

32. Geo RITA (*) e Franco SCANGA. — Azione dell'aureomicina e della diidrostreptomicina nell'infezione sperimentale del topino da *Brucella melitensis* (**).

Riassunto. — Gli AA. studiano l'efficacia dell'aureomicina, della diidrostreptomicina e della loro associazione nell'infezione sperimentale del topino con *Brucella melitensis*, a parità di dose l'aureomicina si dimostra più efficace della diidrostreptomicina; con l'impiego contemporaneo dei due antibiotici si ottengono i risultati migliori.

Résumé. — Les AA. étudient l'efficacité de l'auréomycine, de la dihydrostreptomycine et de l'association de ces deux substances dans l'infection expérimentale de la souris par *Brucella melitensis*. Ces recherches ont démontré que l'auréomycine est plus efficace, à dose égale, que la dihydrostreptomycine, celle-ci, toutefois, ayant l'avantage d'être exempte de tout effet toxique. L'auréomycine est absorbée et manifeste son activité thérapeutique lorsqu'elle est administrée par voie rectale.

On a constaté que l'association de l'auréomycine avec la dihydrostreptomycine est le type de traitement le plus efficace bien qu'elle ne soit pas suffisante, en général, à extirper entièrement l'infection; l'augmentation des germes présents dans la rate des animaux sacrifiés à des dates diverses après la cessation du traitement offre la base expérimentale et justifie la pratique suivie en thérapie humaine de continuer le traitement pendant un certain nombre de jours après la cessation de la fièvre et la disparition des symptômes.

Summary. — The authors studied the effectiveness of aureomycin, dihydrostreptomycin and their combination in experimental infections with *brucella melitensis* in mice. With equal doses aureomycin is more effective than dihydrostreptomycin while the best results are obtained with a combination of the two substances.

Zusammenfassung. — Die V.V. beobachteten die Wirkung des Auromicyns des Dihydrostreptomicyns und deren Association bei der experimentellen Infektion des Mäuschens durch *Brucelle melitensis*. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass das Auromicyn bei gleicher Dosis, wirksamer als das Dihydrostreptomicyn ist, letzteres hat aber keine toxisches Wirkung;

(*) Aiuto dell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma diretto dal Prof. Aldo Cimino.

(**) Lavoro comunicato al XIII Congresso di Igiene. (S. Remo, Ottobre 1949).

das Auromicyn wird absorbiert und übt seine therapeutische Wirkung aus wenn es rectal gegeben wird.

Die Association des Auromicyns mit dem Dihydrostreptomycin ergibt die wirksamste Behandlungsweise, wenn man auch in der Regel nicht die radikale Beseitigung der Infektion erzielt; die in verschiedenen Zeitabständen nach der Unterbrechung der Behandlung beobachtete Vermehrung der in der Milz der geopferteten Tiere anwesenden Keime, gibt die experimentelle Basis und rechtfertigt die in der menschlichen Therapie angewandte Praxis die Behandlung noch eine bestimmte Anzahl von Tagen fortzusetzen nachdem Fieberfreiheit eingetreten ist und die Symptome verschwunden sind.

I successi terapeutici ottenuti nell'infezione brucellare umana con l'aureomicina sono sorprendenti. SPINK e coll. (1) furono i primi a rilevare la efficacia curativa dell'aureomicina in 24 casi di Brucellosi umana da *Br. melitensis* trattati a Messico. Poi altri autori italiani - PALA (2), CONTI e CASSANO (3) - inglesi, GALPINE (4) - e americani (5), ottennero rapide guarigioni e i casi di brucellosi umana trattati con successo con l'aureomicina sono ormai abbastanza numerosi da permettere di affermare che per la prima volta siamo in possesso di una terapia veramente efficace. Dato però che l'azione di tale antibiotico, alle concentrazioni raggiungibili nel sangue, è fondamentalmente batteriostatica e dato che si sono avute ricadute in casi che clinicamente risultavano guariti, si è pensato di studiare, nell'infezione sperimentale brucellare, l'associazione dell'aureomicina con altri medicinali nel tentativo di giungere alla eradicazione del germe infettante.

