

41. R. NEGRI - L. RAVAIOLI. — Sensibilità dell'*actinobacillus lignieresii* alla cloromicetina.

Riassunto. — In base alle recenti conoscenze sull'attività della cloromicetina nei confronti dei germi Gram-negativi, gli AA. hanno voluto saggiare la sensibilità dell'*actinobacillus lignieresii* all'antibiotico.

Dalle prove eseguite, con la tecnica dell'agar-germi si è visto come l'*actinobacillo* abbia uno spettro antibiotico assai simile a quello delle salmonelle. In conseguenza di ciò gli AA. ritengono che la cloromicetina possa divenire in un prossimo futuro il medicamento specifico contro l'*actinobacilloso* bovina.

Résumé. — Se rapportant aux connaissances acquises récemment sur l'activité de la chloromycétine vis-à-vis des germes Gram-négatifs, les Auteurs ont voulu éprouver la sensibilité de l'*Actinobacillus lignieresii* par rapport à cet antibiotique.

Par suite des épreuves exécutées, avec la technique de l'agar-germes, on a constaté que l'*actinobacille* a un spectre antibiotique très approchant de celui des salmonelles. Les Auteurs estiment en conséquence que la chloromycétine peut devenir, dans un prochain avenir, le médicament spécifique de l'*actinobacilloso* des boeufs.

Summary. — In view of the recently published information on the activity of chloromycetin on Gram-negative bacteria the authors have determined the sensitivity of *Actinobacillus lignieresii* to the antibiotic.

Using the seeded agar technique the authors showed that sensitivity of the *Actinobacillus* to antibiotics was very similar to that of the salmonella group. Consequently, the authors consider that chloromycetin may in the near future become a specific drug against bovine actinobacillosis.

Zusammenfassung. — Auf der Grundlage der neuesten Kenntnisse der Wirkung des Chloromyzetins auf Gram-negative Keime haben Verff. die Empfindlichkeit des Aktinobazillus dieser antibiotischen Substanz gegenüber geprüft. Die mit der Technik der Agar Keime ausgeführten Versuche haben ergeben dass der Aktinobazillus ein dem der Salmonella sehr ähnliches antibiotisches Spektrum besitzt. Demzufolge nehmen Verff. an dass sehr bald das Chloromyzetin das berufene Heilmittel gegen die Rinderaktinobazilloso werden dürfte.

In questi ultimi tempi, la scoperta di nuovi antibiotici, ha reso più vaste le possibilità e i successi terapeutici nei confronti di numerose malattie sia nel campo umano che veterinario, sostenute da agenti eziologici del gruppo dei germi Gram-negativi, dalle rickettsie e di alcuni virus. Fino a poco tempo fa tali malattie venivano combattute più che altro con misure di carattere igienico-profilattico, con terapie sintomatiche e con terapie che si presumevano specifiche (sulfamidici, arsenobenzoli, ac. paraminobenzoico, vaccini, ecc.) sulle quali però non si poteva fare sicuro affidamento. La stessa streptomicina che «in vitro» aveva dimostrato una buona attività antibiotica nei confronti di numerosi germi Gram-negativi, non diede — in pratica — i risultati che si speravano. Invece, netta affermazione sia «in vitro» che «in vivo» ha dato la cloromicetina nei confronti dei germi Gram-negativi, delle rickettsie e di alcuni virus (vedi nota sintetica di uno di noi) (1).

Questo nuovo antibiotico è stato ricavato da Ehrlich e coll. (2) da uno speciale streptomycete che era stato isolato dal dott. Paul BURKHOLDER dell'Università di Yale, da un campione di terreno prelevato nei pressi di Caracas e denominato per l'appunto *Streptomyces Venezuelae* (2).

Ai primi del 1949, la cloromicetina fu sintetizzata per la prima volta in America da CONTROULIS e coll. (3) e recentemente anche in Italia, dai ricercatori di alcune grandi Case Farmaceutiche.

PARTE SPERIMENTALE

Poichè dagli spettri antibiotici ottenuti nei confronti di numerosi germi Gram-negativi e Gram-positivi da MC. LEAN (4), SMITH (5), GOTTLIEB (6) non risulta essere stata saggiata la sensibilità dell'actinobacillo di LIGNIÈRES e SPITZ alla cloromicetina, abbiamo creduto opportuno svolgere delle ricerche in tale senso su alcuni ceppi di actinobacillo. Nello stesso tempo abbiamo saggiato e controllato la sensibilità di numerosi germi della collezione dell'Istituto i cui spettri antibiotici sono riportati nella colonna 4 della tabella n. 1.

