88. M. DE CARO e F. SCANGA. — **Sull'azione antibatterica dell' Eritromicina. (*)**

Riassunto. — Gli AA., dopo aver ricordato sommariamente le caratteristiche principali dell'eritromicina, hanno studiato l'azione dell'antibiotico sulla curva di crescita di alcuni batteri, scelti fra quelli sensibili e fra quelli resistenti all'antibiotico.

Le prove sono state compiute seguendo l'andamento della crescita batterica in colture controllo ed in colture tenute a contatto con concentrazioni varie di antibiotico, mediante esame nefelometrico al Pulfrich e mediante subcolture su piastra, eseguite sistematicamente ad intervalli stabiliti di tempo.

Da tali ricerche risulta che l'eritromicina esplica la sua azione sui germi in fase di moltiplicazione attiva e non su quelli in « *resting phase* »; tale azione è strettamente dipendente dalla sensibilità dell'organismo batterico verso l'eritromicina e dalla concentrazione dell'antibiotico. Nei casi in cui tale concentrazione è tenuta ad un livello relativamente basso, dopo un periodo di arresto della crescita batterica, di durata variabile, a seconda del germe e della concentrazione dell'antibiotico, la moltiplicazione batterica riprende, cosicchè, in ultima analisi, l'azione dell'antibiotico in tali condizioni di esperimento, consiste in una batteriostasi transitoria e, nella rappresentazione grafica dell'accrescimento batterico, si traduce in un semplice prolungamento del normale periodo di latenza. Nei casi in cui l'eritromicina trovasi a contatto con germi molto sensibili ed in concentrazioni piuttosto elevate (10-100 γ/cm^3), l'azione batteriostatica dell'antibiotico si prolunga, nelle nostre condizioni di esperimento, oltre i 28 giorni e, durante questo periodo, le subcolture eseguite su terreno senza antibiotico, risultano sterili.

Successivamente sono state studiate, al microscopio elettronico, le modificazioni morfologiche determinate dall'eritromicina a varie concentrazioni, sui germi tenuti a contatto con l'antibiotico, in differenti condizioni di esperimento. Si è rilevato che concentrazioni subinibenti di antibiotico non determinano sui microorganismi modificazioni morfologiche apprezzabili; in qualche caso si è osservato un aumento delle dimensioni, ma generalmente le caratteristiche citologiche sono rimaste immutate.

Con concentrazioni maggiori di eritromicina (da 0,5 a 100 γ/cm^3) le alterazioni morfologiche sono risultate più marcate: i microrganismi appaiono infatti ingranditi, presentano un contorno irregolare, mostrano

---

(*) Comunicazione tenuta al VI Congresso Internazionale di Microbiologia - Roma, 6-12 settembre 1953.

talvolta vere e proprie extroflessioni citoplasmatiche o delle incisure nel citoplasma a forma di semiluna; in alcuni casi si arriva ad osservare un disfacimento cellulare completo. Le alterazioni più intense e più caratteristiche sono quelle osservate nel *V. cholerae*.

Résumé. — Les auteurs, après avoir rappelé sommairement les principales caractéristiques de l'érythromycine, ont étudié l'action de cet antibiotique sur la courbe de croissance de certaines bactéries, choisies parmi celles qui sont sensibles et parmi celles qui sont résistantes à l'antibiotique.

Les essais ont été conduits en suivant l'allure de la croissance bactérienne en cultures contrôle et en cultures maintenues en contact avec différentes concentrations de l'antibiotique, au moyen de l'examen néphélométrique au Pulfrich et au moyen de sub-cultures sur plaque faites systématiquement à intervals de temps donnés.

Ces recherches portent à la conclusion que l'érythromycine a une action sur les germes en phase de multiplication active et non pas sur ceux qui sont en « resting phase »; cette action est en étroite relation avec la sensibilité de l'organisme bactérien envers l'érythromycine et de la concentration de l'antibiotique. Quand cette concentration reste à un niveau relativement bas, après une période d'arrêt dans la croissance bactérienne, d'une durée variable selon le germe et selon la concentration de l'antibiotique, la multiplication bactérienne reprend, de telle sorte que, en dernière analyse, l'action de l'antibiotique dans ces conditions d'expérience, consiste en une bactériostase transitoire et elle se traduit dans la représentation graphique de la croissance bactérienne en un simple allongement de la période normale de latence. Quand l'érythromycine se trouve en contact avec des germes très sensibles et sa concentration est plutôt élevée (10-100 γ/cm^3), l'action bactériostatique de l'antibiotique se prolonge, dans les conditions de l'expérience, pendant plus de 28 jours et, pendant cette période, les sub-cultures faites sur terrain sans antibiotique demeurent stériles.

