

35. R. NEGRI, Littoria von LORCH, G. DE FELIP e Silvana ALBERTI. — **Ricerche sull'impianto intestinale di alcune specie batteriche.**

**Riassunto.** — Sono state eseguite ricerche intese a dimostrare l'impianto intestinale di alcune mutanti batteriche tetracicli-no-resistenti (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* N.C.I.B. 2797, *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799) somministrate per via orale nel cane.

L'impiego di questi ceppi batterici « marcati » ha permesso di chiarire, in modo probativo, un problema che a tutt'oggi era rimasto insoluto.

Gli isolamenti dalle feci venivano eseguiti su terreno elettivo aggiunto di tetraciclina e nistatina ed i ceppi isolati conservavano inalterate le caratteristiche sierologiche, biochimiche, colturali, morfologiche e in particolare quelle di resistenza alla tetraciclina.

L'isolamento delle mutanti dalle feci è stato possibile sia durante la somministrazione delle colture batteriche, che a somministrazione cessata. In particolare, il *Lactobacillus acidophilus* e il *Lactobacillus bifidus* sono stati isolati fino al 15° giorno dalla cessata somministrazione, il *Bacillus subtilis* fino al 13° giorno, mentre il *Lactobacillus casei* è stato repertato fino alla 7ª giornata.

**Résumé.** — On a effectué des recherches visant à démontrer l'implantation intestinale de quelques mutants bactériens résistants aux tétracyclines (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* N.C.I.B. 2797, *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799) administrées à un chien par voie orale.

L'utilisation de ces souches bactériennes « marquées » a permis d'éclaircir, d'une façon probante, un problème qui jusqu'à présent, était resté sans solution. Les isoléments des selles étaient exécutés sur un terrain électif auquel on avait ajouté de la tétracycline et nistatine; les souches isolées conservaient inaltérées les caractéristiques sérologiques, biochimiques, culturelles, morphologiques et surtout leur résistance à la tétracycline.

L'isolément des mutants des selles a été possible aussi bien pendant l'administration des cultures bactériennes que lorsque cette administration avait été suspendue. On a, en particulier, isolé le *Lactobacillus acidophilus* et le *Lactobacillus bifidus* jusqu'au quinzième jour après l'interruption de l'administration, le *Bacillus subtilis* jusqu'au treizième jour tandis que le *Lactobacillus casei* a été isolé jusqu'à la septième journée.

**Summary.** — Work has been performed to demonstrate the intestinal establishment of several mutant, tetracycline resistant, bacteria (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* N.C.B.I. 2797, *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799) administered orally to dogs. The use of these recognisable strains has permitted the definitive clarification of a problem which, until now, had remained insoluble.

The isolation from the faeces was carried out on a medium containing a high concentration of tetracycline and nystatin and the isolated strains preserved unchanged their serological, biochemical, cultural and morphological characteristics and above all their resistance to tetracycline. The isolation of the mutants from the faeces was possible both during the actual administration of the bacteria and afterwards; *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bifidus* have been isolated 15 days, *Bacillus subtilis* 13 days and *Lactobacillus casei* 7 days after ending the administration.

**Zusammenfassung.** — Es wurden Forschungen ausgeführt, die beabsichtigen die Darmsysteme einiger Bakterienvariante, die widerstandsfähig gegen das Tetracyclin sind, zu zeigen (*Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* N.C.I.B. 2797, *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799) dem Hund auf dem Mundwege eingeben.

Die Verwendung dieser Bakterienstämme « markiert » hat erlaubt auf beweisende Art ein Problem, welches bis heute ungelöst war, aufzuklären.

Die Absonderungen aus den Exkrementen wurden auf ausgewähltem mit Zusatz von Tetracyclin und Nistatin versehenen Boden ausgeführt und die isolierten Stämme bewahrten die unveränderten sierologischen, biochemischen, kulturischen, morfologischen und im Besonderen diejenigen Kennzeichen, die dem Tetracyclin widerstandsfähig sind.

Die Absonderung der Variante aus den Exkrementen war während der Eingebung der Bakterienkulturen, als auch nach der Eingebung möglich. Im Besonderen der *Lactobacillus acidophilus* und der *Lactobacillus bifidus* wurden bis zum 15. Tag nach der Eingebung abgesondert, der *Bacillus subtilis* bis zum 13. Tag, während der *Lactobacillus casei* bis zum 7. Tag auffindbar war.

