometrica, da cui risultano curve d'assorbimento tipiche dei carotenoidi.

Per una prima analisi orientativa, le colture, cresciute per 5 giorni in brodo normale a 37° C. vennero filtrate e lavate ripetutamente con acqua; il materiale così liberato dal terreno di coltura fu disidratato



Graf. 6 - Spettri d'assorbimento dell'estratto totale dei vari ceppi di *Mycobacterium phlei* (in solfuro di carbonio)

con solfato di sodio, triturato con sabbia di quarzo ed estratto, a freddo, con solfuro di carbonio o con cloroformio. Centrifugando, ed eventualmente filtrando, si ottennero soluzioni che, disidratate e diluite convenientemente, si sottoposero alla misura spettrofotometrica, servendosi dello spettrofotometro di Beckman Mod. D.U. Le curve ottenute, riportate tutte allo stesso valore dell'estinzione massima, sono riunite nel grafico 6, per le soluzioni in solfuro di carbonio, e nel grafico 7, per le soluzioni cloroformiche. Come si vede, si ha, per le soluzioni in solfuro di carbonio,



Graf. 7 - Spettri d'assorbimento dell'estratto totale dei vari ceppi di *Mycobacterium phlei* (in cloroformio)

un massimo a 480-483  $\mu$ . e due bande più o meno pronunciate a 450-460 e 500-510  $\mu$ ; per le soluzioni in cloroformio si ha invece un massimo a 460-463 e due bande secondarie a 430-440 e 480-490  $\mu$ . La forma delle curve è praticamente la stessa per tutte, salvo quelle del Crottin e del Moeller, in cui sono meno evidenti le bande laterali.

Per stabilire la natura dei singoli carotenoidi presenti, abbiamo proceduto, su tutti gli undici ceppi, alla separazione cromatografica. Per ogni ceppo, il contenuto di 100 Roux è stato seccato in corrente d'aria a 40° e poi su anidride fosforica sotto vuoto. Il residuo secco (circa 100 g) è stato polverizzato in mortaio e lasciato per 24 ore a 0° con 500 cm<sup>3</sup> di acetone, agitando ogni tanto. Si è poi filtrato e si è lavato il residuo con un po' di acetone. L'estratto acetoneico è stato concentrato a 40° C. a pressione ridotta fino a consistenza oleosa. Il residuo è stato sciolto in 15 cm<sup>3</sup> di benzolo e la soluzione è stata lasciata due ore a 0°C. Si è filtrato e si è aggiunto alla soluzione egual volume di KOH metanolica al 10%. Dopo 24 ore di permanenza a temperatura ambiente, al buio, si è estratta la soluzione con 200 cm<sup>3</sup> di benzina (p.e. 70°-85°). Messa da parte la soluzione alcalina, colorata in rosso aranciato, l'estratto benzinico è stato lavato con acqua fino a reazione neutra e poi con metanolo a 95° (usando metanolo a 90° l'ipofase restava incolore). La soluzione metanolica si colorava debolmente in giallo, ma continuava ad estrarre un po' di colore anche usandone ripetutamente nuove porzioni; d'altro canto, agitando l'estratto metanolico con benzina, questa si colorava in giallo. Si tratta quindi di un carotenoide che si ripartisce egualmente, o quasi, fra benzina e metanolo a 95°. La criptoxantina, che Ingraham e Steenbock (1945) hanno trovato nel *Myc. phlei*, è ipofasica con metanolo a 95° e si ripartisce egualmente con metanolo a 90°. Lo spettro di assorbimento di questa frazione non aveva aspetto tipico, probabilmente per la presenza di parecchie sostanze estranee. Cromatografando questa soluzione, in benzina o etere di petrolio, su idrato di calcio, abbiamo ottenuto un anello violaceo alla sommità della colonna. Dopo eluizione con cloroformio, si aveva ancora una soluzione con spettro poco caratteristico.

Il liquido epifasico, contenente la maggior parte dei carotenoidi, è stato lavato con acqua, disidratato con solfato di sodio, evaporato sotto vuoto, ripreso con etere di petrolio (p.e. 40°-70°) e cromatografato su idrato di calcio: si forma un anello viola alla sommità della colonna, poi una banda arancione piuttosto ampia (che talora sembra duplice), e infine una più modesta banda gialla. Il pigmento giallo può facilmente eluirsi lavando la colonna con etere di petrolio; per gli altri due, è più conveniente separarli meccanicamente e scioglierli poi in alcool etilico o cloroformio. Si possono anche eluire con etere di petrolio addizionato di un po' d'alcool etilico o me-

tilico. Di tutti e tre i pigmenti abbiamo misurato gli spettri d'assorbimento nei diversi solventi; questi spettri (grafico 8) sono molto simili fra loro e coincidono praticamente con quelli dell'estratto totale di cui già si è parlato.

La differenza di colore fra i tre pigmenti, visibile anche ad occhio nudo, è da porsi in relazione più con la diversa intensità d'assorbimento in zone dello spettro lontane dai massimi che con una differente posizione dei massimi stessi; questi, infatti, si discostano l'uno dall'altro non più di 4-5  $m\mu$ . Abbiamo trovato i valori elencati nella tabella I.

TABELLA I

Solvente	Massimo principale	Bande laterali	
Cloroformio . . . . .	457-462 $m\mu$	430-440 $m\mu$	480-490 $m\mu$
Solfuro di carbonio . . . . .	477-481 $m\mu$	450-460 $m\mu$	500-510 $m\mu$
Etere di petrolio . . . . .	446-450 $m\mu$	425-435 $m\mu$	465-475 $m\mu$
Alcool etilico a 95° . . . . .	449-453 $m\mu$	425-435 $m\mu$	470-480 $m\mu$