Come è noto, l'actinobacillo di LIGNIÈRES e SPITZ, è l'agente eziologico responsabile di una malattia infettiva che colpisce quasi esclusivamente i bovini: l'actinobacilloso. Tale malattia, simile, ma nettamente differenziabile anche clinicamente dall'actinomicosi, è caratterizzata da formazione di ascessi nel connettivo sottocutaneo e da interessamento dei gangli linfatici regionali.

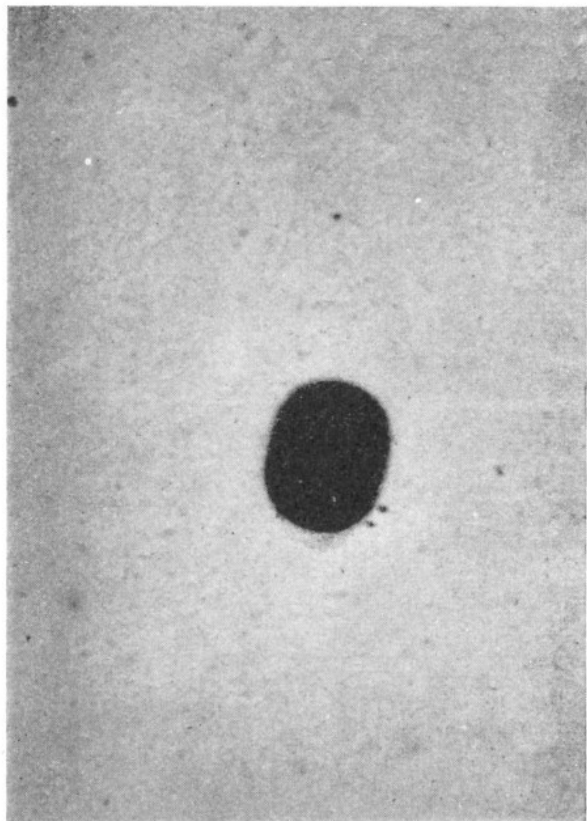
Circa la possibilità di infezione da parte dell'uomo, essa pur essendo possibile (7), non è però tale da poter considerare la malattia una zoonosi.

Il germe in questione si presenta per lo più sotto forma cocco-bacillare,

della lunghezza di $0,4-1\mu$ e alle volte, specie nei terreni colturali, in forma filamentosa (v. fotografie n. 1, 2, 3, 4); è immobile, aerobio e Gram-negativo.

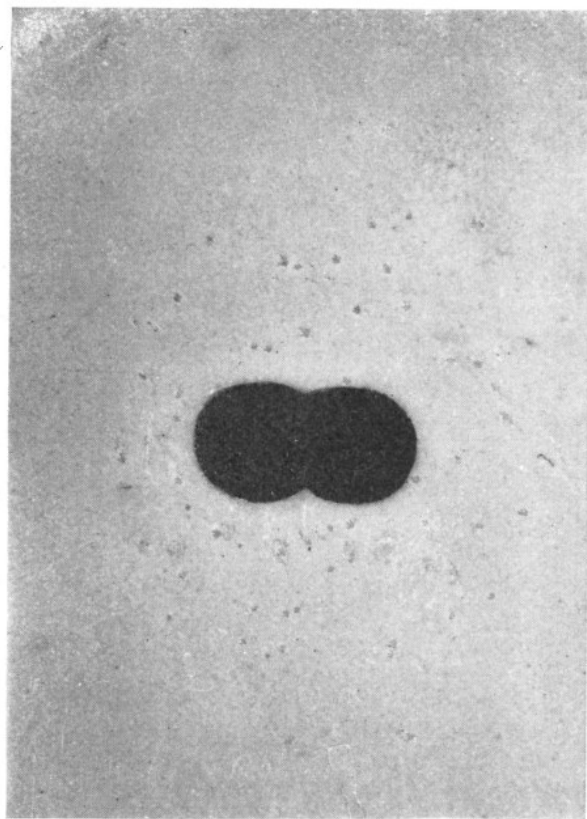
Le colture riescono facilmente anche sui normali terreni in aerobiosi e con rapido sviluppo (12-24h.).