---

Il problema della sopravvivenza e dell'impianto intestinale di specie batteriche è stato studiato da molti ricercatori per germi appartenenti al genere *Lactobacillus*. Infatti tale problema risale alle origini della introduzione in terapia dei lattobacilli. METCHNIKOFF (1) fu il primo

a concepire l'idea di modificare la flora intestinale con la somministrazione di yogurt ottenuto con *Lactobacillus bulgaricus*.

In seguito, molti ricercatori riuscirono a dimostrare sperimentalmente, nell'uomo e negli animali, che la somministrazione di yogurt a base di *Lactobacillus bulgaricus* riusciva a modificare la flora normale o patologica.

Tale lattobacillo, in seguito a ripetuta somministrazione, veniva repertato in prevalenza nelle feci dei soggetti trattati [COHENDY <sup>(2)</sup>; BELONOWSKY <sup>(3)</sup>; WINKLER <sup>(4)</sup>; WEINERT <sup>(5)</sup>; KATSCHI <sup>(6)</sup>; LIEFMANN <sup>(7)</sup>; BERDNIKOFF <sup>(8)</sup>; RÖSLER <sup>(9)</sup>; ecc.]. Inoltre, MAZZARACCHIO <sup>(10)</sup> giunse a conclusioni favorevoli circa la sopravvivenza dei lattobacilli in presenza dei succhi gastrici ed enterici, introducendo le colture, con particolare tecnica, nello stomaco e nell'intestino di cavie e conigli.

Tuttavia, molti ricercatori non condivisero le affermazioni relative ad un probabile impianto intestinale dei lattobacilli, poichè con prove sperimentali, condotte nell'uomo e negli animali, non constatarono modificazione alcuna della microflora intestinale reperibile nelle feci [PERGHER <sup>(11)</sup>; ROSENBERG <sup>(12)</sup>; KLOTZ <sup>(13)</sup>; NARKIRIER <sup>(14)</sup>; LUERSSEN <sup>(15)</sup>; OEHLER <sup>(16)</sup>; PUNTONI <sup>(17)</sup>; ecc.].

Successivamente RETTGER e collaboratori <sup>(18)</sup> ripresero l'argomento dimostrando che certi ceppi di *Lactobacillus acidophilus*, ma non le colture di *Lactobacillus bulgaricus* di METCHNIKOFF, potevano impiantarsi in grande numero nel tratto intestinale e che in molti casi patologici le alterazioni intestinali miglioravano con la somministrazione di colture di *Lactobacillus acidophilus*.

La scelta di questa specie era giustificata dall'ormai comprovata costante presenza di tale lattobacillo nell'intestino dei lattanti e degli adulti sani [OLSEN <sup>(19-20)</sup>; BERBERO <sup>(21)</sup>; ORLA-JENSEN <sup>(22)</sup>; ecc.].

Inoltre, WINKELSTEIN <sup>(23)</sup> e RAFSKY <sup>(24)</sup>, con l'uso di tavolette contenenti colture vive ad elevata carica batterica di *Lactobacillus acidophilus*, ottennero risultati favorevolissimi in un grande numero di affezioni intestinali, comprese le coliti e tutte le sindromi enteriche provocate dagli antibiotici. Tali autori rilevarono modificazioni della flora fecale degli individui trattati, con passaggio dalla Gram negatività alla Gram positività; tale passaggio deporrebbe a favore di un buon impianto intestinale del lattobacillo.

Recentemente il problema dell'impianto intestinale dei lattobacilli ha ricominciato a destare interesse in seguito al frequente instaurarsi delle cosiddette sindromi enteriche da antibiotici. Infatti l'introduzione in terapia degli antibiotici, specie di quelli a vasto spettro e a somministrazione orale, ha creato nuovi problemi terapeutici collegati all'alte-

razione, quantitativa e qualitativa, della flora microbica enterica in particolare di quella B-vitamina-sintetizzatrice, e alle affezioni sovrapposte batteriche e micotiche.