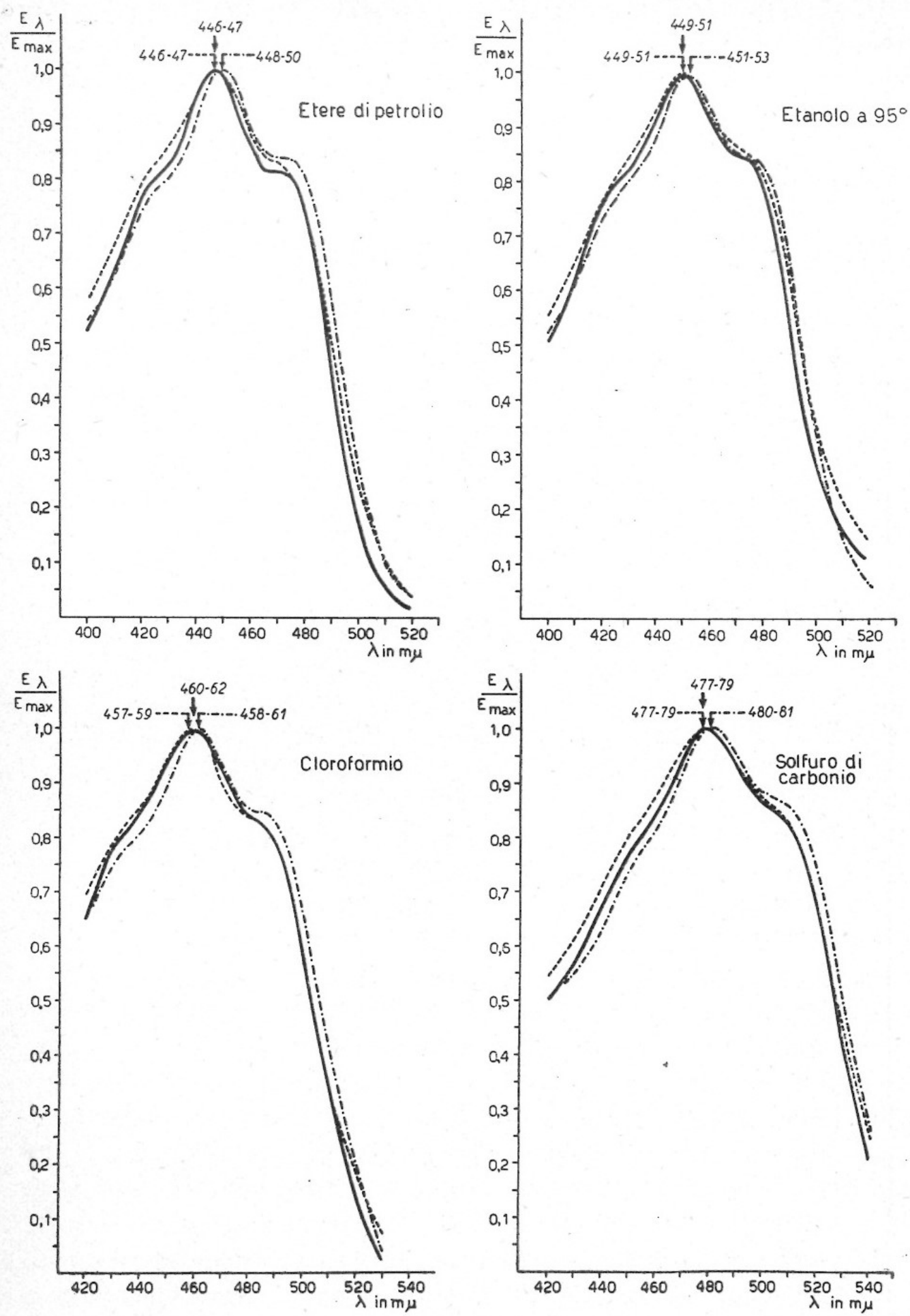
Il risultato è stato lo stesso per tutti gli undici ceppi, compresi il Crottin e il Moeller, variando soltanto un po' per le quantità relative.

In base alla posizione nel cromatogramma ed agli spettri d'assorbimento si può concludere che il carotenoide principale (banda arancione) è costituito da leprotina. Questa è stata scambiata da alcuni A.A. per  $\beta$ -carotene, ma differisce da esso perchè è trattenuta un po' più fortemente nella colonna cromatografica; facendo un cromatogramma misto, abbiamo infatti ottenuto, per  $\beta$ -carotene, un anello posto un po' al di sotto.

Il pigmento giallo è costituito da  $\alpha$ -carotene, come dimostrato dalla posizione nel cromatogramma e dallo spettro d'assorbimento.

Più difficile è l'individuazione dell'anello violaceo: potrebbe trattarsi di un epossido o di un isomero della stessa leprotina; con un estratto greggio di questo carotenoide, infatti, Takeda e Ohta, (1935) hanno ottenute due bande. E' da notare, ad ogni modo, che, ricromatografando separatamente le tre bande, ognuna mantiene la sua posizione.

Oltre a questi carotenoidi presenti nell'insaponificabile, abbiamo preso in esame il liquido alcalino di colore rosso-aranciato, restato dopo l'estrazione con benzina. Questo liquido è stato estratto ripetutamente con benzina finchè questa non si colorava più in giallo. La soluzione residua, agitata con etere etilico, gli cede parte del suo colore; la soluzione eterea

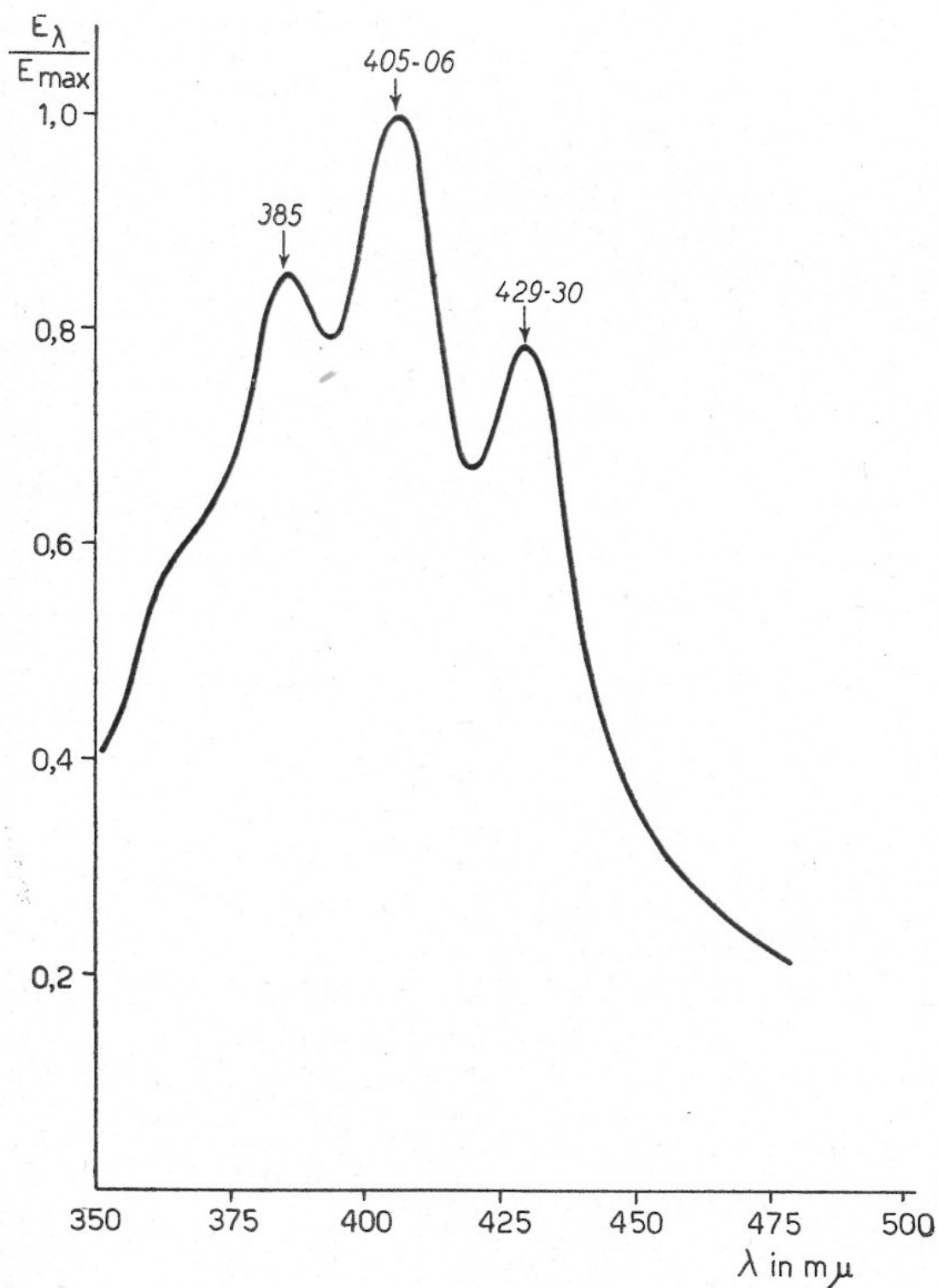


Graf. 8 - Spettri d'assorbimento dei tre pigmenti contenuti nell'epifase dell'estratto benzinico, dopo saponificazione: banda viola (tratteggiata), banda arancione (a tratti e punti), banda gialla (linea continua)

così ottenuta, lavata con acqua e disidratata, mostra uno spettro di assorbimento con tre netti massimi: a 385, a 405-406 e a 429-430  $m\mu$  (grafico 9)

Lo stesso spettro si ha acidificando con acido acetico il liquido alcalino (che vira così al giallo-oro) ed estraendolo con etere di petrolio.