Per saggiare la sensibilità sia dell'actinobacillo che degli altri germi



FOTOGRAFIA N. 1

Actinobacillo: brodocoltura di 12 h.,
forma coccacea ($\times 18.000$ - microscopio
elettronico)



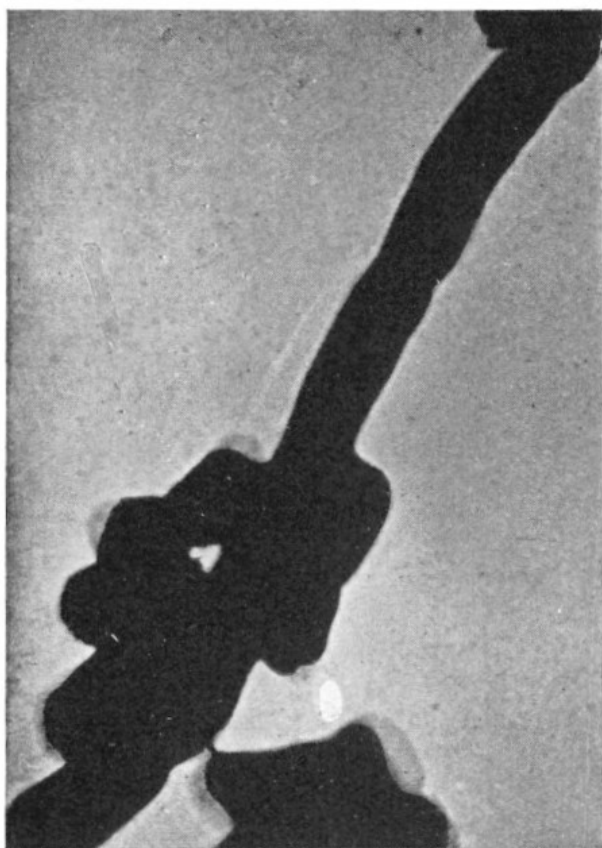
FOTOGRAFIA N. 2

Actinobacillo: brodocoltura di 12 h.,
forma cocco-bacillare ($\times 18.000$ -
microscopio elettronico)

alla cloromicetina (v. tabella 1), abbiamo usato il metodo dell'agar-germi standardizzato dal BABUDIERI (8).

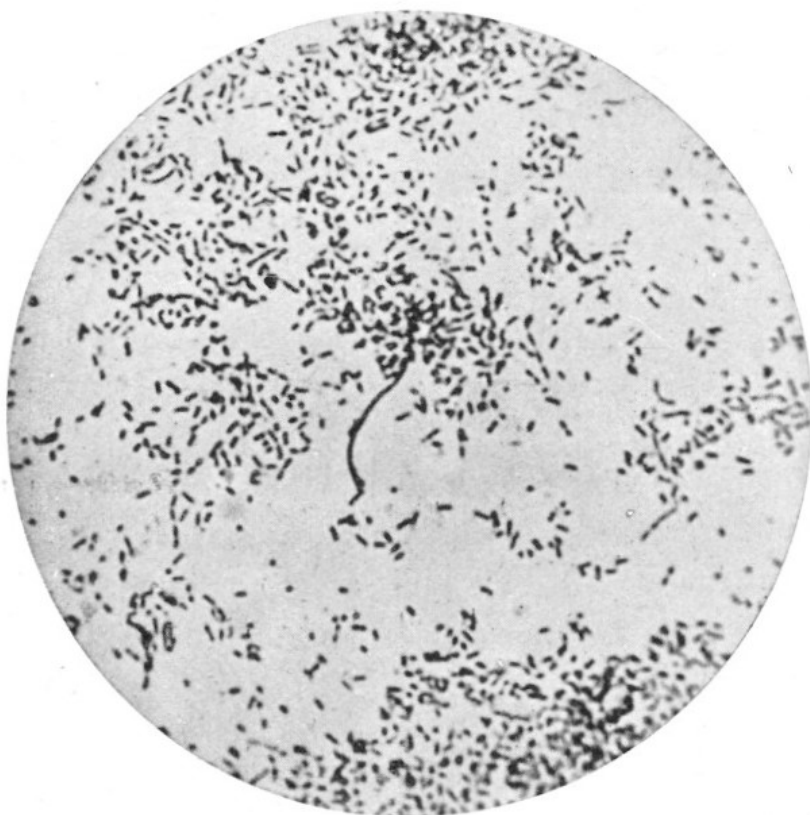
I tre ceppi di actinobacillo usati sono stati il: 535, sperimentale I e sperimentale II. La tecnica usata fu la seguente:

in piastre Petri, sterili, a fondo piano, di 9,1 cm. di diametro interno, venne versato $1/2$ cc. di brodocoltura di 24 h. dei tre ceppi di actinobacillo. Provettoni contenenti 15 cc. di agar al 2% a ph 7,4, vennero sciolti a bagno maria e raffreddati poi a 45° e quindi versati nelle piastre. Imprimendo alle piastre adatti movimenti ondulatori, se ne mescolò omogeneamente il



FOTOGRAFIA n. 3

Actinobacillo: brodocoltura di 24 h. - forma filamentosa
($\times 18.000$ - microscopio elettronico)



FOTOGRAFIA n. 4

Actinobacillo: brodocoltura di 24 h. - forme coccacee, coccobacillari e filamentose
($\times 1200$ - microscopio ottico).

