

40. L. RAVAIOLI - R. NEGRI. — Ricerche sperimentali “in vitro” sull’azione della cloromicetina nei confronti del virus vaiolo vaccino, del virus aftoso, e del virus rabido fisso.

Riassunto. — Dati gli scarsi lavori sull’argomento gli AA. hanno voluto saggiare l’azione della cloromicetina sui virus usando la tecnica della sensibilizzazione «in vitro». Con tale metodo usato su tre virus diversi essi hanno potuto constatare l’assenza completa di ogni attività da parte della cloromicetina sia sul virus vaiolo vaccino che della febbre aftosa, mentre, contrariamente ad esperienze di altri AA. essi hanno visto come il virus rabido fisso possa venire, a dosi non elevate, neutralizzato «in vitro» dall’attività dell’antibiotico.

Résumé. — Après un bref compte rendu bibliographique des rares travaux parus jusqu’à présent sur l’action de la chloromycétine sur les virus, les Auteurs se mettent en devoir d’illustrer leurs expériences.

Adoptant la technique de la sensibilisation *in vitro* entre doses graduellement diminuant de virus et doses graduellement de chloromycétine, ils parviennent aux conclusions suivantes par rapport aux trois virus soumis à examen :

1) Le virus de la vaccine n’est aucunement influencé par l’antibiotique, ce qui est d’accord avec ce que d’autres Auteurs avaient déjà constaté et rapporté.

2) Le virus de la fièvre aphteuse A Waldmann ne subit aucune diminution de virulence, ni pour ce qui regarde l’apparition de l’aphte primaire, ni en généralisant.

3) Le virus rabide fixe au contraire, à l’opposé de ce qu’ont rapporté d’autres Auteurs, est susceptible, à des doses déterminées, d’être inactivé par la chloromycétine et rendu par conséquent incapable d’infecter et de tuer le lapin.

Summary. — After a brief review of the bibliography of the small number of papers on the action of chloromycetin on viruses which have appeared up to date the authors describe their own experiments.

Using the «in vitro» sensibilisation technique with graded doses of viruses and gradual doses of chloromycetin the authors come to the following conclusions with regard to the three viruses studied :

1) The vaccinia virus is not influenced by the antibiotic; this is in agreement with the finding of other authors.

2) The virus of the foot and mouth disease fever A. Waldmann does not show any decrease in virulence, neither in the appearance of the primary aphta nor the general infection.

3) Contrary of the finding of other authors, the fixed rabies virus was found to be inactivated by certain doses of chloromycetin and thus to be rendered incapable to infect and kill the rabbit.

Zusammenfassung. — Nach einer kurzen Übersicht der wenigen einschlägigen Literaturangaben berichten Verff. Über die Wirkung des Chloromycetins auf die verschiedenen Virusgattungen auf Grund eigener Versuche. Sie arbeiteten nach der Technik des Sensibilisierung «in vitro» mit zu- und abnehmenden Mengen Virus und Chloromycetin und gelangten zu den folgenden Schlussfolgerungen:

1) Virus Blattern-Impstoff wird in keinerlei Weise durch das Chloromycetin beeinflusst. Dies entspricht übrigens den bereits beschriebenen Erfahrungen anderer Forscher.

2) Der Virus des Afta-Fieber A. Waldman weist keine Abnahme der Virulenz auf, weder in der Bestimmung der primären Afta noch im Allgemeinen.

3) Der Virus Rapido fisso kann hingegen in bestimmten Dosen durch Chloromycetin passiviert werden und somit daran gehindert werden Kaninchen zu infizieren und zu töten. Dies steht im Widerspruch zu den bisherigen Mitteilungen anderer Forscher.

Numerosi lavori sperimentali e una notevole casistica clinica hanno ormai resa indiscussa l'efficacia terapeutica della cloromicetina nei confronti di malattie infettive sostenute da agenti eziologici ascrivibili al gruppo dei germi Gram-negativi e alle rickettsie. Dalle ricerche sperimentali e dai risultati clinici — a noi noti — si è invece ancora incerti nell'esprimere un giudizio per quanto riguarda l'azione di questo nuovo antibiotico nei confronti dei virus e delle malattie da essi sostenute.

Secondo MC. LEAN e coll. (1) i virus del vaiolo, varicella, rabbia e poliomielite, sarebbero insensibili all'azione della cloromicetina; il virus influenzale A (PR 8) sarebbe scarsamente influenzato, mentre i virus influenzali A, A₁, B, risulterebbero completamente insensibili.