Da ciò la necessità di ricorrere a una flora intestinale sostitutiva; naturalmente non potendo reintegrare tutte le specie batteriche ospiti abituali dell'intestino (*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium welchii*, *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus acidophilus*), si tende ad impiegare specie batteriche che sicuramente, in determinate condizioni, non possano virulentarsi e che creino le premesse per il reintegro della flora enterica distrutta. La preferenza, pertanto, viene data ai lattobacilli e al *Bacillus subtilis* e particolarmente a loro mutanti a resistenza indotta agli antibiotici [VON LORCH <sup>(25)</sup>; NEGRI <sup>(26)</sup>] in modo da evitare la distruzione di tali stipiti da parte degli antibiotici stessi.

#### SCOPO DEL LAVORO.

Le conclusioni disperate a cui è pervenuta la numerosa schiera di ricercatori che, dall'inizio della introduzione in terapia dei lattobacilli, si è interessata del problema dell'impianto intestinale di detta specie batterica, non hanno fornito una dimostrazione scientifica e probativa dell'argomento.

Infatti, le ricerche sono state condotte o in condizioni artificiali o limitate unicamente alla valutazione di alcuni particolari elementi delle feci: caratteri organolettici (colore, odore, consistenza), diminuzione delle specie batteriche abitualmente presenti, prevalenza della specie di lattobacilli somministrata.

Di conseguenza abbiamo creduto opportuno riprendere l'argomento, relativo all'impianto intestinale, seguendo tecniche più aggiornate e probative.

#### MATERIALI USATI.

*Ceppi batterici*: *Lactobacillus acidophilus* 220, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* N.C.I.B. 2797, *Bacillus subtilis* A.T.C.C. 9799 e loro mutanti, a resistenza indotta alla tetraciclina.

Il grado di resistenza era dell'ordine di 100  $\gamma$ /cm<sup>3</sup>. Tali mutanti erano naturalmente resistenti alla nistatina (50  $\gamma$ /cm<sup>3</sup>).

*Terreni colturali*: brodo e agar carota-fegato pH 4,7 - pH 6 - pH 7; latte scremato; brodo e agar normali pH 6 - pH 7.

*Antibiotici*: tetraciclina cloridrato.

*Antimicotici*: nistatina.

## TECNICA DELLE RICERCHE.

Ricerche preliminari furono condotte su 10 cani e si basarono sulla eventuale constatazione della diminuzione o scomparsa della flora fecale abituale e prevalenza della specie batterica somministrata per un lungo periodo di tempo (*Lactobacillus acidophilus*).

Si è tentato inoltre di favorire l'impianto, su di un altro gruppo di 6 cani, cercando di eliminare completamente la flora intestinale con la somministrazione di antibiotici a vasto spettro (tetracicline) e antimicotici (nistatina) per via orale. Lo scopo era di tentare l'impianto intestinale del *Lactobacillus acidophilus* su intestini artificialmente resi sterili.

I risultati di entrambi questi tentativi furono negativi.

Infatti non è stato possibile mettere chiaramente in evidenza il prevalere della flora acidofila, su quella abitualmente presente, per le difficoltà relative all'isolamento dei lattobacilli e alla costante presenza di numerosa flora batterica Gram positiva, prima durante e dopo il trattamento. Inoltre non è stato possibile ottenere la sterilizzazione completa intestinale, per la costante presenza di flora resistente ad entrambi gli antibiotici.

Infatti nelle nostre prove abbiamo isolato forme bacillari e coccacee naturalmente resistenti a 20-30  $\gamma/\text{cm}^3$  di tetraciclina e miceti resistenti a 10-20  $\gamma/\text{cm}^3$  di nistatina.

Inoltre, l'isolamento di qualche specie batterica riferibile al *Lactobacillus* per morfologia, attività biochimiche, colturali e sierologiche, non ha permesso di discernere se il lattobacillo isolato fosse quello naturalmente presente nell'intestino del cane o quello da noi somministrato.

Su queste premesse negative o, per lo meno, non probative, abbiamo creduto opportuno impiegare per la somministrazione, specie batteriche a resistenza indotta alla tetraciclina. La somministrazione di tali mutanti antibiotico-resistenti è stata di recente introdotta in terapia e preconizzata da due di noi (<sup>25-26</sup>). L'impiego di tali mutanti ci ha messo in condizione di poter seguire il comportamento di ogni singola specie « marcata ».