La prima prova sperimentale, a quanto ci risulta, è quella di HEILMAN (6) che trattò, mediante associazione di 6 diversi medicinali, dei topini infettati con *Br. suis* e con *Br. abortus*.

I risultati migliori furono conseguiti dall'associazione dell'aureomicina con la diidrostreptomina; però anche con questo trattamento non tutte le brucelle furono soppresse.

Nel frattempo MAGOFFIN, ANDERSON e SPINK (7) comunicarono i risultati ottenuti con aureomicina, streptomina e sulfadiazina singolarmente usate e con le loro varie associazioni, nell'infezione sperimentale dell'embrione di pollo; mentre nell'infezione da *Br. abortus* le risposte migliori si hanno dall'associazione della streptomina con la sulfadiazina (vero sinergismo), in quelle da *Br. suis* e da *Br. melitensis* risulta più efficace l'associazione dell'aureomicina con la streptomina. Quest'ultima associazione inoltre è forse quella che più spesso conduce all'eradicazione dei germi dall'embrione infetto.

Prendendo lo spunto dai buoni risultati sperimentali ottenuti da Heilman, altri due ricercatori della Mayo Clinic, HERRELL e BARBER (8), applicarono all'uomo la terapia associata aureomicina - diidrostreptomina; in quattro pazienti con forme acute e gravi, due da *Br. suis* e due da *Br. abortus*, ebbero guarigioni rapide e stabili con pronta regressione in tutti i sintomi. In Italia, ROCCHI (8) ha trattato con successo mediante associazione aureomicina-diidrostreptomina un caso di infezione brucellare umana (probabilmente da *B. melitensis*) di vecchia data e resistente alle comuni forme di terapia; e GIUNCHI (9) ha ugualmente ottenuto pronta guarigione in due malati.

Da quanto abbiamo rapidamente esposto si vede che sperimentalmente solo nell'embrione di pollo è stata studiata l'associazione aureomicina-streptomina verso le tre specie di Brucelle patogene per l'uomo, mentre nel topino si è sperimentato solo con *Br. suis* e *Br. abortus*. E poichè in Italia prevalgono le forme di infezione brucellare da *Br. melitensis* noi abbiamo ritenuto utile studiare l'efficacia dell'aureomicina, della diidrostreptomina e della loro associazione nella infezione sperimentale del topino con uno stipo di nostro isolamento.

MATERIALE TECNICO.

Abbiamo usato un ceppo di *Br. melitensis* (ceppo Roberto) in fase perfettamente liscia di recentissimo isolamento e sensibile in vitro a 1 γ /cc. di aureomicina. Sospensione dei germi in sol. salina (sol. di Na Cl 0,85%) ottenuta riprendendo una patina di coltura su agar triptosio di 72 ore di incubazione a 37° C. Determinazione del numero dei germi all'opacimetro di Wellcome e aggiustamento della sospensione a 25 milioni di germi/cc.

Topini di peso vario da g 15 a g 20. Infezione per via peritoneale con cc 0,2 di sospensione microbica (= 5 milioni di germi).

Trattamento iniziato 48 ore dopo l'infezione e protratto per 8 giorni. Dopo 24 ore dalla fine del trattamento si sacrificano la metà dei topini sopravvissuti per ogni lotto; i rimanenti vengono sacrificati dopo altre 72 ore. Osservazione delle alterazioni microscopiche all'autopsia e semina di una goccia del sangue del cuore e della polpa splenica (strusciamento della superficie di taglio dell'organo) su piastre di agar triptosio; rilievo del modo di sviluppo dopo 7 giorni di incubazione a 37° C. Trattamento con aureomicina: si è prescelta la via rettale di somministrazione poichè dai dati biografici risulta che la via sottocutanea è irritante e meno efficace della via orale che d'altra parte è molto indaginosa e non permette una determinazione esatta della quantità effettivamente ingerita da ciascun animale. Allo scopo si preparavano soluzioni di aureomicina in acqua distillata contenenti mg 1 o 2/cc e di queste si somministravano cc 0,5 per topino, a seconda della

dose stabilita, usando siringa sul cui ago era stato raccordato un capillare di vetro a punta smussa della lunghezza di circa cm 4. Il trattamento è facile e gli animali ritengono bene il liquido; unica accortezza è di attendere che essi abbiano svuotato il retto del materiale fecale. Nel caso, piuttosto raro, che il liquido venga espulso, si ripete la somministrazione.