Secondo i suddetti autori nessuna azione avrebbe inoltre la cloromicetina verso il virus della malattia di Newcastle e il virus della laringo-tra-

cheite. Azione positiva avrebbe invece nei confronti dei virus del gruppo psittacosi-linfogranuloma venereo.

SMADDEL e JACKSON (2) confermerebbero i risultati ottenuti da MC. LEAN e coll. per quanto riguarda i virus del gruppo psittacosi-linfogranuloma venereo, mentre nulli sarebbero i risultati nei confronti del virus influenzale tipo A e verso il tipo St. Louis del virus dell'encefalite e verso il virus fisso della rabbia.

PARTE SPERIMENTALE

A motivo dell'incertezza che ancora regna per quanto riguarda la azione della cloromicetina verso i virus, e per i pochi lavori fatti sull'argomento, abbiamo creduto opportuno svolgere una serie di ricerche sperimentali « in vitro » sull'azione della cloromicetina nei confronti del virus vaiolo-vaccino, del virus aftoso e del virus rabido fisso.

L'azione della cloromicetina sui virus vaiolo-vaccino e rabido fisso è stata provata e descritta in lavori ai quali abbiamo già accennato, mentre non ci risulta che sia ancora stato sperimentato con il virus della febbre aftosa.

E' noto da lungo tempo come i virus vengano neutralizzati « in vitro » da prolungati contatti coi sieri specifici iperimmuni. Lo dimostrarono infatti BRIDRÉ e BOUQUET nella schiavina (3), BABES e LEPP, TIZZONI e CENTANNI, PFEILER, KAPFERBERG e FERMI nella rabbia (3), BÉCLÈRE, CHAMBON e MÉNARD (4) nel vaiolo vaccino per non citare che i più noti.

In considerazione di quanto dimostrato dai su citati autori, abbiamo creduto opportuno usare la tecnica di sensibilizzazione « in vitro » sostituendo i sieri iperimmuni specifici con la cloromicetina.

Virus vaiolo-vaccino.

Il ceppo usato per queste esperienze è quello ISTISAN capace di dare pustola specifica a titolo di 1/10.000 per cuti-infezione al coniglio. Per stabilire l'attività dell'antibiotico su detto virus abbiamo seguito la seguente tecnica:

1 cc. di vaiolo vaccino glicero-fenicato venne diluito in soluzione cloruro sodica al 0,85% ai titoli di 1:100 e 1:1.000. Un centimetro cubico di tali diluizioni venne messo rispettivamente a contatto « in vitro » e per 5h. con 1 cc. di acqua bidistillata sterile contenente rispettivamente 1 γ , 10 γ , 100 γ , e 1 mgr. di cloromicetina.

Con 1 cc. di ognuna di queste diluizioni (cloromicetina + virus) vennero infettati con il metodo della cutiscarificazione due conigli.

Gli animali vennero tenuti in ambiente caldo e dopo 72-96h. fu fatta la lettura dei risultati. La tabella n. 1 riporta schematicamente gli esiti della

cuti-infezione. Da essa risulta evidente come la cloromicetina, nelle dosi usate e con la tecnica sopra descritta, non espliciti alcuna evidente azione inibente sulle diluizioni di virus vaiolo-vaccino preso in esame.

I nostri risultati concordano quindi pienamente con quanto riportano MC LEAN e coll. (1).

TABELLA 1

V A I O L O

Azione della cloromicetina "in vitro" sul virus vaiolo vaccino ceppo "ISTISAN".

N. prove eseguite	Quantità di cloromicetina usata per cc.	Diluizione del virus vaccino	Diluizione reale del virus	Tempi di contatto tra cloromicetina e virus	MEDIA dei risultati ottenuti dopo 4 giorni dalla infezione per cutiscarificazione su conigli.
1	1 γ	1 : 100	1 : 200	5 h.	13 pustole
2	10 γ	1 : 100	1 : 200	"	13 "
3	100 γ	1 : 100	1 : 200	"	8 "
4	1 mgr.	1 : 100	1 : 200	"	5 "
5	1 γ	1 : 1000	1 : 2000	"	1 "
6	10 γ	1 : 1000	1 : 2000	"	2 "
7	100 γ	1 : 1000	1 : 2000	"	1 "
8	1 mgr.	1 : 1000	1 : 2000	"	1 "
9	—	—	1 : 200	—	9 "
10	—	—	1 : 200	—	10 "
11	—	—	1 : 200	—	12 "
12	—	—	1 : 2000	—	3 "
13	—	—	1 : 2000	—	2 "
14	—	—	1 : 2000	—	3 "

Virus aftoso.