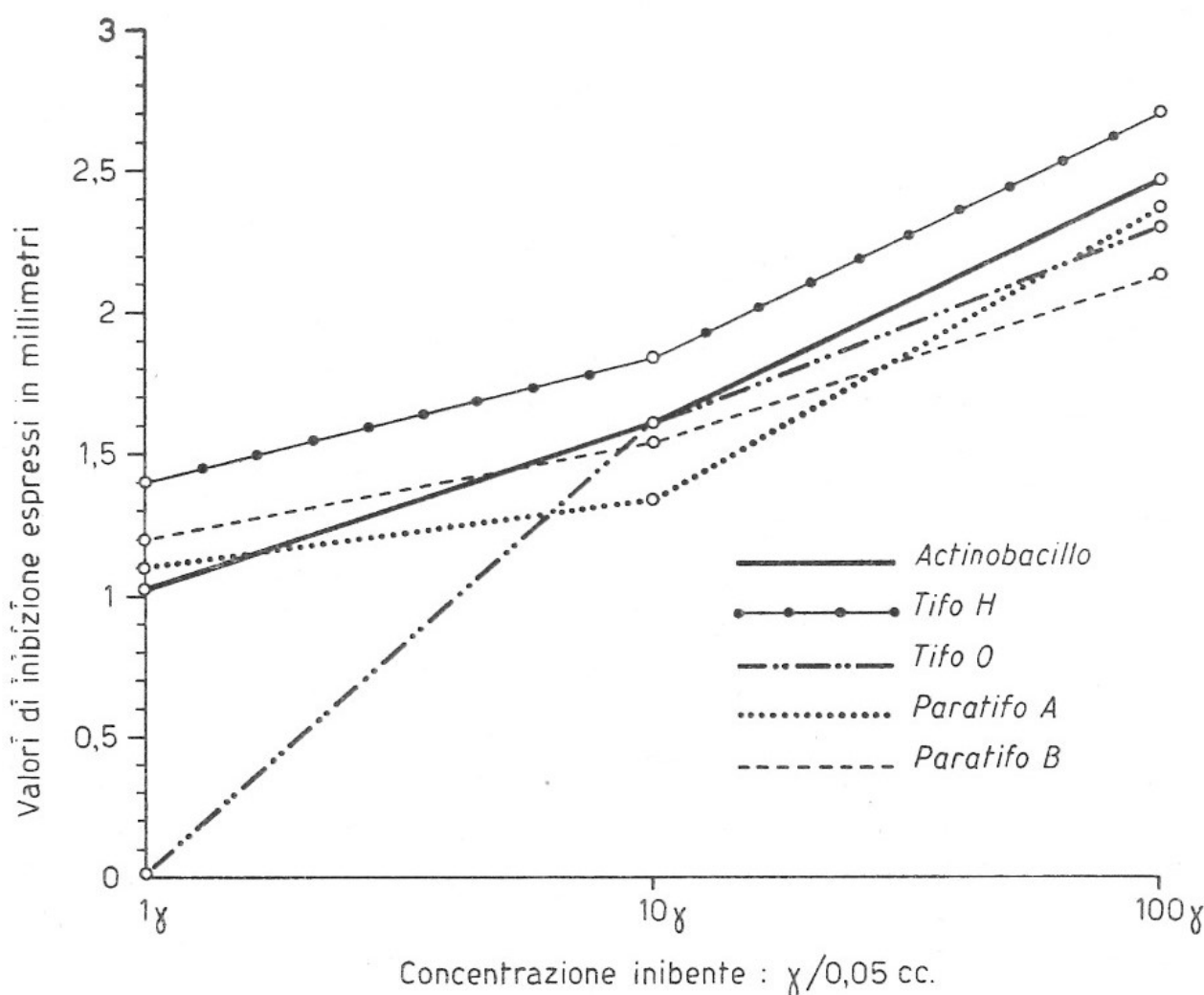
SPETTRO ANTIBIOTICO DELLA CLOROMICETINA

G E R M I	CONCENTRAZIONE INIBENTE			
	γ /cc.			γ /0,05 cc.
	Mc. Lean	Smith	Gottlieb	Negri-Ravaoli
Actinobacillus lignieresii	—	—	—	1
Aerobacter aerogenes	0,5-2,5	—	1-5	—
Alcaligenes faecalis	1	—	50-100	—
Bacillus anthracis	0,75-5	—	—	5
Bacillus cereus	—	—	—	—
var. mycoides	2,5	—	—	—
Bacillus subtilis	2,5	—30	1-5	—
Brucella abortus	2,5-10	2	0,1-0,5	0,5
Brucella parabortus	—	—	—	0,75
Brucella bronchiseptica	10	—	—	—
Brucella melitensis	5	0,5	—	1
Brucella paramelitensis	—	—	—	0,5
Brucella suis	5	0,5	—	—
Clostridium perfringens	>500	—	—	—
Clostr. septicum	>500	—	—	—
Clostr. tetani	>500	—	—	—
Corynebact. diphtheriae	0,5	—	—	—
Corynebact. diphtheroides	1	—	—	—
Diplococcus pneumonia	1	—	—	—
Escherichia col. var. communior	2,5	—	—	—
Escherichia coli var. communis	2,5	0,33	10-50	2-5
Hemophilus pertussis	0,2	0,2	—	—
Klebsiella pneumoniae	0,5-2,5	0,33	—	5-10
Micrococcus citreus	2,5	—	—	—
Micrococcus pyogenes var. albus	1-5	—	—	—
Micrococcus pyogenes var. aureus	5-10	1	1-5	10
Mycobacterium phlei	25	—	—	—
Mycobacterium tuber. var. hominis	6,25-12,5	12,5	10-50	—
Neisseria catarrhalis	0,5	—	—	—
Neisseria meningitidis	2,5	—	—	—
Pasteurella avicida	0,5	—	—	0,5
Pasteurella suis	—	—	—	0,75
Pasteurella oviseptica	2,5	—	—	—
Proteus vulgaris	1,5	0,33	—	—
Pseudomonas aeruginosa	15-200	—	100-500	—
Salmonella enteritidis	0,75	—	—	1
Salmonella gallinarum	2,5	—	—	—
Salmonella paratyphi	0,75	—	—	1