Le ricerche sono state svolte su 12 cani appartenenti a razze e sesso diverso, di media taglia, tenuti ad identica alimentazione ed in gabbie separate.

Prima della somministrazione sono state esaminate per 30 giorni,

da un punto di vista microbiologico (esame microscopico e colturale), le feci di ogni singolo animale.

Gli antibiogramma e gli antimicogramma hanno evidenziato la presenza, a volte, di specie microbiche (specialmente cocchi), resistenti alla penicillina ( $10 \text{ U/cm}^3$ ), neomicina e streptomina ( $1000 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ), cloranfenicolo ( $100 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ), tetraciclina ( $50 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ) e di miceti resistenti a bassissime dosi di nistatina ( $5\text{-}10 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ).

Contemporaneamente, per ogni cane, si è tentato l'isolamento di germi e miceti resistenti a  $100 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$  di tetraciclina e  $50 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$  di nistatina.

Per ogni cane si seminavano 5 piastre contenenti agar carota-fegato (pH 4,7 - 6 - 7) addizionati di tetraciclina ( $100 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ) e nistatina ( $50 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ). L'osservazione, protratta per 30 giorni, ha dimostrato che, in tali condizioni sperimentali, non è mai stato possibile isolare, dalle feci dei cani non trattati, germi o miceti.

Su questa premessa, sicuramente positiva, abbiamo tentato di dimostrare l'impianto intestinale di alcune mutanti batteriche a resistenza indotta alla tetraciclina ( $100 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ) e a resistenza naturale alla nistatina ( $50 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ).

Le colture erano eseguite in brodo carota-fegato (pH 6 per i lattobacilli e pH 7 per il *Bacillus subtilis*) e incubate a  $37^\circ \text{C}$ . per 24 ore.

Ad ogni animale venivano somministrate, al mattino a digiuno,  $\text{cm}^3$  100 di coltura addizionata di un abbondante quantitativo di saccarosio. La somministrazione fu protratta per 10 giorni.

Le feci di ogni singolo animale venivano prelevate ogni mattina, in appositi contenitori, e sottoposte ad accertamenti microbiologici.

Tali accertamenti consistevano in un esame microscopico, previa colorazione semplice e del Gram, e in una semina in superficie e in profondità su 5 piastre contenenti agar carota-fegato pH 6 per i lattobacilli e pH 7 per il *Bacillus subtilis*, addizionato a  $100 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$  di tetraciclina e di  $50 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$  di nistatina.

Le piastre venivano poste a  $37^\circ \text{C}$ . per un periodo di 5 giorni, durante il quale veniva controllato l'eventuale sviluppo batterico.

Dall'11ª giornata, sospesa la somministrazione, venivano proseguiti gli accertamenti microbiologici accennati. Tali accertamenti furono protratti fino alla 15ª giornata dopo l'ultima somministrazione di coltura.

Le colonie rilevate, dopo l'incubazione a  $37^\circ \text{C}$ ., venivano isolate e sottoposte ad esame microscopico, previa colorazione del Gram, e seminate in brodo carota-fegato.

Isolamento di germi dalle feci eseguito durante

| Ceppi batterici              | Cane N. | Durata del trattamento e dell'isolamento espresso in giorni |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
|                              |         | 1                                                           | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <i>L. acidophilus</i> . . .  | 1       | +                                                           | — | + | + | + | + | + | + | — | +  |
|                              | 2       | —                                                           | + | — | — | + | — | + | — | + | —  |
|                              | 3       | +                                                           | + | + | + | + | + | + | + | + | +  |
| <i>L. casei</i> . . . . .    | 4       | +                                                           | + | — | — | + | + | + | + | + | +  |
|                              | 5       | +                                                           | — | — | + | + | + | — | — | — | +  |
|                              | 6       | —                                                           | — | — | — | + | + | — | — | + | —  |
| <i>L. bifidus</i> . . . . .  | 7       | +                                                           | + | + | + | + | — | + | + | + | +  |
|                              | 8       | —                                                           | + | — | — | + | — | — | + | — | —  |
|                              | 9       | +                                                           | — | + | — | — | + | + | — | — | +  |
| <i>B. subtilis</i> . . . . . | 10      | —                                                           | + | + | — | + | — | + | — | + | +  |
|                              | 11      | +                                                           | — | — | + | + | + | — | + | + | —  |
|                              | 12      | +                                                           | + | + | — | — | — | — | + | + | —  |