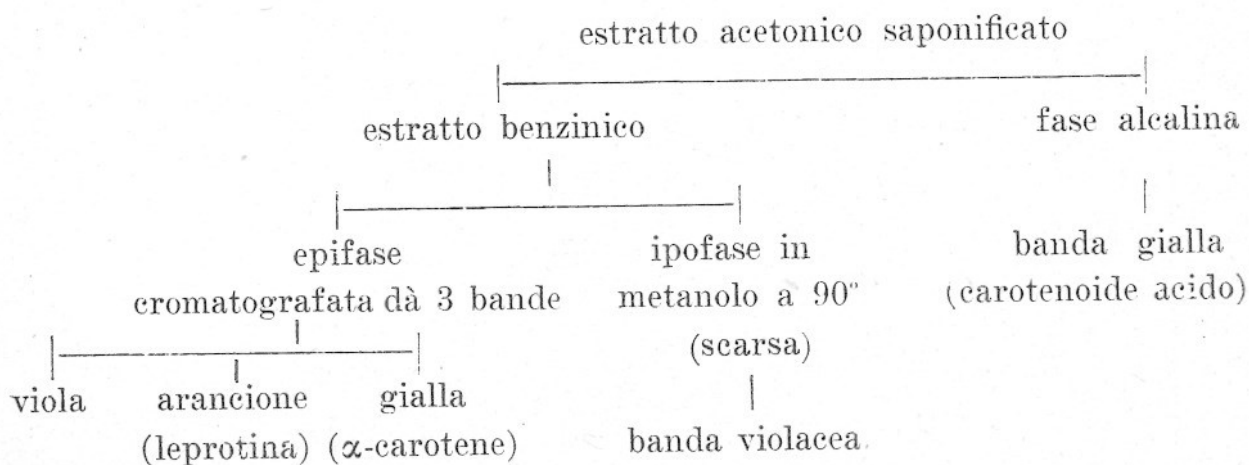
La soluzione petrol-eterea, cromatografata su idrato di calcio, dà un anello giallo nella parte superiore della colonna; eluendo con cloroformio



Graf. 9 - Estratto etereo del liquido alcalino già esaurito con benzina: spettro in etere

si ha una soluzione con massimi d'assorbimento a 390, 415 e 440  $m\mu$ , esattamente come la soluzione che si ha riprendendo con cloroformio l'estratto etero non cromatografato. Si tratterebbe, quindi, di un pigmento a carattere acido, il cui sale di potassio è solubile in etere, ma insolubile in benzina. Un pigmento analogo è stato trovato da Turian (1950) su un ceppo non specificato di *Myc. phlei*; lo spettro d'assorbimento mostra però solo un massimo a 452  $m\mu$  (in etere di petrolio).

Per maggior chiarezza, riepiloghiamo schematicamente i risultati da noi ottenuti:



Queste nostre ricerche sui carotenoidi mostrano che anche il pigmento è un carattere distintivo della specie *Myc. phlei*; a riprova di ciò possiamo dire che il già ricordato *Myc. phlei* 525 si comporta diversamente anche per quanto riguarda il pigmento; questo infatti è molto scarso e, facendo l'estrazione cloroformica « in toto », come per gli altri ceppi, non mostra spettro di assorbimento caratteristico.

## 12) ATTIVITA' BIOCHIMICHE

Il *Myc. phlei* non fluidifica la gelatina. Coltivato su gelatina fluida, a 37°C., cresce in superficie in cinque o sei giorni; abbassando la temperatura, la gelatina solidifica in toto. Anche la prova di Frazier, è riuscita negativa.

Il *Myc. phlei* riduce i nitrati a nitriti; non produce indolo (terreno al triptofano).

Su agar sangue dà emolisi.

Il latte non viene coagulato.

Il *Myc. phlei* è un germe eterotrofo non esigente; esso è capace, infatti, di vegetare su terreni sintetici in cui la sorgente del carbonio è organica e



quella dell'azoto inorganica. Questa particolarità ci ha permesso di studiare facilmente l'utilizzazione dei composti carbonati da parte del germe in questione. Abbiamo utilizzato allo scopo il seguente terreno:

solfo di ammonio g 0,5

fosfato monopotassico g. 0,1

solfo di magnesio g 0,05

agar, lavato e purificato attraverso multiple congelazioni e decongelazioni frazionate, g 2

acqua b<sup>2</sup>distillata g 100.

Con questo terreno, privo di sorgente di carbonio, preparavamo un agargermi che lasciavamo solidificare a becco di clarino entro un provettone. Subito dopo vi aggiungevamo, a mo' d'acqua di condensazione, mezzo cm<sup>3</sup> di una soluzione all'1% dello zucchero da saggiare, soluzione filtrata per Seitz.

Se il germe in esame era capace di utilizzare la fonte di carbonio somministratagli, cresceva, altrimenti l'agar non presentava sviluppo alcuno.

Abbiamo preferito questo metodo su terreno solido, perchè abbiamo constatato essere più vantaggioso e di più facile lettura che non quello sui terreni liquidi. In ogni modo il risultato delle nostre ricerche è stato del tutto analogo sia utilizzando terreni liquidi che terreni solidi e ci ha dato i risultati che qui appresso riassumiamo.

Tutti gli undici ceppi di *Myc. phlei* da noi utilizzati sono capaci di utilizzare come fonte di carbonio i seguenti composti: alcool amilico, alcool butilico, alcool etilico, adonitolo, eritritolo, glicerolo, mannitolo, sorbitolo, arabinosio, xilosio, galattosio, glicosio, levulosio, mannosio e trealosio.

Non sono capaci, invece di utilizzare i seguenti composti: acetone, alcool metilico, dulcitololo, inositolo, arbutina, esculina, salicina, ramnosio, sorbosio, lattosio, maltosio, saccarosio, destrina, inulina, raffiniosio.

Riassumiamo questi dati nella tabella II.

### 13) FAGOSENSIBILITA'

Come già descritto in precedenti lavori (Ortali 1948, Penso e Ortali 1948, Ortali e Penso 1949, Penso e Ortali 1949), noi abbiamo più volte avuto l'occasione di isolare dal terreno parecchi ceppi di uno stesso fago attivo sul *Mycobacterium phlei*, fago da noi denominato *Phagus phlei* (P. e O. 1948), e (P. e O. 1948), e per la cui completa conoscenza rinviamo alle precedenti note.