Il virus aftoso usato per queste ricerche è un ceppo A WALDMANN patogeno per la cavia, e tale da determinare l'afta primaria in meno di 20h e la generalizzazione in 24-48h.

100 mgr. di epitelio aftoso vennero spappolati in un mortaio e diluiti in soluzione fisiologica in modo da avere rispettivamente 1 mgr. e 100 γ di epitelio aftoso per cc., mentre 1 γ, 10 γ, 100 γ, e 1 mgr. di cloromicetina vennero sciolti rispettivamente in 1 cc. di acqua bidistillata sterile. Un centimetro cubico della soluzione fisiologica contenente rispettivamente un mgr. e 100 γ di epitelio aftoso, fu messo a contatto « in vitro » e per 5h. a temperatura ambiente con 1 cc. di acqua bidistillata contenente 1 γ, 10 γ,

100 γ e 1 mgr. di cloromicetina. Dopo tale periodo di contatto le singole diluizioni (cloromicetina + virus) vennero usate per infettare per via intradermo-plantare (metodo Mazzaracchio) (5) cavie maschio del peso di 400-450 gr.

Dalla tabella n. 2 risulta chiaramente che la cloromicetina non ha svolto azione alcuna nei confronti del virus aftoso anche se usata ad alte dosi (1 mgr). Essa non ha nè evitato l'infezione nè ritardato la generalizzazione del virus.

Virus rabido.

Per stabilire l'attività della cloromicetina nei confronti del virus rabido fisso abbiamo seguito la stessa tecnica descritta nelle prove precedenti.

Si è usato il virus rabido fisso, ceppo ISTISAN, capace di uccidere il coniglio in sesta-settima giornata per inoculazione endocranica alla dose di 2 γ , da noi considerata come dose minima mortale.

Mgr. 100 del virus vennero spappolati in un mortaio e diluiti in soluzione fisiologica in modo da avere diluizioni contenenti per cc. rispettivamente 1 mgr. e 100 γ . La cloromicetina venne sciolta in acqua bidistillata in modo da avere per ogni cc. 1 mgr., 100 γ , 10 γ , e 1 γ .

Tali diluizioni furono rispettivamente messe a contatto a temperatura ambiente per 5 h. Dopo tale periodo di contatto vennero inoculati i conigli per via endocranica con cc. 0,20 dei vari mestru. Gli animali ricevettero così: un gruppo 100 γ e l'altro 10 γ di virus rabido fisso rimasto a contatto per 5 h. con dosi scalari di cloromicetina (vedi tabella n. 3).

Dalla lettura di tale tabella è possibile rilevare come quantitativi di 1 mgr. di virus fisso non siano per nulla influenzati anche dalla dose massima della cloromicetina (1 mgr.) con cui sono venuti a contatto. Tutti i conigli dal numero 1 al 12 morirono di rabbia nello stesso periodo dei controlli (conigli numero 37, 38, 39). Invece con dosi di 100 γ di virus fisso la cloromicetina esplicò una azione nettamente inibitrice ad iniziare da dosi di 100 per cc. in su. Infatti i conigli dal numero 26 al numero 30 inoculati con cc. 0,20 di mestruo contenente 100 γ di virus fisso per cc., e 100 γ di cloromicetina per cc. sopravvissero tutti oltre i 15 giorni.

Così pure i conigli dal n. 31 al 36 (tranne quello contrassegnato col n. 34), trattati con cc. 0,20 di mestruo contenente 100 γ di virus e 1 mgr. di cloromicetina non si infettarono di rabbia e sopravvissero oltre i 15 giorni.

I conigli di controllo invece, dal n. 40 al 44, trattati con 10 γ di solo virus fisso, morirono in sesta-settima giornata.