On a ensuite étudié au microscope électronique les changements morphologiques déterminés par l'érythromycine dans diverses conditions de concentration chez des germes tenus en contact avec cet antibiotique dans des conditions expérimentales différentes. On a remarqué que des concentrations sub-inhibantes de l'antibiotique ne causent pas des modifications appréciables des micro-organismes; dans quelques cas on a observé une augmentation des dimensions, mais en général les caractéristiques cytologiques sont restées les mêmes.

Avec des concentrations plus fortes d'érythromycine (de 0,5 à

100 γ/cm^3) les altérations morphologiques sont plus marquées: les micro-organismes apparaissent en effet agrandis, ils présentent un contour irrégulier et parfois des extroflexions cytoplasmatiques vraies et propres ou des incisions à forme de demi-lune dans le cytoplasme; dans certains cas on peut observer des cellules complètement défaites. Les altérations les plus intenses et caractéristiques ont été observées chez *V. cholerae*.

Summary. — The writers, having briefly reported the principal characteristics of erythromycin, studied the action of this antibiotic on the rate of growth of certain bacteria, selected from those sensitive and resistant to the antibiotic.

The tests were carried out by following the progress of bacterial growth in controlled cultures and in cultures kept in contact with different concentrations of antibiotic, by means of Pulfrich nephelometric tests and subcultures on plates, done systematically at regular intervals of time.

It appears from this investigation that erythromycin exhibits its action on micro-organisms in the phase of active reproduction, not on those in the resting phase. This action depends strictly on the sensitivity of the bacterial organism towards erythromycin, and on the concentration of the antibiotic. In cases where this concentration is kept at a relatively low level, after a period of arrest of bacterial growth (of variable duration according to the micro-organism and the concentration of the antibiotic), bacterial reproduction recommences, so that, in the final analysis, the action of the antibiotic in these experimental conditions consists of a transient bacteriostasis, and is interpreted in the graphic representation of bacterial growth as a simple prolongation of the normal latent period. In cases where erythromycin is found in contact with highly sensitive micro organisms, and in somewhat raised concentrations (10-100 γ/cm^3), the bacteriostatic action of the antibiotic is prolonged (in these experimental conditions) beyond 28 days, and during this period sub-cultures carried out on media without antibiotic were sterile.

Subsequently a study was made, under the electron microscope, of the morphological modifications determined by erythromycin, at various concentrations, on micro-organisms kept in contact with the antibiotic in different experimental conditions. It was observed that sub-inhibiting concentrations of antibiotic do not determine morphological modifications in micro-organisms to any appreciable extent; in some cases an increase in size was observed, but in general the cytological characteristics were unchanged.

With higher concentrations of erythromycin (from 0.5 to 100 γ/cm^3) the morphological changes were more marked: in fact the microorganisms were enlarged, showing an irregular contour, sometimes with true cytological proliferation, or crescent-shaped proliferation of the cytoplasmic notches; in some cases complete cellular disintegration was observed. The most striking and characteristic changes were observed in *V. cholerae*.

Zusammenfassung. — Nach einer allgemeinen Wiedergabe der hauptsächlichen Eigenschaften des Erythromycin berichten die Verfasser über ihre Forschungen über die Wirkung dieses Antibioticums auf die Wachstumskurve einiger Bakterien, die unter denen auf Erythromycin ansprechenden sowie den gegen dasselbe resistenten ausgewählt wurden.

Die Versuche wurden derart durchge führt, dass das Wachstum der Bakterien in Kontrollkulturen sowie in Kulturen in Kontakt mit verschiedenen Konzentrationen von Erythromycin mittels eines Pulfrich-Nephelometers und mittels in regelmässigen Zeitabständen systematisch hergestellten Subkulturen auf Platten verfolgt wurde.