Tale fago (fig. 37) venne isolato sul ceppo Timoteo, e dava placche

SENSIBILITÀ DEI DIVERSI CEPPI DI *Mycobacterium phlei*  
AL *Phagus phlei*

Ceppo di <i>Myc. phlei</i>	Diluizione della sospensione fagica						
	1: 10	1: 10 <sup>2</sup>	1: 10 <sup>3</sup>	1: 10 <sup>4</sup>	1: 10 <sup>5</sup>	1: 10 <sup>6</sup>	1: 10 <sup>7</sup>
B 10	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pls	+ Pl	—
Cr 5	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pls	+ Pl	—
Flei 54	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pls	+ Pl	—
Fleol	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pls	+ Pls	—
Fléole	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pl	+ Pl	—
Laennec 3	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pl	+ Pl	—
L 619	Lc	Lc	Lc	Lc	+ + Pl	+ Pl	—
Moeller	Lc	Lc	Lc	+++ Pl	++ Pl	—	—
Timoteo	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pln	+ Pln	—
Vip 27	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pl	+ Pl	—
Vip 28	Lc	Lc	Lc	Lc	++ Pl	+ Pl	—

Lc = lisi confluyente

+++ = da 20 a 100 placche

++ = da 10 a 20 placche

+ = da 1 a 10 placche

— = neg.

Pl = placche larghe

Pln = placche larghe e placche normali

Pls = placche larghe e placche appena visibili a occhio nudo

di lisi sugli undici ceppi elencati nel paragrafo 6 del presente lavoro. Tale proprietà rimaneva immutata variando il ceppo di preparazione del fago, tuttavia noi scegliemmo come ceppo preparatore il Timoteo e a tale tipo di preparazione si riferiscono i nostri dati.

Noi abbiamo oramai saggiato il *Phagus phlei* su centinaia e centinaia di micobatteri della nostra collezione, ma esso si è dimostrato attivo soltanto sugli undici ceppi predetti. La sensibilità dei vari ceppi al fago è riassunta nell'unità tabella III.

Il *Phagus phlei* è quindi un fago la cui azione è specie-specifica e tale da permettere il suo impiego nella diagnosi di specie del *Myc. phlei*.

Il *Phagus phlei* è molto diffuso nei terreni da noi saggiati, terreni in cui, però, non ci è stato mai possibile di isolare il *Myc. phlei*, acido-resistente piuttosto raro a rinvenirsi, tanto che noi, su oltre mille isolamenti di acidoresistenti, non lo abbiamo mai rinvenuto.

#### 14) RICERCHE IMMUNOLOGICHE.

Con gli undici ceppi di *Mycobacterium phlei* sono stati preparati gli antisieri omologhi. La tecnica di preparazione è stata la seguente: Conigli del peso medio di 2 Kg venivano inoculati endovena con 5 cm<sup>3</sup> di una sospensione di *Myc. phlei* contenente 10 miliardi di germi vivi, lavati e sospesi in soluzione fisiologica; tali inoculazioni vennero ripetute per cinque volte successivamente alla distanza di sette giorni l'una dall'altra; al 40° giorno venne praticato salasso in bianco.

Come antigeni vennero usati: 1° una sospensione di germi vivi cresciuti in Dubos (per le agglutinazioni); 2° sospensione di germi uccisi al calore; 3° estratto fenolico dializzato (per la reazione di Dubos); 4° paratuberculina tipo tuberculina vecchia di Koch; 5° la porzione glucosidica; 6° la porzione protidica precipitata con sale di ammonio.

Come controllo si usarono sieri anti-aviario, anti-bovino, anti-umano e antigene aviario e bovino.

Praticate le comuni reazioni sierodiagnostiche non si ebbero mai risultati probativi ottenendosi reazioni positive anche usando antisieri ed antigeni non omologhi.

Nemmeno la emoagglutinazione di Dubos ci ha dato risultati strettamente specifici, anche usando sieri adsorbiti.

Risultati leggermente migliori si ottennero praticando cutireazioni con paratuberculina *phlei* su cavie inoculate con *Myc. phlei*. I risultati, però, non erano tali da permettere un responso di assoluta sicurezza.

Non insistiamo oltre sulle varie ricerche immunologiche praticate,

giacchè, da quanto esposto, risulta chiaro come, allo stato attuale dei fatti, non sia praticamente possibile basarsi su reazioni immunologiche per una diagnosi specifica di *Myc. phlei*.

#### 15) PATOGENICITA'.

Il *Myc. phlei* inoculato per diverse vie a topi, ratti, cavie, conigli, polli, piccioni, uova, carpe si è dimostrato sempre totalmente privo di potere patogeno. Anche senza effetto è stato l'insemenzamento del germe sulla membrana corio-allantoidea dell'embrione di pollo, sulla quale, pur essendo capace di moltiplicarsi (fig. 38), non produce lesioni di sorta. La reazione di Dubos al rosso-neutro è risultata costantemente negativa.

#### 16) CONCLUSIONI

Da quanto abbiamo sin qui esposto risulta come con il nome di *Mycobacterium phlei* (Lehmann e Neumann 1899) siano stati sino ad oggi indicati una serie di germi che, spesso, non avevano nulla a che fare l'uno con l'altro. Gli stessi creatori della specie inclusero in essa germi sicuramente appartenenti a specie diverse. Dato, però, che il nome di *Mycobacterium phlei* fu da Lehmann e Neumann creato per indicare particolarmente il micobatterio isolato dal Moeller dal *Phleum pratense*, dato che ancora oggi si conserva il ceppo originale del Moeller e che tale ceppo costituisce realmente una specie a se stante, il nome di *Mycobacterium phlei* può conservarsi per indicare questa specie, la quale dovrà essere indicata con il nome di *Mycobacterium phlei* (Lehmann e Neumann, 1899, *pro parte*).

Le caratteristiche morfologiche, biologiche, metaboliche e chimiche di questa specie si possono riassumere così:

Il *Myc. phlei* è un batterio a bastoncino diritto, incurvato, talvolta a clava, a oliva o coccoide. Nei primissimi giorni di cultura è di aspetto uniforme, presenta poi, in quarta o quinta giornata, uno o più granuli nel suo interno, granuli che in seguito scompaiono. Al microscopio elettronico si osserva nettamente una membrana cellulare, un citoplasma compatto che mostra nel suo interno corpi sferici, impermeabili ai raggi elettronici, e, talvolta, un corpo centrale analogo al granulo osservabile al microscopio ottico.

Si colora facilmente con tutti i coloranti; col bleu di metilene il granulo centrale, quando è presente, si colora più intensamente del resto del protoplasma; col Giemsa, il granulo si colora in azzurro e il protoplasma in rosa pallido, dal che si deduce essere il granulo una formazione

nucleare. Il *Myc. phlei* è acidoresistente, tale acidoresistenza, nei primi giorni di coltura, è soltanto prevalente: sino al 40% degli individui possono essere allora cianofili; è grampositivo.

In terreni solidi dà colonie rotondeggianti, a margini frastagliati e superficie rugosa e pieghettata, le pieghe hanno andamento radiale.

Le patine hanno un fondo uniforme sul quale emergono pieghe che ricadono su se stesse dando ammassi cerebriformi.

Nei terreni liquidi normali cresce in superficie con un feltro spesso, pieghettato, che risale sulle pareti del recipiente.

In terreno di Dubos dà una crescita granulosa che sedimenta in una massa cremosa.

Nei terreni liquidi, coltivati in agitazione, si ha coltura dapprima omogenea e poi globulare; ogni globulo è costituito da un ammasso di elementi granulati.

Il *Myc. phlei* cresce con facilità su tutti i terreni liquidi e solidi. Nei terreni solidi dà sviluppo visibile già dopo 24 ore, raggiungendo il suo massimo verso il 10° giorno. Cresce a temperature comprese tra i 20°C. e i 52°C. La temperatura optimum di crescita è 48°C. E' capace di crescere in terreni aventi un pH compreso tra 5,5 e 8,8. L'optimum è pH 6. In terreni a pH tamponato si ha optimum a pH 7.