Salmo. schottmuelleri	2,5	0,33	0,50	0,75
Salmonella typhimurium	2,5	—	—	—
Salmonella typhosa H	—	—	—	1
Salmonella typhosa O	—	—	—	5
Salmonella typhosa	0,75-5	0,25	—	—
Sarcina lutea	10	—	—	—
Serratia marcescens	5	—	—	—
Shigella dysenteriae	0,75	—	—	—
Shigella madampensis	2,5	—	—	—
Shigella paradysenteriae Flexner	0,5-2,5	0,2	0,25	—
Shigella sonnei	2,5-5	—	—	—
Streptococcus hemolyticus	0,75-2,5	0,63	0,1-5	—
Streptococcus lactis	0,75	—	1-5	—
Streptococcus non hemolyticus	2,5	—	—	—
Vibrio comma	1	—	—	1

contenuto. L'agar-germi si lasciò solidificare ponendo le piastre su un piano di vetro orizzontale.

Dopo alcune ore furono praticati tre fori a distanze regolari, evitando di farli al centro della piastra, con un cilindro metallico ad orlo tagliente di 7 mm. di diametro esterno. I dischetti di agar determinati dal cilindro

TABELLA 2



vennero allontanati con un vaccino-stile, sterilizzato alla fiamma. Con una soluzione tampone sterile di fosfati a ph 7,4, si prepararono delle diluizioni di cloromicetina in modo da avere per ogni 0,05 cc. di soluzione, rispettivamente 1 γ , 10 γ , 100 γ . In ogni pozzetto furono versati cc. 0,05 cc. di detta soluzione contenente i valori sopradetti di antibiotico espressi in γ . Le capsule vennero incubate a 37° C, per 24 h., dopo di che si procedette alla lettura dei risultati misurando gli aloni di inibizione formatisi attorno ai pozzetti e i cui diametri si sono dimostrati proporzionali all'attività dell'antibiotico.