Aus den Forschungen ergibt sich, dass Erythromycin seine Wirkung auf Bakterien im Zustand aktiver Vermehrung und nicht auf Bakterien in der « Resting Phase » ausübt. Die Wirkung selbst hängt engstens von der Empfindlichkeit des Bakterienorganismus für Erythromycin sowie von der Konzentrierung desselben ab. In Fällen relativ niedriger Konzentrierung beginnt nach einer Stillstandsperiode des Bakterienwachstums von verschiedener, von der Art der Bakterien und der Konzentration des Antibioticums abhängenden Dauer die Vermehrung aufs neue. Somit besteht unter diesen Versuchsbedingungen die Wirkung des Erythromycins in einer vorübergehenden Bakteriostase, die bei der graphischen Darstellung des Bakterienwachstums als einfache Verlängerung des normalen Latentzustandes erscheint. Kommt das Erythromycin in hoher Konzentration mit sehr empfindlichen Bakterien in Kontakt, (10-100 γ/cm^3), verlängert sich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die bakteriostatische Wirkung des Antibioticums bis auf mehr als 28 Tage, wobei während dieser Zeit die ohne Erythromycin angelegten Subkulturen steril erscheinen.

Anschliessend wurden im Elektronenmikroskop die durch Erythromycin in verschiedenen Konzentartionen hervorgerufenen morphologischen Veränderungen bei mit dem Antibioticum in Kontakt gehaltenen Bakterien unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass subinhibierende Konzentration von Erythromycin keine nennenswerten morphologischen Veränderungen bei den Mikroor-

ganismen hervorrufen. In einigen Fällen wurde zwar eine Grössenzunahme beobachtet, jedoch blieben im allgemeinen die Zellkennzeichen unverändert.

Bei höheren Konzentrationen von Erythromycin (0,5-100 γ/cm^3) ergaben sich ausgesprochenere morphologische Veränderungen. Die Mikroorganismen erscheinen vergrössert, haben unregelmässige Umrisse und zeigen in manchen Fällen Ausbuchtungen des Zellplasmas im wahrsten Sinne des Wortes oder halbmondförmige Einschnitte im Zellplasma. In einigen Fällen konnte eine völlige Zellauflösung beobachtet werden. Die grössten und charakteristischsten Veränderungen wurden beim *V. cholerae* beobachtet.

L'eritromicina è un nuovo antibiotico che McGuire e coll. (1) hanno ottenuto, alla fine del 1952, da un actinomicete, isolato da un campione di terra proveniente dalle Isole Filippine ed identificato come *Streptomyces erythreus;* il nome prescelto, eritromicina, è dovuto al caratteristico pigmento color vino-ruggine che l'actinomicete produce in adatti terreni colturali.

In considerazione del particolare interesse suscitato dal nuovo antibiotico e tenendo presente che attualmente ben poco si conosce sul suo meccanismo di azione, abbiamo voluto compiere delle ricerche sull'azione antibatterica esplicata *in vitro* dall'eritromicina, su determinati germi e in determinate condizioni di esperimento, seguendo contemporaneamente al microscopio elettronico le alterazioni strutturali causate dall'antibiotico sulla cellula batterica.

a) *Proprietà chimiche.* — L'eritromicina si ottiene dal filtrato di una brodocoltura di *Streptomyces erythreus* mediante estrazione benzolica o etilacetica (1). Trattasi di un composto monobasico, ottenuto in forma cristallina, con peso molecolare di 764-766; la sua molecola contiene azoto, carbonio, idrogeno e ossigeno. In base ai dati analitici, la formula bruta è $C_{39}H_{73-75}NO_{13}$; l'atomo di azoto non è presente

---

(1) McGuire J. M., Bunch R. L., Anderson R. C., Boaz H. E., Flynn E. H., Powell H. M. e Smith J. W. - Antibiotics a. Chemoth., 2: 281 (1952).

TABELLA I. — *Spettro antibiotico comparativo.*
(concentrazioni minime inibenti in γ/cc; media dei valori)