Il *Myc. phlei* produce un pigmento arancione con massimo di assorbimento a 460-463 m $\mu$  e bande secondarie a 430-440 e 480-490 m $\mu$ . (in cloroformio). Tale pigmento è costituito da tre carotenoidi epifasici, particolarmente da leprotina e  $\alpha$  carotene, oltre a un carotenoide a carattere acido.

Il *Myc. phlei* non fluidifica la gelatina, riduce i nitrati a nitriti, non produce indolo, non coagula il latte; su agarsangue dà emolisi. In terreni sintetici è capace di utilizzare, come fonte di carbonio, l'alcool amilico, butilico ed etilico, l'adonite, l'eritrite, il glicerolo, il mannitolo, la sorbite, l'arabinosio, lo xilosio, il galattosio, il glicosio, il levulosio, il mannosio e il trealosio; non è capace di utilizzare l'acetone, l'alcool metilico, la dulcete, l'inosite, l'arbutina, l'esculina, la salicina, il mannosio, il sorbosio, il lattosio, il maltosio, il saccarosio, la destrina, l'inulina e il raffiniosio.

Il *Myc. phlei* è lisato dal *Phagus phlei* (P. e O.), fago ad azione specie-specifica. Le reazioni immunologiche non sono atte a individuare il *Myc. phlei*.

Il *Myc. phlei* non è patogeno.

BIBLIOGRAFIA

- ABEL G.: Vergleichende Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit von Tuberkelbazillen und säurefesten Saprophyten bestimmten Chemikalien (Antiformin, organischen und anorganischen Säuren) gegenüber, Zentrbl. f. Bakt. I, 143, 225 (1939).
- ALEXA E.: Sur les propriétés biologiques du bacille paratuberculeux de la fléole. Propriétés pathogènes, antigènes et allergisantes, Ann. Inst. Pasteur, 42, 1366 (1928).
- BASS S. e JOHNSON T.: Some chemical changes accompanying the growth of timothy bacillus on Long's synthetic medium, Amer. Rev. of Tub., 20, 122 (1929).
- BERTRAND J., BABLET J.: Sur l'inoculation intracérébrale de bacilles tuberculeux et paratuberculeux chez les singes inférieurs, Ann. Inst. Pasteur, 68, 176 (1942).
- BERTRAND J., BABLET J. e BLOCH F.: Sur l'inoculation intracérébrale au lapin de bacilles acido-résistants du groupe paratuberculeux, C.R.S.B., 138, 993 (1938).
- BESANÇON F. e PHILIBERT A.: Relations entre le bacille de Koch et les bacilles acido-résistants, Actes du Congrès Int. de la tuberculose, Vol. I, 148, Paris 1905.
- BISSET K. A.: Observation upon the cytology of corynebacteria and mycobacteria. Journ. Gen. Microb., 3, 93 (1949).
- BOQUET A.: Sur l'absorption et l'élimination des bacilles de la fléole administrés au cobaye « per os », C.R.S.B., 96, 176 (1927).
- BOQUET A. e NÈGRE L.: Sur l'hypersensibilité aux tuberculines et aux bacilles de Koch dans la tuberculose expérimentale, Ann. Inst. Pasteur, 40, 11 (1926).
- BOQUET A., NÈGRE L. e VALTIS J.: Sur la dispersion des bacilles paratuberculeux de la fléole inoculés au cobaye par la voie sous-cutanée, C.R.S.B., 101, 903 (1929-a).
- BOQUET A., NÈGRE L. e VALTIS J.: Infection et surinfection du cobaye et du lapin par le bacille paratuberculeux de la fléole, C.R.S.B., 120, 838 (1929-b).
- BOQUET A., NÈGRE L. e VALTIS J.: Sur la dispersion des bacilles paratuberculeux de la fléole inoculés au cobaye par la voie trachéale, C.R.S.B. 103, 1225 (1930).
- BOQUET A. e SAENZ A.: Sur la perméabilité de la muqueuse digestive du cobaye au bacille paratuberculeux de la fléole, C.R.S.B., 105, 260 (1930).
- BOQUET A. e VALTIS J.: Sur la surinfection du cobaye par le bacille paratuberculeux de la fléole, C.R.S.B., 104, 1182 (1930).
- BRAUN H., STAMATELAKIS A. e KONDO S.: Der Verwendungstoffwechsel säurefester Bakterien, Bioch. Ztsch., 145, 381 (1924).
- BRETEY J. e BROWAEYS J.: Mode de division du bacille paratuberculeux de la fléole, Ann. Inst. Pasteur, 71, 331 (1945).
- BRETEY J., BROWAEYS J. e DERVICHIAN D.: Sur certaines propriétés physiques des voiles minces du bacille paratuberculeux de la fléole, C.R.S.B., 138, 229 (1944).
- BÜTTNER H.: Zur Kenntnis der Mykobakterien, insbesondere ihres quantitativen Stoffwechsels auf Paraffinnährboden, Arch. f. Hyg., 97, 12 (1926).
- BYNOE: Thesis, McGill University, Montreal 1931 (non pubblicata, depositata presso la McGill University).
- CALMETTE A. e GUÉRIN G.: Sur l'origine intestinale de la tuberculose pulmonaire, Ann. Inst. Pasteur, 19, 601, (1905).
- CANTACUZÈNE J.: De certaines réactions cellulaires provoquées par l'inoculation expérimentale des bacilles paratuberculeux (bacille du Timothée), C.R.S.B., 59, 383 (1905-a).
- CANTACUZÈNE J.: Sur l'acido-résistance des cultures jeunes des bacilles du Timothée, C.R.S.B., 59, 384 (1905-b).
- CANTACUZÈNE J.: Recherches sur l'infection expérimentale par les bacilles paratuberculeux (bacille du Timothée), Actes du Congrès Int. de la tuberculose, Vol. I, Paris, 1905 c.
- CATTANEO C., MORELLINI M., ORTALI V. e PENSO G.: L'azione dell'acido p. amino-salicilico sui micobatteri. Riunione dell'Associazione umbro-laziale contro la tubercolosi, Roma 3 aprile 1949.
- CATTANEO C., MORELLINI M., ORTALI V. e PENSO G.: Studi e ricerche sui micobatteri. Nota VI. L'azione dell'acido p. amino-salicilico sui micobatteri. Differenziazione tra tubercolari e paratubercolari, Rend. Ist. Sup. di Sanità, 13, 390. (1950).