e dopo la somministrazione di colture batteriche

Durata dell'isolamento espressa in giorni

| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| +  | +  | —  | +  | —  | +  | +  | —  | —  | +  | —  | —  | +  | —  | +  |
| —  | +  | +  | +  | —  | —  | +  | —  | +  | +  | —  | —  | —  | +  | +  |
| +  | +  | +  | —  | +  | +  | +  | —  | —  | —  | +  | —  | —  | +  | —  |
| +  | —  | —  | —  | —  | —  | +  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  |
| +  | +  | —  | —  | +  | —  | +  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  |
| +  | —  | —  | —  | —  | +  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  |
| +  | +  | —  | +  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | —  | +  | —  | —  | +  |
| +  | —  | +  | +  | —  | +  | —  | —  | +  | +  | +  | —  | —  | +  | —  |
| —  | +  | —  | —  | —  | —  | +  | —  | —  | +  | +  | —  | —  | +  | —  |
| —  | +  | —  | +  | —  | +  | +  | —  | —  | —  | +  | —  | +  | —  | —  |
| —  | —  | —  | +  | +  | —  | +  | +  | +  | +  | —  | —  | +  | —  | —  |
| —  | +  | +  | —  | +  | —  | +  | —  | —  | +  | —  | +  | —  | —  | —  |

Su queste subcolture venivano eseguiti i seguenti accertamenti:

- 1) controllo microscopico, previa colorazione semplice e del Gram;
- 2) semina in brodo carota-fegato addizionato di 100  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> di tetraciclina;
- 3) semina in provettoni di latte;
- 4) semina in provette di agar e brodo normali (pH 6 per i lattobacilli e pH 7 per il *Bacillus subtilis*);
- 5) identificazione sierologica (prova delle precipitine).

L'esame microscopico, previa colorazione, doveva unicamente servire ad escludere la presenza di forme coccacee, elementi Gram negativi e miceti, da noi non impiegati nel corso di questo esperimento.

La semina in brodo carota-fegato addizionato di 100  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> di tetraciclina doveva confermare ulteriormente che la specie batterica isolata dalle feci possedeva le caratteristiche di resistenza del ceppo somministrato per via orale, e non poteva pertanto essere confusa con altre specie batteriche preesistenti nell'intestino.

Infatti gli accertamenti colturali, eseguiti per 30 giorni prima della somministrazione, non avevano mai evidenziato specie batteriche naturalmente resistenti ad una così elevata concentrazione di tetraciclina.

La semina in latte doveva evidenziare la caratteristica fermentazione propria dei lattobacilli, con formazione di un coagulo compatto senza siero e note di caseolisi.

La semina in brodo e agar normali doveva evidenziare le caratteristiche colturali delle singole specie isolate.

L'identificazione di specie veniva eseguita, solo per i lattobacilli, a mezzo di sieri precipitanti da noi preparati con gli stipiti impiegati in tali ricerche. Il *Bacillus subtilis* veniva identificato solamente per le sue caratteristiche morfologiche, colturali e di resistenza alla tetraciclina.

Nella tabella sono riportati i risultati ottenuti nel corso di dette ricerche.

#### CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.

Dall'analisi della tabella risulta chiaramente che tutte le mutanti batteriche tetraciclino-resistenti somministrate, hanno superato la barriera gastro-enterica e sono state isolate dalle feci dei cani trattati; tali mutanti hanno conservato tutte le caratteristiche sierologiche, biochimiche, colturali, morfologiche e di resistenza.

Inoltre, dalle feci dei cani trattati con queste mutanti tetraciclinoresistenti, è stato possibile isolare gli stipiti batterici anche dopo la cessazione della somministrazione delle colture.

In particolare il *Lactobacillus acidophilus* e il *Lactobacillus bifidus* sono stati isolati fino al 15° giorno dalla cessata somministrazione, il *Bacillus subtilis* fino al 13° giorno, mentre il *Lactobacillus casei* è stato repertato fino alla 7ª giornata.