Cloramfenicolo	Cloram-fenicolo	Aureo-micina	Terra-micina	Eritro-micina	Carbo-micina
Aerobacter aerogenes	31,20	3,12	3,12	62,50	25,00
B. mycoides	3,12	0,03	0,07	0,31	0,62
B. subtilis	3,12	0,06	0,15	0,07	0,31
Br. bronchiseptica	3,12	0,78	1,56	3,12	12,50
Cl. tetani	1,56	0,10	0,20	0,05	0 39
Cl. sporogenes	1,56	0,10	0,20	0,20	1,56
Cl. perfringens	1,56	0,05	0,10	0,78	6,25
Cl. botulinum	3,12	0,10	0,20	0,20	1,56
Coryn. bovis	12,50	0,07	0,15	0,31	0,31
Coryn. diphteriae	3,12	0,07	0,15	0,31	0,78
Diplococcus pneumoniae	1,21	0,12	0,13	0 02	0,09
E. coli	0,78	0,39	0,78	12,50	3,12
Gaffkya tetragena	25,00	0,03	0,07	0,01	0,31
H. influenzae	0,32	0,49	0,41	1,56	3,64
H. pertussis	9,37	2,34	1,87	1,56	3,12
Kl. pneuomoniae	32,25	3,32	1,95	64,06	15,62
Micrococcus flavus	1,56	0,07	0,15	0,31	0,15
Micrococcus pyogenes albus	6,52	0,31	0,62	0,15	1,25
Micrococcus pyogenes aureus	11,15	30,51	62,99	9,37	6,33
Myc. butiricum	17,70	1,17	2,47	31,30	16,79
Myc. friedmannii	62,50	6,25	125,00	25,00	25,00
Myc. phlei	25,00	0,39	0,39	3,12	25,00
Myc. smegmatis	33,75	13,28	68,75	43,75	18,75
Myc. « leprae »	3,12	0,20	0,39	0,20	0,39
Myc. sp.	14,58	3,64	46,87	41,62	29,00
Myc. stercoris	12,50	0,78	0,20	12,50	3,22
Neisseria catarrhalis	1,56	0,39	0,78	0,78	0,78
Neisseria gonorrhoeae	6,69	3 38	0,60	0,35	0,36
Neisseria meningitidis	2,03	0,53	1,35	0,49	0,82
Pasteurella multocida	0,10	0,20	0,20	0,20	6,25
Proteus vulgaris	2,00	3,12	12 50	250,00	25,00
Pseudomonas spp.	187,50	18 50	7,81	125,00	25,00
Salmonella typhosa	3,90	1,56	3,12	62,50	25,00
Salmonella cholera suis	3,90	6,25	3,12	250,00	25,00
Salmonella pullorum	2,00	1,56	1,56	62,50	25,00
Sarcina lutea	1,56	0,07	0,31	0,03	0,07
Serratia marcescens	25,00	6,25	25 00	62,50	25,00
Shigella disenteriae	1,00	1,56	0,78	31,20	25,00
Shigella sonnei	6,25	1,56	3 12	31,20	25 00
Str. pyogenes gruppo A	2,13	0,28	0,36	0,02	0,37

(da Welch H. e coll. - modificata)

sotto forma di raggruppamento nitrobenzenico, che sembra essere responsabile delle complicazioni a carico del sistema ematopoietico. E' stabile a pH compresi tra 6 e 8, con un optimum a pH 7; è rapidamente distrutta al di sotto o al di sopra di questi valori. E' solubile in acqua fino alla concentrazione di 2 mmg/cm^3; è molto solubile in alcool, acetone, cloroformio, acetonitrile e acetato di etile; moderatamente solubile in etere, acetato di amile e bicloruro di etilene. Forma rapidamente dei sali con i comuni acidi organici e inorganici. Fonde a 137°-140° C; alla luce ultravioletta il composto ha una larga banda di assorbimento di debole intensità (E = 50) a 280 mu in soluzione acquosa a pH 6,3 ([2, 3]).

Soluzioni sterili di eritromicina in brodo, sia in concentrazioni alte (2.000 γ/cm^3) che in concentrazioni basse (2 γ/cm^3) conservano pressocchè immutata la loro attività se tenute per 8 settimane a 5° C. A temperatura ambiente ($\pm$ 25° C) mostrano qualche perdita di attività durante la prima settimana, ma non nelle successive sette settimane, mentre che a 37° C l'attività di entrambe le soluzioni incomincia a diminuire a partire dal 4° giorno. Le due soluzioni di antibiotico, se scaldate a 60° C per 5 minuti, non dimostrano alcuna perdita di attività, cosa che si osserva invece se scaldate a 60° C per 15 minuti, oppure a 100° C per 5 minuti; l'inattivazione è proporzionalmente maggiore se si prolunga il riscaldamento ([4]).

Il passaggio attraverso filtro Seitz o attraverso Berkefeld o attraverso filtri di quarzo determina una perdita di attività più o meno sensibile, in rapporto alla concentrazione dell'antibiotico nel liquido filtrato ([4]).