Dalle prove sopra descritte e riportate schematicamente nella tabella n. 3 risulta chiaramente che lo stesso quantitativo di virus (10 γ), non è

TABELLA 2

VIRUS AFTOSO

Azione della cloromicetina "in vitro" nel Virus AFTOSO A - WALDEMANN

Numero prove eseguite	Quantità di cloromicetina per cc.	Quantità di virus Aftoso	Tempi di contatto tra cloromicetina e virus	Lettura dei risultati ottenuti nelle cavie trattate per via intradermo-plantare dopo :						
				15 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	dopo 10 giorni dal trattamento
1	1 γ	1 mgr.	5 h.	a. p.	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
2	"	"	"	a. p.	gen.	+	—	—	—	—
3	"	"	"	a. p.	gen.	+	—	—	—	—
4	10 γ	1 mgr.	5 h.	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
5	"	"	"	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	"
6	"	"	"	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	"
7	100 γ	1 mgr.	5 h.	a. p.	gen.	+	—	—	—	—
8	"	"	"	a. p.	gen.	+	—	—	—	—
9	"	"	"	a. p.	a. p.	gen.	+	—	—	—
10	1 mgr.	1 mgr.	5 h.	a. p.	a. p.	gen.	+	—	—	—
11	"	"	"	—	a. p.	a. p.	gen.	+	—	—
12	"	"	"	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
13	1 γ	1 mgr.	5 h.	a. p.	gen.	gen.	gen.	+	—	—
14	"	"	"	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	+	—
15	"	"	"	—	a. p.	a. p.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
16	10 γ	100 γ	5 h.	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
17	"	"	"	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	"
18	"	"	"	—	—	a. p.	gen.	gen.	gen.	"
19	100 γ	100 γ	5 h.	a. p.	a. p.	a. p.	a. p.	a. p.	gen.	sopravvive
20	"	"	"	a. p.	a. p.	a. p.	a. p.	a. p.	gen.	"
21	"	"	"	—	a. p.	guarita	—	—	—	"
22	1 mgr.	100 γ	5 h.	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
23	"	"	"	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	"
24	"	"	"	—	a. p.	a. p.	guarita	—	—	"
25	—	500 γ	—	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
26	—	"	—	a. p.	gen.	gen.	+	—	—	—
27	—	"	—	gen.	gen.	gen.	+	—	—	—
28	—	50 γ	—	a. p.	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	sopravvive
29	—	"	—	a. p.	a. p.	gen.	guarita	—	—	"
30	—	"	—	—	a. p.	gen.	gen.	gen.	gen.	"

VIRUS RABIDO FISSO

Azione "in vitro" della cloromicetina sul virus rabido fisso ceppo « ISTISAN »

Numero delle prove eseguite	Quantità di cloromicetina per cc.	Quantità di virus fisso per cc.	Tempi di contratto tra cloromicetina e virus	Quantità reale di virus iniettata	ESITO
1	1 γ	1 mgr.	5 h.	100 γ	Morto di rabbia in 5 ^a giornata
2	"	"	"	"	" " " " 7 ^a " "
3	"	"	"	"	" " " " 5 ^a " "
4	10 γ	1 mgr.	5 h.	100 γ	Morto di rabbia in 5 ^a giornata
5	"	"	"	"	" " " " " "
6	"	"	"	"	" " " " " "
7	100 γ	1 mgr.	5 h.	100 γ	Morto di rabbia in 5 ^a giornata
8	"	"	"	"	" " " " " "
9	"	"	"	"	" " " " " "
10	1 mgr.	1 mgr.	5 h.	100 γ	Morto il giorno seguente l'inocul. (trauma)
11	"	"	"	"	Morto di rabbia in 5 ^a giornata
12	"	"	"	"	" " " " " "
13	1 γ	100 γ	5 h.	10 γ	Morto il giorno success. all'inocul. (trauma)
14	"	"	"	"	Morto di rabbia in 6 ^a giornata
15	"	"	"	"	Sopravvive oltre i 15 giorni
16	"	"	"	"	Morto di rabbia in 6 ^a giornata
17	"	"	"	"	" " " " " "
18	"	"	"	"	" " " " 7 ^a " "
19	10 γ	100 γ	5 h.	10 γ	Morto di rabbia in 6 ^a giornata
20	"	"	"	"	Sopravvive oltre i 15 giorni
21	"	"	"	"	" " " " " "
22	"	"	"	"	Morto di rabbia in 5 ^a giornata
23	"	"	"	"	" " " " 6 ^a " "
24	"	"	"	"	" " " " 7 ^a " "
25	100 γ	100 γ	5 h.	10 γ	Morto il giorno seguente l'inocul. (trauma)
26	"	"	"	"	Sopravvive dopo 15 giorni
27	"	"	"	"	" " " " " "
28	"	"	"	"	" " " " " "
29	"	"	"	"	" " " " " "
30	"	"	"	"	" " " " " "
31	1 mgr.	100 γ	5 h.	10 γ	Sopravvive oltre i 15 giorni
32	"	"	"	"	" " " " " "
33	"	"	"	"	" " " " " "
34	"	"	"	"	Morto di rabbia in 7 ^a giornata
35	"	"	"	"	Sopravvive oltre i 15 giorni
36	"	"	"	"	" " " " " "
37	—	—	—	100 γ	Morto di rabbia in 5 ^a giornata
38	—	—	—	"	" " " " 5 ^a " "
39	—	—	—	"	" " " " 5 ^a " "
40	—	—	—	10 γ	" " " " 6 ^a " "
41	—	—	—	"	" " " " 7 ^a " "
42	—	—	—	"	" " " " 7 ^a " "
43	—	—	—	"	" " " " 6 ^a " "
44	—	—	—	"	" " " " 7 ^a " "
45	—	—	—	"	Sopravvive oltre i 15 giorni
46	1 mgr.	—	—	—	" " " " " "
47	"	—	—	—	" " " " " "
48	"	—	—	—	" " " " " "