Trattamento con diidrostreptomina: diluire la soluzione in modo da avere il quantitativo desiderato nel volume di cc 0,5; le iniezioni vengono praticate per via sottocutanea.

SPERIMENTALE.

Si infettano 72 topini per via peritoneale (*Br. melitensis* ceppo Roberto) con 5 milioni di germi. Due topini muoiono in 24 ore per peritonite traumatica. I rimanenti 70 si suddividono in 8 lotti e vengono trattati come indicato nella seguente tabella riassuntiva.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.

I risultati dei presenti esperimenti ci sembrano notevoli. Occorre, per inquadrarli convenientemente, fare alcune considerazioni.

La via rettale di somministrazione dell'aureomicina si è dimostrata efficace. Questa via può trovare utile applicazione nella terapia umana quando sia preclusa la via orale o per particolare stato di gravità del paziente o per la sua tenera età o per vomito legato sia alla malattia da curare (ad es. pertosse) sia ad intolleranza del farmaco.

Le dosi di aureomicina da noi impiegate hanno probabilmente manifestato effetti tossici e ciò, nel caso particolare, ci sembra dovuto a due ragioni: il peso dei topini — circa una metà dei nostri animali pesava g 15 — e la singola dose troppo forte. E' possibile eliminare questo secondo inconveniente frazionando maggiormente la dose, cosa che noi non abbiamo potuto fare per cause indipendenti dalla nostra volontà; e per questo abbiamo dovuto praticare al primo, secondo e settimo giorno di trattamento una sola somministrazione.

Gli effetti tossici si svelano con comparsa di diarrea e con una più alta letalità.

La diidrostreptomina alle dosi usate non ha dimostrato effetti tossici.

L'infezione è stata realizzata con 5 milioni di Brucelle per via peritoneale, dose con la quale gli animali non muoiono per l'infezione nel periodo di durata dell'esperimento.

Le tre morti nel lotto di controllo sono dovute a cause intercorrenti. Abbiamo preferito la piccola carica microbica ad una massima per escludere lo

TABELLA RIASSUNTIVA

N° TOPINI	TRATTAMENTO	RISULTATI	Volume milza				Cultura milza						Cultura sangue					OSSERVAZIONI	
			-	+	++	+++	she.	rare	molte	s.conf.	conf.	ste.	rare	molte	s.conf.	conf.			
11	cc. 0,2 sospensione batterica	3 morti (5° - 9° g.) 4 uccisi dopo 10 gg. 4 uccisi dopo 14 gg.				4										4			animali piccoli 1 cultura inquinata
6	cc. 0,2 sospensione batterica + aur. mg 1	4 morti (9° - 14° g.) 1 ucciso dopo 10 gg. 1 ucciso dopo 14 gg.		1															1 perforaz. intestin. 1 cultura inquinata
5	cc. 0,2 sospensione batterica + aur. mg 0,5	3 morti (9° - 14° g.) 1 ucciso dopo 10 gg. 1 ucciso dopo 14 gg.		1															1 cultura inquinata
6	cc. 0,2 sospensione batterica + diid. mg 1	3 uccisi dopo 10 gg. 3 uccisi dopo 14 gg.		1	3														
6	cc. 0,2 sospensione batterica + diid. mg 0,5	3 uccisi dopo 10 gg. 3 uccisi dopo 14 gg.			1	2													
12	cc. 0,2 sospensione batterica + aur. mg 1 e diid. mg 1	4 morti (9° - 14° gg.) 5 uccisi dopo 10 gg. 3 uccisi dopo 14 gg.	5																1 trauma 1 cultura inquinata
12	cc. 0,2 sospensione batterica + aur. mg 1 e diid. mg 0,5	4 morti (7° - 10° g.) 4 uccisi dopo 10 gg. 4 uccisi dopo 14 gg.	4																2 piccoli
12	cc. 0,2 sospensione batterica + aur. mg 0,5 e diid. mg 1	2 morti (8° e 14° g.) 6 uccisi dopo 10 gg. 4 uccisi dopo 14 gg.	6	1															1 piccolo