L'eritromicina è più attiva in un mezzo moderatamente alcalino. La sensibilità dei germi aumenta progressivamente con l'aumentare del pH da 5,6 a 8,5. Questa azione del pH è simile a quella osservata con la streptomicina ed è opposta a quella notata con l'aureomicina. Nessuna delle sostanze agenti sull'attività della penicillina e della streptomicina, esercita qualche influenza sulla eritromicina, se usata in basse concentrazioni; le sostanze sperimentate sono: cloruro di sodio, destrosio, tioglicolato di sodio, cisteina, semicarbazide, urea, acido glutamico, acido p-aminobenzoico, acido folico, penicillinasi. Il siero umano, anche in concentrazioni del 12,5, 25 e 50% non ha dimostrato alcuna azione inibente sull'attività dell'antibiotico. Stipiti che sono risultati resistenti verso l'eritromicina non producono alcuna sostanza, analoga alla penicillinasi, inibente l'antibiotico (eritromicinasi) ([5]).

([2]) Powell H. M., Boniece W. S., Pittinger R. C., Stone R. L. e Culberston C. G. - Antibiotics a. Chemoth., 3: 163 (1953).
([3]) Haight T. e Finland M. - New England J. Med., 247: 227 (1952).
([4]) Haight T. e Finland M. - Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 81: 188 (1952).
([5]) Haight T. e Finland M. - Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 81: 175 (1952).

E' necessario far rimarcare che l'eritromicina è completamente distinta dall'actinorubina, antibiotico meno attivo e molto più tossico, ottenuto anche esso da un actinomicete molto simile all'*erythreus*, e non deve essere, altresì, confusa con l'eritrina, sostanza antibatterica ottenuta dalle emazie.

b) *Spettro antibiotico.* — Lo spettro antibiotico dell'eritromicina è, in parte, simile a quello della penicillina: oltre che agire sui microrganismi che rientrano nel campo di attività di questo antibiotico, l'eritromicina estende però il suo raggio di azione anche verso altri germi gram negativi, verso alcuni protozoi, rickettsie e qualche grosso virus (1).

I microrganismi più sensibili sono risultati: *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, gruppo A; i più resistenti: *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sono state osservate variazioni della sensibilità tra ceppi della stessa specie, variazioni contenute però entro limiti non estesi. Le variazioni maggiori sono state osservate tra i ceppi di streptococchi del gruppo D e streptococchi emolitici α, che furono inibiti da concentrazioni varianti da 0,02 a 3,1 γ/cm^3 (5). Gli stafilococchi aurei variarono nella sensibilità da 0,01 a 1,6 γ/cm^3; tuttavia l'80% dei ceppi cimentati è stato inibito da 0,4 γ/cm^3 ed il 96% da 0,2-0,8 γ/cm^3. La sensibilità degli stafilococchi verso l'eritromicina è risultata indipendente dalla resistenza verso la penicillina (2).

Microrganismi gram positivi, fra cui lo stafilococco aureo, dimostratisi resistenti alla penicillina ed agli altri antibiotici, sono risultati altamente sensibili all'eritromicina, venendo inibiti da concentrazioni inferiori a 1 γ/cm^3 (2). Alcuni dei germi più resistenti alla penicillina sono risultati fra i più sensibili all'eritromicina. Stipiti di vari organismi gram negativi, come *Neisseria*, *Haemophilus* e *Brucella* (*Br. suis* e *melitensis*, molto meno la *Br. abortus*), e qualche micobatterio, si dimostrarono sensibili all'antibiotico essendo inibiti da concentrazioni di 6 γ/cm^3. L'antibiotico si è dimostrato attivo verso il virus del linfogranuloma inguinale, della psittacosi, della meningo-polmonite del topo e verso le rickettsie sviluppate nell'uovo embrionato; è attivo anche verso *Entamoeba histolytica*, *Spirocheta novyi*, *Tricomonas vaginalis* e *Oxyuris vermicularis* (6). Una spiccata azione ha dimostrato verso *Cor. diphteriae* riuscendo a sterilizzare i portatori in pochissimi giorni (7).

Non agisce sui bacilli gram negativi coliformi, abitualmente presenti nella flora batterica intestinale e la cui eliminazione, come succede con

---

(6) Higgens C. E., Pittenger R. C., e McGuire J. M. - Antibiotics a. Chemoth., 3: 50 (1953).