- CHARGAFF E.: Zur Kenntnis der Pigmente der Timotheegrassbakterien, Zentr. f. Bakt. I, 119, 121 (1930).
- CHARGAFF E.: Sur les carotinoïdes des bactéries, C. R. Ac. Sc., 197, 946 (1933).
- CHARGAFF E., PANGBORN M. e ANDERSON R. J.: The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. XXIII. Separation of the lipid fractions from the timothy bacillus, Journ. Biol. Chem., 90, 57 (1931).
- COGHILL R. D.: The nucleic acid of timothy bacillus, Journ. Biol. Chem., 90, 47 (1931).
- COGHILL R. D. e BIRD O. D.: The chemical study of bacteria. XXIV. A proximate chemical analysis of the timothy bacillus, Journ. Biol. Chem., 81, 115 (1929).
- COOPER F. B.: The filtrability of the acid-fast group, Journ. Inf. Dis, 104, 236 (1934).
- CRAWFORD A. B.: Tuberculin sensitization in guinea-pigs caused by various acid-fast organisms, Journ. Am. Vet. Med. Ass., 49, 579 (1926).
- CREUZÉ P.: Le bacille de la fléole, Rev. de Path. comp. et d'Hyg. gén., 38, 765 (1938)
- DAMON S. R.: Some observations in regard to growth-promoting substances of bacterial origin, Journ. Biol. Chem., 56, 895 (1923).
- DAMON S. R.: Acid-fast bacteria a source of vitamin B, Journ. Path. a. Bact., 27, 163 (1924).
- DARZINS E.: Recherches sur les bacilles paratuberculeux de Moeller et de Grassberger, Ann. Inst. Pasteur, 49, 743 (1932).
- DARZINS E.: Influence des caroténoïdes sur la croissance et l'acidorésistance des bacilles paratuberculeux de la fléole, Ann. Inst. Pasteur, 63, 455 (1939).
- DEILMANN O.: Ueber die spezifischen Stoffe des Tuberkelbacillus und anderer säurefester Bacillen, Zeit. f. Immunitätsf. I, 10, 421 (1911).
- DI RAIMONDO F. e ORTALI V.: Sintesi di amide nicotinic da parte dei micobatteri, Rend. Acc. Naz. d. Lincei, Seduta 15 maggio 1948, Serie VIII, 4, 783 (1948).
- EBINA T.: Versuche einer Differenzierung der säurefesten Bakterien mittels des Agglutinationsverfahrens. Die Stellung der säurefesten Saprophyten zu den pathogenen Tuberkelbazillen. Das S - und R - Antigen humaner und boviner Stämme, Zentrbl. f. Bakt. I, 145, 289 (1940).
- EBINA T. e NAKAMURA T.: Ueber den Stoffwechsel der säurefesten Bacillen. I Mitt. Ueber Atmung und Glikolyse, Tohoku J. exp. Med., 31, 60 (1937).
- EDSON N. L.: The oxidation of lactic acid by *Mycobacterium phlei*, Bioch. Journ., 41, 145 (1947).
- EDSON N. L. e HUNTER G. J. E.: Respiration and nutritional requirements of certain members of the genus *Mycobacterium*, Biochem. Journ., 37, 563 (1943).
- EDSON N. L. e HUNTER G. J. E.: The respiration of *Mycobacterium phlei*, Biochem. Journ., 41, 139 (1947).
- FREI W. e POKSCHISCHEWSKY N.: Zur frage der sogenannten Säurefestigkeit, Zentrbl. f. Bakt. I, 60, 161 (1911).
- FREUND J. e WALTER A. W.: Saprophytic acid-fast bacilli (*Myc. phlei*) and paraffin oil as adjuvantes in immunisation, Proc. Soc. Exp. Biol a. Med., 56, 47 (1944).
- GORDON R. E.: The classification of acid-fast bacteria, Journ. of Bact., 34, 617 (1937).
- GORDON R. E. e HAGAN W. A.: The classification of acid-fast bacteria II., Journ. of Bact. 26, 39 (1938).
- HAAG F. E.: Die saprophytischen Mykobakterien, Zentrbl. f. Bakt. II, 71, 1 (1927).
- HAUDUROY P.: Mode de formation et morphologie des voiles de *Mycobacterium phlei*, C.R.S.B., 128, 47 (1938).
- HORMANN e MORGENROTH: Ueber Bakterienbefunde in der Butter, Hyg. Rundschau, 8, 217 e 1081 (1898).
- HÖLSCHER: Kurze Mitteilung über experimentelle Untersuchungen mit säurefesten tuberkelbacillen ähnlichen Spaltpilzen, Zentrbl. f. Bakt., 29, 425 (1901).
- HUNTOON F. M., FUNK E. H. e WHITE H.: Biochemical studies of bacterial derivatives: XV. Skin reactions in man: a comparison of tuberculin O. T., human tubercle bacillus protein MA 100 and timothy bacillus protein MA 100, Journ. of Bact., 21, 57 (1931).
- INGRAHAM M. A. e STEENBOCK H.: The relation of microorganisms to carotenoids and vitamin A. II. The production of carotenoids by *Mycobacterium phlei*, Biochem. Journ., 29, 2553 (1935).
- IRIMESCU S.: Action comparée des paratuberculines, C.R.S.B., 59, 385 (1905).

- ISAICU L.: Action des produits d'antolyse de différents organes sur l'extrait méthylique de bacilles tuberculeux et sur l'extrait méthylique de bacilles de la fléole, C.R.S.B., 93, 244 (1925).
- JELIN W.: Ueber filtrierbare Formen des Timotheebacillus, Cntrbl. f. Bakt, I, 103, 325 (1927).
- JELIN W.: Ueber das Schicksal des Timotheebazillus in tierischen Organismus und über die durch ihn hervorgerufenen pathologisch-histologischen Veränderungen. II Mitteilung., Cntrbl. f. Bakt. I, 111, 391 (1929).
- JELIN W. e FELDMANN F.: Ueber das Schicksal des Timotheebazillus im tierischen Organismus und über durch diesen Bazillus hervorgerufen pathologisch-histologische Veränderungen. I Mitteilung., Cntrbl. f. Bakt., 108, 41 (1928).
- JENSEN H. L.: Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria, Proc. of the Linnean Soc. of New South Wales, 59, 19 (1934).
- KAYSER J.: Beitrag zur Differentialdiagnose zwischen den echten Tuberkelbacillen und den beiden säurefesten Bacillen Grasbacillus Timothee-Göbersdorf und Butterbacillus Rabinowitsch, Inaug. Diss. Rostock, 1902.
- KENDALL A. J., DAY A. A. e WALKER A. W.: The metabolism of «lepra bacillus» grass bacillus and smegma bacillus in plain, dextrose, mannite and glycerin broths. Studies in acid-fast bacteria V, Journ. of inf. Dis., 12, 439 (1914).
- KENDALL A. J., WALKER A. W. e DAY A. A.: A comparison of the curves of lipolytic activity and proteolysis of certain acid-fast bacilli in nutrient broths. Studies in acid-fast bacteria. X, Journ. inf. Dis., 15, 107 (1914).
- KIRSCHNER O., MALKANI M. e MILOCHEWITCH S.: Untersuchungen zur Beeinflussung der säurefestigkeit des Timotheebazillus in Kultur, Cntrbl. f. Bakt. I. 118, 167 (1930).
- KNAYSI G., HILLIER J. e FABBRICANT C.: The citology of an avian strain of *Mycobacterium tuberculosis* studied with the electron and light microscopes, Journ. of Bact. 60, 423 (1950).
- KOLLE W., SCHLOSSBERGER H. e PFANNENSTIEL W.: Tuberkulose-Studien. IV. Ueber die Tierpathogenität der Gruppe der säurefesten Bakterien; Tierpassagen, Virulenzsteigerung und kulturelles Verhalten, Deutsche med. Woch., 47, 937 (1921).
- KONDO S.: Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien. VI Mitteilung. Über den Einfluss des Wasserstoffionenkonzentration auf des Wachstum der säurefesten Bakterien in einfachen künstlichen Nährböden, Bioch. Zeit., 162, 171 (1925).
- KRAUSE e BALDWIN: Some new biological relations between tubercle bacilli and other acidfast forms, Trans. of the ninth annual Meeting of the national association for the study and prev. of tub. Public Health Reports N. 29, Washington 1914.
- LAFON J.: Étude de la dispersion du bacille de la fléole dans l'organisme de la souris, Ann. Inst. Pasteur, 68, 274 (1942).
- LANGE B. e LANGE E.: Die Reaktion des tuberkulösen Organismus auf intrakutane Verimpfung säurefester Saprophyten und deren Tuberkuline, Deutsche mediz. Woch., 48, 248 (1922).
- LAPORTE R.: Contribution à l'étude des bacilles paratuberculeux. III. Propriétés toxiques et sensibilisantes, Ann. Inst. Pasteur, 66, 284 (1941).
- LEHMANN K. B. e NEUMANN R.: Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Teil II: Text, p. 411, München 1899.
- LIMOUSIN H.: Formes pseudo-actinomycosiques des bacilles acido-résistants paratuberculeux dans les lésions qu'ils produisent, Ann. Inst. Pasteur, 38, 713 (1924).
- LINDNER: Einige Heil- und Immunisierungsversuche mit Timotheebacillen gegen Tuberkulose an Meerschweinchen, Kaninchen und Ziegen mit Bemerkungen über den Verlauf der Ziegentuberkulose nach galaktogener Infektion, Arb. a. d. Kais. Gesdh., 48, 112 (1914).
- LONG E. R. e CAMPBELL L. K.: The lipin content of acid-fast bacilli, Am. Rev. Tub., 6, 636 (1922).
- LONG E. R. e MAJOR A. L.: A method of following reaction changes in cultures of acid-fast bacteria, Am. Rev. Tub., 5, 7155 (1921).
- LUBARSCH O.: Zur Kenntniss der Strahlenpilze, Zeitschr. f. Hyg. u. Infk., 31, 187 (1899).