Non sono stati presi in considerazione gli isolamenti batterici successivi al 15° giorno dalla cessata somministrazione, poichè gli stipiti isolati, pur presentando caratteristiche morfologiche, biochimiche e sierologiche riferibili alle specie impiegate, non dimostravano il grado di resistenza iniziale. Pertanto questi isolamenti non potevano essere ritenuti probativi; infatti lo studio preliminare della microflora fecale aveva evidenziato, a volte, la presenza di ceppi resistenti a 50  $\gamma/\text{cm}^3$  di tetraciclina. La diminuzione del grado di resistenza da noi riscontrato fa supporre che, in assenza di antibiotico, avvenga « in vivo » quanto descritto « in vitro » [BACHRACH (27)].

Dall'analisi della tabella si rileva inoltre che, pur non essendo stato possibile isolare tutti i giorni dalle feci le specie batteriche somministrate, queste sono state repertate anche dopo diversi giorni di negatività. I ceppi isolati non hanno lasciato dubbi circa la loro identità per il grado di resistenza alla tetraciclina (100  $\gamma/\text{cm}^3$ ), il comportamento sierologico, le attività biochimiche, le caratteristiche colturali e morfologiche. Si è così chiaramente stabilita la sopravvivenza e la eliminazione con le feci, anche dopo molti giorni dalla cessata somministrazione, di ogni mutante batterica; tali constatazioni sono l'espressione di un sicuro impianto intestinale e di « animalizzazione » degli stipiti impiegati in queste ricerche.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) METCHNIKOFF E. - Rev. Scien., 2 (1904).
- (2) COHENDY M. - Compt. Rend. Soc. Biol., 60: 364 (1906).
- (3) BELONOWSKY J. - Ann. Inst. Past., 24: 994 (1907).
- (4) WINKLER W. - Monatsheft. Landwirtsch., 2: 315 (1909).
- (5) WEINERT H. - Wien. Med. Wochenschr., 58: 754 (1907); 14: 74 (1908).
- (6) KATSCHI A. - Reichs. Med. Arz. Lipsia, 23 (1906).
- (7) LIEFMANN A. - Münch. Med. Wochenschr., 509 (1909).
- (8) BERDNIKOFF F. - Milchw. Centralbl., 447 (1912).
- (9) RÖSLER O. - Der Militarzt, 10 (1915).
- (10) MAZZARACCHIO V. - Rend. Ist. Sup. San., 11-6: 1528 (1948).

- (11) PERGHER G. - Ann. Ig., 38-41: 51 (1927).
  - (12) ROSEMBERG F. - Münch. Med. Wochenschr., 44 (1909).
  - (13) KLOTZ P. H. - Jahrbuch Kinderheilk., 17-61: 1 (1908).
  - (14) NARKIRIER K. A. - Inauguraldissert. Zürich, (1911).
  - (15) LUERSSEN A. e coll. - Centralbl. Bakt., 20: 234 (1908).
  - (16) OEHLER R. - Centralbl. Bakt., 30-2: 149 (1911).
  - (17) PUNTONI V. - Ann. Ig., 49: 533 (1939).
  - (18) RETTGER L. F. e coll. - Yale University Press. New Hawen, (1935).
  - (19) OLSEN E. - Ejor Munskgaard, Copenhagen, (1949).
  - (20) OLSEN E. - Dairy Science Abstr., 14: 782 (1952).
  - (21) BARBERO G. J. e coll. - J. Pediatrics, 40: 152 (1952).
  - (22) ORLA-JENSEN S. e coll. - Biol. Skrif., 3-4: 138 (1945).
  - (23) WINKELSTEIN H. A. - Am. Pract., 6-7: 1022 (1955).
  - (24) RAFSKY H. A. e coll. - Am. J. Gastroenterology, 24-1: 87 (1955).
  - (25) VON LORCH L. - Rend. Ist. Sup. San., 49: 598 (1956).
  - (26) NEGRI R. e coll. - Il Conv. Int. Stand. Immunomicr. - Ist. Sup. Sanità, Roma (1956).
  - (27) BACHRACH E. e coll. - Comp. Rend. Soc. Biol., 148: 1004 (1954).
-