(7) Ricci G., Ravazzoni L. e Ugolini A. - Aggiornam. Pediat., 4: 1 (1953).

altri antibiotici a vasto raggio di azione, può determinare quei fenomeni di carenza vitaminica a tutti noti. Elimina però dalle feci i clostridi e può cambiare o eliminare l'odore delle feci ([8]).

Riportiamo da Welch e coll. ([9]) nella tabella I lo spettro antibatterico dell'eritromicina, confrontandolo con quello degli altri antibiotici a vasto raggio di azione: cloramfenicolo, aureomicina, terramicina e carbomicina.

c) *Tossicità.* — Nella prova di tossicità subacuta e cronica nei ratti, nutriti con diete contenenti 0,05-0,10 e 0,20% di eritromicina per tre mesi, e nei cani, che ricevettero dosi giornaliere di antibiotico di 50, 75, 100 mg/Kg di peso, per tre mesi, Anderson e coll. ([10]) non rilevarono alterazioni a carico dei vari organi: i valori dell'emoglobina, degli eritrociti e dei leucociti, gli esami macro e microscopici di tutti gli organi, e particolarmente degli organi emopoietici, la glicemia e l'azotemia non mostrarono variazioni significative dalla norma. Per ricercare un'eventuale azione neurotossa dell'eritromicina gli stessi AA. compirono osservazioni su gatti ma non misero in evidenza alcuna alterazione nei nervi cranici.

d) *Resistenza.* — Per studiare lo stabilirsi di una eventuale resistenza in microrganismi originariamente sensibili all'eritromicina, T. Haight e M. Finland ([11]) sono ricorsi a prove di subcolture in serie su agar contenente concentrazioni progressivamente crescenti di antibiotico. E' risultato che alcuni ceppi di stafilococco e di enterococco aumentano rapidamente di resistenza, tanto da riuscire a crescere anche a contatto di 100 γ di eritromicina per cm^3 dopo appena 3-5 passaggi; un ceppo di pneumococco invece richiese 12 passaggi a 48 h di intervallo per raggiungere lo stesso livello di resistenza, mentre il gruppo dello streptococco emolitico ed un ceppo di streptococco *viridans* sono aumentati di resistenza moderatamente dopo 20 subcolture in agar con eritromicina ([12]).

Gli organismi nei quali si è determinata l'insorgenza di un certo grado di resistenza, mediante subcolture in agar con eritromicina, hanno conservato immutato il grado di resistenza raggiunto, dopo 10 passaggi successivi in brodo non contenente antibiotico ([11]).

In linea di massima, in base alle sopracitate esperienze, appare che l'insorgere della resistenza verso l'eritromicina è notevolmente variabile

---

([8]) Heilman F. R., Herrell W. E., Wellman W. E. e Geraci J. E. - Proc. Staf. Meet. Mayo Clinic, 27: 285 (1952).
([9]) Welch H., Randall W. A., Reedy R. J. e Kramer J. - Antibiotics a. Chemoth., 2: 693 (1952).
([10]) Anderson R. C., Harris P. N. e Chen K. K. - J. Am. Pharm. Ass., 41: 555 (1952).
([11]) Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 81: 183 (1952).
([12]) Needham G. M. e Nichols D. R. - J. Lab. a. Clin. Med., 41: 150 (1953).

da un organismo all'altro; tale resistenza si stabilisce generalmente in maniera piuttosto rapida e spesso con le stesse modalità di quella che si stabilisce verso la penicillina. D'altro canto l'associazione dell'eritromicina alla penicillina o alla streptomicina determina un ritardo rimarchevole nella comparsa della resistenza ([13]). Questo è un dato di notevole importanza, da tener presente nel campo clinico, allorchè il trattamento con l'antibiotico viene protratto a lungo.

Tra gli antibiotici di uso più comune è stata già dimostrata l'insorgenza della resistenza verso un antibiotico, in un germe ripetutamente o prolungatamente esposto all'azione di un altro antibiotico (*resistenza crociata*): questo è stato dimostrato tra aureomicina e terramicina, tra uno di questi due antibiotici ed il cloramfenicolo e tra la streptomicina e l'aureomicina. Poichè è risultato che lo spettro antibiotico dell'eritromicina è strettamente simile a quello della carbomicina (magnamicina), per quanto l'eritromicina si riveli da 4 a 16 volte più attiva di questa, Finland e coll. ([13]) hanno compiuto delle prove di resistenza crociata tra i due antibiotici, con esito positivo. La resistenza insorge molto rapidamente nel corso di ripetute subcolture in presenza di concentrazioni crescenti di uno dei due antibiotici, accompagnandosi questa reazione acquisita, che chiameremo omologa, all'insorgere di una resistenza quasi dello stesso ordine di grandezza, verso l'altro antibiotico, con il quale il germe non era stato ancora messo in contatto (resistenza crociata). Non hanno dato invece esito positivo le prove di resistenza crociata dell'eritromicina con la penicillina, con la streptomicina e con il cloramfenicolo.