- MASUCCI P. e McALPINE K. L.: Biochemical studies of bacterial derivatives. XIV. The preparation and chemical composition of timothy bacillus polysaccharides MB 200, *Am. Rev. Tub.*, 22, 682 (1930).
- MAYER G.: Zur Kenntnis der säure festen Bakterien aus der Tuberkulosegruppe, *Contrl. f. Bakt.*, 26, 321 (1899).
- MAYER G.: Zur histologischen Differentialdiagnose der säurefesten Bakterien aus der Tuberkulosegruppe, *Virchows Arch.*, 160, 324 (1900).
- MERRIL M. H.: Carbohydrate metabolism of organisms of the genus *Mycobacterium*, *Journ. of Bact.*, 20, 235 (1930).
- MERRIL M. H.: Studies on carbon metabolism of organisms of the genus *Mycobacterium*. II. Utilisation of organic compounds in a synthetic medium, *Journ. of Bact.*, 21, 361 (1931 a).
- MERRIL M. H.: Studies on carbon metabolism of organisms of the genus *Mycobacterium*. III. End products of carbohydrate utilization as determined in synthetic media cultures, *Journ. of Bact.*, 21, 375 (1931).
- MOELLER A.: Mikroorganismen, die den Tuberkelbacillen verwandt sind und bei Tieren eine miliare Tuberkelkrankheit verursachen, *Deutsche med. Woch.*, 24, 376 (1898).
- MOELLER A.: Ein neuer säure-und alkoholfester Bacillus aus der Tuberkelbacillengruppe, welcher echte Verzweigungsformen bildet, *Beitrag zur Pleomorphie der Bakterien*, *Contrl. f. Bakt.*, 25, 369 (1899).
- MUCH H. e LESCHKE E.: Die Tuberkelbacillen im System der säurefesten Bakterien, *Beitr. Klin. Tuberk.*, 20, 351 (1911).
- NÈGRE L. e VALTIS J.: Action des substances ciro-graisseuses du bacille de Koch sur la multiplication in vivo chez le cobaye des bacilles paratuberculeux et des bacilles tuberculeux aviaires, *C.R.S.B.*, 107, 596 (1931).
- NÉLIS P.: Sur l'absorption du bacille de la fléole chez le tout jeune lapin, *C.R.S.B.*, 102, 585 (1929 a).
- NÉLIS P.: Sur l'absorption du bacille de la fléole chez le lapin adulte, *C.R.S.B.*, 102, 589 (1929 b).
- NÉLIS P.: Sur l'absorption « per os » des bacilles de la fléole chez le cobaye et chez le lapin, *Ann. Inst. Pasteur*, 45, 581 (1930).
- NÉLIS P. e van BOECKEL L.: Sur l'absorption des bacilles paratuberculeux administrés « per os » chez le cobaye adulte et chez le tout jeune cobaye, *C.R.S.B.*, 99, 1248 (1928 a).
- NÉLIS P. e van BOECKEL L.: Sur l'absorption des bacilles de la fléole administrés « per os » au tout jeune cobaye, *C.R.S.B.*, 99, 1251 (1928 b).
- NIKITIN: Zur Theorie der Tuberkelbacillenfärbung, VIII Kongress russischer Aerzte Moskau, 1901.
- NINNI C.: Les éléments filtrables des bacilles tuberculeux aviaires et des bacilles paratuberculeux, *C.R.S.B.*, 107, 615 (1931 a).
- NINNI C.: Essai de culture des éléments filtrables des bacilles paratuberculeux. *C.R.S.B.*, 107, 618 (1931 b).
- NINNI C.: Sur quelques propriétés chimiques, microscopiques et sérologiques des filtrats de voiles de bacilles de Koch et de la fléole sur le milieu de Sauton, *Ann. Inst. Pasteur*, 49, 186 (1932).
- ODIER M.: Contribution à l'étude de quelques mycobactéries; métabolites et antibiotiques, *Schw. Zeit. f. Path. u. Bakt.*, 12, 380 (1949).
- ORTALI V.: Isolamento di tre batteriofagi anti-micobatterici (Nota preliminare), *Rend. Acc. Naz. dei Lincei*, Seduta del 9 giugno 1948, Serie VIII, 4, 790 (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, Serie VIII, 6, 248 (1949).
- PANGBORN M. C. e ANDERSON R. J.: The chemistry of the lipids of tubercle bacilli. XII. Part 1. The composition of the timothy bacillus wax. Part 2. The isolation of d-eicosanol-2 and d-octadecanol-2 from the unsaponifiable matter of the timothy bacillus wax, *Journ. Am. Chem. Soc.*, 58, 10 (1936).
- PECK R. L. e ANDERSON R. J.: The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. LXIV. Concerning phleimycolic acid, *J. Biol. Chem.*, 140, 89 (1941).
- PENSO G.: Les bacilles paratuberculeux, Conferenza tenuta a Losanna il 9 maggio 1949, in: *Les bacilles tuberculeux*, Ed. Masson, Parigi 1950.