Per tutti i germi presi in esame furono eseguite 10 prove e fu fatta la media aritmetica dei valori di inibizione esprimendoli in millimetri. La

tabella n. 2 riporta il grafico comparativo fra i diversi valori di inibizione espressi in millimetri. Tali valori sono il risultato delle medie aritmetiche rispettivamente ottenute con 1 γ , 10 γ e 100 γ , di cloromicetina nei confronti degli actinobacilli n. 535, sperimentale I e sperimentale II, e dei ceppi di salmonelle: tifo O K 901 W, tifo H K 901 W, paratifo A 1015, paratifo B var. java K.

I valori di inibizione dei tre ceppi actinobacillari sono stati riuniti in un'unica media aritmetica. Essa è quindi il risultato della lettura di 30 piastre per ogni concentrazione inibente di cloromicetina.

CONCLUSIONI

Dalle ricerche sopra esposte possiamo concludere che anche l'actinobacillo di LIGNIÈRES e SPITZ è un germe sensibilissimo alla cloromicetina e che questa sua sensibilità è paragonabile a quella dei germi del gruppo delle salmonelle.

Se i risultati ottenuti « in vitro » venissero confermati anche « in vivo » — la qual cosa sembra assai probabile per la elevata sensibilità dell'actinobacillo all'antibiotico — si avrebbe a disposizione un mezzo terapeutico veramente specifico nella lotta contro l'actinobacillosi.

Tale malattia veniva curata fino ad oggi con dosi massive di prodotti jodici (THOMASSEN, LIGNIÈRES, VALLÉ, MAGNUSSON, MESSIERI, FARQUHARSON, VALCARENGHI, MALAVASII (9), e con dosi elevate di penicillina e sulfamidici (MONTI) (9). Mentre però questi ultimi tentativi terapeutici sono risultati completamente sfavorevoli, i su citati AA. sono concordi nell'ammettere che l'effetto dei preparati jodici, pur dimostrando una certa efficacia — subordinata alla gravità della malattia — non sempre sono sufficienti ad arrestare il processo actinobacillare e non possono comunque essere considerati medicamenti specifici dell'actinobacillosi.

A tutt'oggi non ci consta che siano state fatte esperienze sulla tolleranza alla cloromicetina nel bovino come invece è stato fatto su altri animali da SMITH, JOSLYN, GRUHZIT e coll. (10) e sull'uomo da LEY, SMADEL e CROKET (11). Tuttavia, se come è da augurarsi, il medicamento potesse venire messo in commercio a prezzo accessibile per uso veterinario, è nostra opinione che la cloromicetina potrebbe venire somministrata anche a dosi assai elevate con risultati che le prove « in vitro » sull'agente eziologico specifico fanno ritenere dei più incoraggianti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) NEGRI R., La cloromicetina. risultati clinici e probabili applicazioni in terapia. Pro-
filassi - Fascicolo 1 gennaio-febbraio 1950.
 - 2) EHRLICH J., GOTTLIEB D., BURKHOLDER P.R., ANDERSON L.E., PRIDHAM P.G., Journ.
Bact. 56, 467, 1948.
 - 3) CONTROULIS J., REBSTOK e CROOKS, Chloramphenicol (Chloromycetin) Synthesis.
Therapeutic Notes - Parke, Davis e C., luglio-agosto 1949.
 - 4) MC. LEAN J.W., SCHAB J.L. e HILLEGAS A.B. - J. Clin. Inv. 28, 953, 1949.
 - 5) SMITH R.N., DWIGHT A.Y., GRUZHIT O.M., MC. LEAN Y.W., PENNER M.A., EHRLICH
J. - J. of Bact., 55, 425, 1948.
 - 6) GOTTLIEB D., BHATTACARYYA P.K., ANDERSEN H. e CARTER H.E. - J. Bact, 55,
409, 1948.
 - 7) Citato da MESSIERI A. - L'actinobacillosi bovina - Ist. Pat. Clin. Med. vet.
Università di Bologna, pag. 103 - 1931.
 - 8) BABUDIERI B., Controllo dei preparati di penicillina. Rendiconti Ist. Sup. Sanità,
vol. X, pp. 405-418, 1947.
 - 9) Citati da MONTI F., Localizzazioni actinobacillari diffuse a rapida insorgenza e
cura jodica « Farquharson » - La Nuova Veterinaria, pp. 4-11; 1 gennaio 1950.
 - 10) SMITH R. M., JOSLIN D. A., GRUZHIT O. M., e coll., J.Bact., 55, 425, 1948.
 - 11) LEY H. L., SMADEL J. E., CROCKER I., Proc. Soc. Exp. Biol. e Med. 60, 9, 1948.
-