e) *Titolazione dell'eritromicina nei liquidi organici.* — Per il dosaggio dell'eritromicina nei liquidi organici si possono usare i metodi comunemente impiegati per la penicillina, come per es. quello di C. H. Rammelkamp ([14]) usato da D. N. Ziegler e J. M. McGuire ([15]).

Come è noto questo metodo, che impiega come microrganismo di prova uno streptococco emolitico, è basato sulla comparsa di emolisi in due serie di provette contenenti terreno colturale, germe di prova e sospensione di emazie. Una serie di provette contiene inoltre quantità scalari note di eritromicina; l'altra serie quantità scalari del liquido in esame, nel quale l'antibiotico deve essere dosato. Il calcolo della concentrazione dell'eritromicina nel materiale in controllo è eseguito prendendo nota

---

([13]) Finland M., Wilcox C., Wright S. S. e Purcell M. E. - Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 84: 725 (1952).
([14]) Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 51: 95 (1942).
([15]) Antibiotics a. Chemoth., 3: 67 (1953).

delle provette-limite di entrambe le serie, nelle quali non si ha sviluppo microbico, cioè non si osserva emolisi. Essendo il titolo dell'antibiotico di una delle due provette noto, è facile stabilire il titolo anche dell'altra.

PARTE SPERIMENTALE

Nelle nostre ricerche, abbiamo voluto studiare, anzitutto, l'azione esplicata dall'eritromicina sulla curva di crescita di alcuni batteri, scelti tra quelli sensibili e fra quelli resistenti all'antibiotico. I microrganismi impiegati sono stati: *Staphilococcus aureus*, ceppo Oxford; *Streptococcus pyogenes*, ceppo ISN 124; *Haemophilus pertussis*, ceppo 4° A; *Escherichia coli*, ceppo N 4; *Diplococcus pneumoniae* ceppo Ist. Pasteur; *Vibrio cholerae*, ceppo Inaba; *Klebsiella pneumoniae*, ceppo PCI 602; *Brucella melitensis*, ceppo Allemandi.

Le prove sono state compiute seguendo l'andamento della crescita batterica in colture controllo ed in colture tenute a contatto con concentrazioni varie di antibiotico, mediante esame nefelometrico al Pulfrich e mediante subcolture su piastra, eseguite sistematicamente ad intervalli stabiliti di tempo.

Successivamente abbiamo studiato, al microscopio elettronico, le modificazioni morfologiche determinate dall'eritromicina a varie concentrazioni, sui germi tenuti a contatto con l'antibiotico, in differenti condizioni di esperimento.

a) *Azione sulla moltiplicazione batterica.* — Dei batteri sottoposti alle nostre ricerche, sei, e cioè: *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Brucella melitensis* e *Diplococcus pneumoniae* sono molto sensibili all'antibiotico e 2, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* sono invece resistenti, come si può rilevare dalla Tabella I riportante lo spettro antibatterico dell'eritromicina.

Un'ansata di una brodocoltura di 24 h dei vari germi in esame è stata insemenzata in una serie di provette contenenti 6 cm^3 di terreno colturale sterile e concentrazione differenti di antibiotico; tutte le prove sono state allestite in doppio; due provette, senza antibiotico, rappresentano il controllo.

Dopo aver provveduto per ogni provetta al controllo nefelometrico al Pulfrich ed al conteggio degli organismi presenti per cm^3 mediante subcolture su piastra, abbiamo posto le provette in termostato, ripetendo poi l'osservazione al Pulfrich ed i conteggi su piastra sistematicamente, ad intervalli stabiliti di tempo, come è riportato nei grafici da 2 a 5: i

tracciati si riferiscono ai logaritmi dei valori nefelometrici; i cerchietti contenenti il segno + oppure — si riferiscono ai risultati delle subcolture.