- 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. dell'Istituto Superiore 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 dic. 1948, Serie VIII, 6, 109 (1949).
- PENSO G. e ORTALI V.: Studi e ricerche sui micobatteri. Nota II. I fagi dei micobatteri, Rend. dell'Istituto Superiore di Sanità, 12, 903 (1949).
- PETRI: Bemerkungen über die Arbeit des Herrn Dr. Obermüller: Ueber Tuberkelbacillenbefunde in der Marktbuttermilch, Hyg. Rundschau, 7, 811 (1897).
- PETRI: Zum Nachweis der Tuberkelbacillen in Butter und Milch, Arb. aus dem kais. Gesundheitsämte, 14, 1 (1898).
- PETRIK F. G.: Atypical acid fast microorganisms. II. Desoxyribonucleic acid content, Journ. of Bact., 51, 539 (1946).
- PETROFF S. A. e STEENKEN Wm.: Biological studies of the acid-fast organism, Journ. of Bact., 21, 11 (1931).
- PFANNENSTIEL W.: Vergleichende Untersuchungen über die Extrahierbarkeit verschiedener säurefester Bakterien mit Aether-Acetongemischen, Z. Hyg u. Infk., 95, 87 (1922).
- POTET M.: Etude sur les bactéries dites « acidophiles ». Les paratuberculibacilles, Lib. J. B. Baillière et Fils, Paris 1902.
- PRICKETT P. S. e MASSENGALE O. N.: Ergosterol content of certain species of *Mycobacterium* and the effect of ergosterol (activated and inactivated) on their growth, Journ. of Bact., 21, 9 (1931).
- PRUDHOMME R. O.: Contribution à l'étude de quelques composés gras des bacilles acido-résistants, Ann. Inst. Pasteur, 66, 473 (1941).
- RABINOWITSCH L.: Zur frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Marktbuttermilch, Zeitschr. f. Hyg. u. Infk., 26, 90 (1897).
- RABINOWITSCH L.: Recensione al lavoro di Moeller: Mikroorganismen, die den Tuberkelbacillen verwandt sind etc., Cntrbl. f. Bakt., 24, 844 (1898).
- RAUBITSCHKE H.: Zur Kenntnis der alkohollöslichen Bakterienhämolyse, Cntrbl. f. Bakt. I, 46, 508 (1908).
- REED G. B.: *Mycobacterium phlei* in Bergey's Manual of determinative Bacteriology, Baltimore, 1948.
- REED G. B. e RICE C. E.: The action of iron and citrate in synthetic media for tubercle bacilli, Journ. of Bact., 16, 97 (1928).
- REED G. B. e RICE C. E.: The influence of iron on the pigmentation of acid-fast bacteria, Journ. of Bact., 17, 407 (1929).
- RODET A. e GALAVIELLE L.: Sur le pouvoir pathogène de certains bacilles acido-résistants. Essais de modification par le passage dans l'organisme animal. Actes du Congrès Int. de la tuberculose, Vol. I, Paris 1905.
- ROULET F., WYDLER H. e ZELLER E. A., Ueber die Enzyme des *Mycobacterium tuberculosis* und anderer säurefesten Bakterien. (2 Mitteilung). Über den enzymatischen Abbau von 1- $\alpha$ -Oxysäuren durch säurefeste Bakterien, Helvetica Chimica Acta, 29, 1973 (1946).
- ROULET F. e ZELLER E. A.: Über die Enzyme des *Mycobacterium tuberculosis* und anderer säurefesten Bakterien. (3 Mitteilung). Über den enzymatischen Abbau von L-Peptiden durch säurefeste Bakterien, Helvetica Chimica Acta, 31, 1915 (1948).
- SAENZ A.: Sur la dispersion des bacilles paratuberculeux de la fléole inoculés au cobaye par voie péritonéale, C.R.S.B., 102, 833 (1929).
- SCHLOSSBERGER H. e PFANNENSTIEL W.: Tuberkulosestudien. I. Ueber die Differenzierung säurefester Bakterien., Deutsche med. Woch., 46, 1213 (1920).
- SCHULZE O.: Untersuchungen über die Strahlenpilzformen des Tuberkuloseerregers, Zeitschr. f. Hyg. u. Infk., 31, 153 (1899).
- SHIGIGA H.: Ueber die Alkalifestigkeit der säurefesten Bazillen, Mitt. d. med. Gesellsch. z. Osaka, 9, fase. 5 (1910).
- SÖHNGEN N. L.: Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben, Cntrbl. f. Bakt. II, 37, 595 (1913).
- SPALLICCI M.: Attivazione della crescita del *Mycobacterium phlei* ad opera di costituenti la cellula microbica stessa, Boll. d. Ist. Sierot. Milanese, 27, 18 (1948).
- STANCALEANU G.: Sur la kératite expérimentale par le bacille du Timothée, C.R.S.B., 66, 654 (1909).

- STEPHENSON M. e WHETHAM M. D.: Studies in the fat metabolism of the timothy grassbacillus, Proc. Roy. Soc. London B., 93, 262 (1922).
- STEPHENSON M. e WHETHAM M. D.: Studies in the fat metabolism of the timothy grassbacillus. II. Proc. Roy. Soc. London B., 95, 200 (1924).
- TAKEDA Y. e OHTA T.: Ueber Leprotin, ein Carotinoid der Formel  $C_{10}H_{54}$ , Zeit. physiol. Chem. 258, 6 (1935).
- TAKEDA Y. e OHTA T.: Ueber das Carotinoid von *Mycobacterium phlei*, Zeit. physiol. Chem., 262, 168 (1939).
- TAKEDA Y. e OHTA T.: Ueber die Identifizierung der einzelnen Carotinoide von *Mycobacterium phlei*, Zeit. physiol. Chem., 265, 233 (1940).
- THOMSON H. M.: Studies on saprophytic acid-fast bacteria, Amer. rev. of Tub., 26, 162 (1932).
- TURIAN G.: Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux. I. Exaltation de la pigmentation par le fer et par le manganèse, Helvetica Chim. Acta, 33, 13 (1950).
- TURIAN G.: Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux. II. Identification d'un polyène acide voisin de l'astacide, Helvetica Chim. Acta, 33, 1303 (1950).
- TURIAN G.: Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux. III. Inhibition de la pigmentation par la diphenylamine, Helvetica Chim. Acta, 33, 1988 (1950).
- TWORT C. C., TODD E. W. e PERKINS R. J.: Group specificity of some antigens derived from acid-fast bacilli, Brit. Journ. Exp. Path., 5, 171 (1924).
- UHLENHUTH P.: Antiformin, ein bakterienauflösendes Desinfektionsmittel, Cntrbl. f. Bakt. Referate, 42, (Beiheft), 62 (1908).
- VAICULESCU T.: Action pathogène du bacille de timothée incorporé à du beurre, C.R.S.B., 130, 1448 (1939).
- VALETTE G. e LIBER A.: Action des sels biliaries sur certains bacilles acido-résistants, C.R.S.B., 135, 847, (1941).
- WALTHER K.: Züchtungsergebnisse und abtötungsversuche mit dem Honschen Schwefelsäureverfahren, Zntrbl. f. Bakt. I, 115, 235 (1930).
- WARSCHAWSKY J.: Conservation et dissociation du bacille paratuberculeux du crottin dans l'eau physiologique à la glacière, C.R.S.B., 116, 1233 (1934).
- WEBER A.: Ueber die tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen und die Bacillen des Smegmas, Arb. a. d. Ksl. Gesdh. amt. 19, 251 (1903).
- WEBER A. e TITZE C.: Die Immunisierung der Rinder gegen Tuberkulose, Tuberk. Arb. a. d. Gesendh., 7, 1 (1907).
- WEINZIRL J. e KNAPTON F.: The biology of the tubercle bacillus. I. Hydrogen-ion concentration produced by some members of the genus *Mycobacterium*, Amer. Rev. Tub., 15, 380 (1927).
- WILSON G. S.: The serological classification of the tubercle bacilli by agglutination and absorption of agglutinins, Journ. of Path. a. Bact., 28, 69 (1925).
- WOLFF H.: Der Verwendungstoffwechsel säurefester Bakterien. V. Mitteilung: Ueber den quantitativen Verwendungstoffwechsel des Timotheebazillus und des Trompetenbazillus, Bioch. Zeit., 158, 319 (1925).
- WYCKOFF R. W. G. e SMITHBURN K. C.: Micromotion pictures of the growth of *Mycobacterium phlei*, Journ. Inf. Dis., 53, 201 (1933).