effetto tossico. Quindi il rilievo dell'efficacia terapeutica è basato sul volume della milza e, più, sul risultato delle semine del sangue del cuore e della polpa splenica.

D'altra parte abbiamo iniziato i trattamenti 48 ore dopo l'infezione per mettere in evidenza l'efficacia curativa vera e propria dei farmaci piuttosto che quella preventiva.

I risultati sono evidenti: l'aureomicina da sola alle dosi di mg 13 e 6,5 riduce notevolmente il numero delle colonie che si sviluppano dal sangue e dalla polpa splenica; la diidrostreptomycinina da sola a parità di dosi risulta molto meno efficace.

Le diverse associazioni dell'aureomicina con la diidrostreptomycinina risultano più attive dei due medicamenti singolarmente usati, ottenendosi i migliori risultati dall'associazione di mg 13 di aureomicina con mg 6,5 di diidrostreptomycinina. Con il trattamento associato si hanno delle semine di polpa splenica sterili, ciò che non avviene mai con i trattamenti singoli. Questo non autorizza a concludere che nei topini che così si sono comportati, l'infezione fosse eradicata; certo però che la quantità dei germi era notevolmente ridotta. D'altra parte nei topini sacrificati al 14° giorno si rileva in genere la presenza di una quantità di germi superiore a quella riscontrata negli animali dei corrispondenti lotti e sacrificati all'11° giorno.

CONCLUSIONE

Nella infezione sperimentale del topino da *Br. melitensis* l'aureomicina si dimostra più efficace, a parità di dose, della diidrostreptomycinina, questa però non dà effetti tossici; l'aureomicina viene assorbita ed esplica la sua attività terapeutica se somministrata per via rettale.

L'associazione della aureomicina con la diidrostreptomycinina risulta il tipo di trattamento più efficace, pur non portando, in linea di massima, alla eradicazione dell'infezione; l'aumento del numero dei germi presenti nell'a milza degli animali sacrificati a diversa distanza dalla sospensione del trattamento offre la base sperimentale e giustifica la prassi seguita nella terapia umana di proseguire il trattamento per un certo numero di giorni dopo lo sfebbramento e la scomparsa dei sintomi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) SPINK W. W., BRAUDE J. A., CASTANEDA R. M. a. GOYTIA S. R. - Aureomycin therapy, in human Brucellosis due to *Brucella melitensis*. - J.A.M.A. 138 - 1145 (1948).
 - 2) PALA A. - Brucellosi ed Aureomicina - Gazz. Intern. Med. e Chir. 53 - 4 (1949).
 - 3) CONTI F. e CASSANO A. - La cura della brucellosi con l'aureomicina - Rif. Med. 53 - 681 (1949).
 - 4) GALPINE, J. F. - A case of abortus infection treated with aureomycin. - Brit. Med. J. - 1 - 1037 (1949).
 - 5) BOYD H. a. PRIGNANO J. - Brucellosis treated by aureomycin; case report. - Connecticut Med. J. - 13 - 435 (1949).
 - 6) HEILMAN R. F. - The effect of continued treatment with aureomycin and dihydrostreptomycin on *Brucella* infections in mice. - Proc. of the Staff Meetings of the Mayo Clinic - 24 - 133 (1949).
 - 7) MAGOFFIN R., ANDERSON D. a. SPINK W. W. - Therapy of experimental brucella infection in the developing chick embryo. - J. Immun. - 62 - 125 (1949).
 - 8) HERREL W. E. a. BARBER T. E. - The combined use of aureomycin and dihydrostreptomycin in the treatment of brucellosis. - Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic. - 24 - 138 - (1949).
-