stato capace — in conseguenza del contatto avuto «in vitro» con la cloromicetina — di infettare e di uccidere i conigli.

E' pertanto bene evidente come due siano i principali fattori che vicendevolmente si influenzino nell'evitare l'infezione: la virus-carica e il quantitativo di cloromicetina che ne viene a contatto.

Come già abbiamo riportato sopra, mentre un quantitativo di 1 mgr. di virus fisso non è per nulla influenzato anche da dosi elevate di cloromicetina (1 mgr.), una carica di virus di 100 γ viene neutralizzata «in vitro» anche da dosi meno elevate di antibiotico (100 γ). Avendo noi inoculato cc. 0,20 del mestruo virus + cloromicetina, la quantità reale di virus iniettata e neutralizzata dalla cloromicetina è stata di 10 γ .

Possiamo quindi affermare che l'antibiotico alla dose di 100 γ è riuscito a neutralizzare 5 d.m.m. di virus rabido fisso.

CONCLUSIONI

Da queste ricerche preliminari circa l'azione della cloromicetina nei confronti dei virus sopra detti, usando la tecnica della sensibilizzazione «in vitro», possiamo trarre le seguenti conclusioni:

1) *Virus vaiolo-vaccino*:

la cloromicetina usata anche a dosi massive (1 mgr.) non è riuscita a neutralizzare «in vitro» elevate diluizioni di virus (1:2.000) e quindi ad evitare l'infezione specifica nel coniglio. I nostri risultati concordano pienamente con quelli di MC LEAN e coll. (1);

2) *Virus aftoso A Waldmann*:

L'antibiotico in questione usato ad alte dosi (1 mgr.), non ha svolto azione alcuna «in vitro» nei confronti anche di minime dosi (1 γ) di questo ceppo aftoso: esso non ha nè evitato la formazione dell'afte primaria nella cavia, nè ritardato la generalizzazione del virus.

3) *Virus rabido fisso*:

la cloromicetina usata a dosi elevate (1 mgr.) non è riuscita minimamente ad influenzare «in vitro» dosi di 1 mgr. di virus fisso che hanno costantemente portato a morte i conigli in sesta-settima giornata con chiara sintomatologia rabida.

Invece a dosi anche inferiori (100 γ), l'antibiotico è riuscito a neutralizzare «in vitro» una virus-carica di 100 γ . Tale virus-carica (100 γ) pari

a 5 d.m.m. reali iniettate, a motivo della cloromicetina, non è stata capace d'infectare e di provocare la morte di rabbia a 10 conigli su 11 trattati.

I risultati delle nostre ricerche non concordano quindi con quanto avevano riferito Mc LEAN e coll. (1), SMADEL e JACKSON (2).

Roma, Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) J. Clin. Inv. 28, 953, 1949.
 - 2) Fed. Proc. 7, 280 (Mar.), 1948.
 - 3) Science 106, 418 (Oct. 31) 1947, vol. 1, 287-517, 1949.
 - 4) Ann. Inst. Pasteur, 1896, 10, 1; 1899, 13, 81.
 - 5) Rendiconti Ist. Sup. Sanità, vol. 1, parte 1, 1938.
-