Anzitutto facciamo rilevare che i risultati ottenuti nel gruppo dei 6 germi eritromicino-sensibili sono fra loro poco dissimili; perciò noi ri-

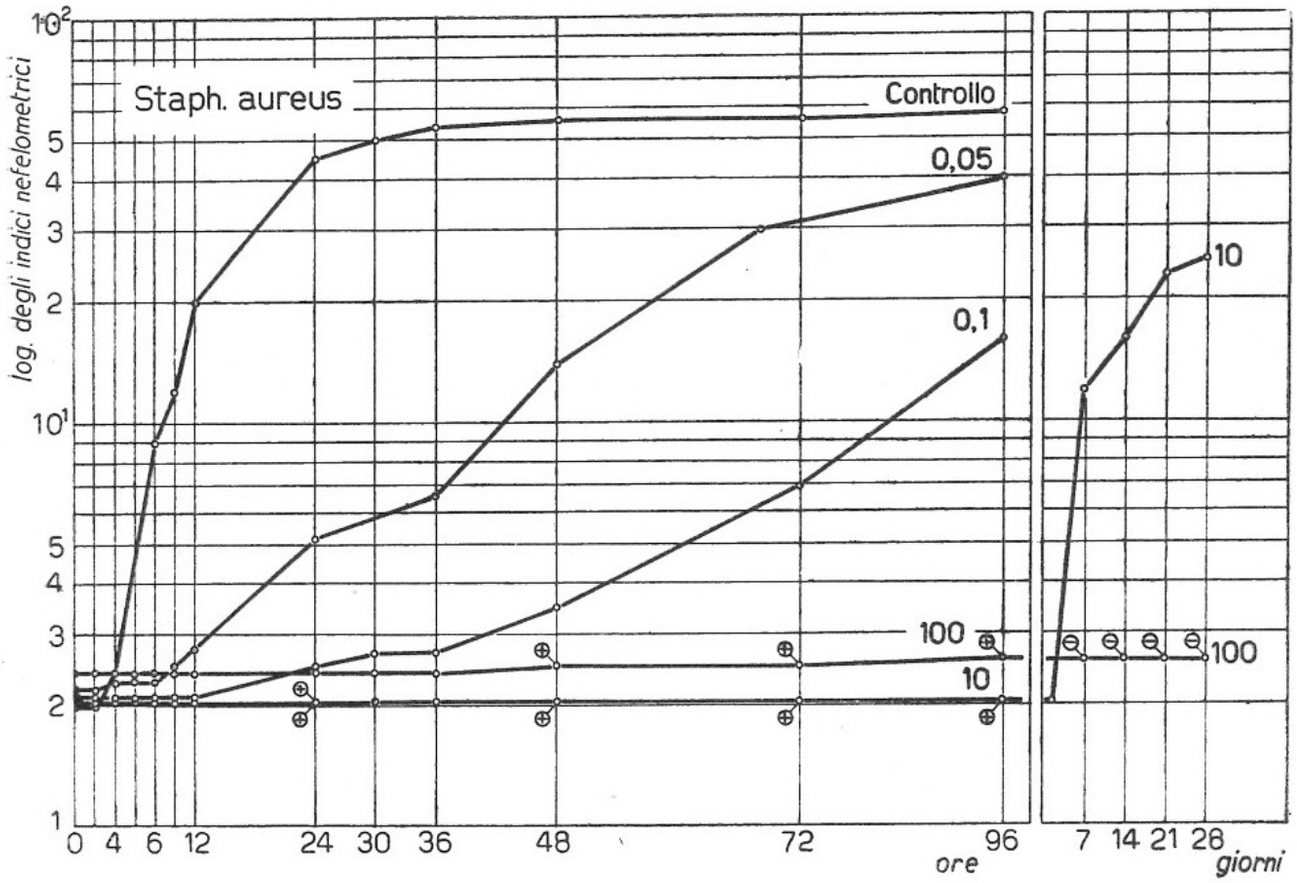


Grafico 1. - *Staphilococcus aureus*: curva di crescita di organismi in terreno di coltura senza antibiotico (controllo) e con concentrazioni varie di eritromicina (0,05 - 0,1 - 10 - 100 γ/cm^3)

portiamo in tabella solo i dati relativi alle ricerche compiute sullo stafilococco (grafico 1), sullo streptococco (grafico 2) e sul pneumococco (grafico 3).

In tali grafici, il tracciato riferentesi allo sviluppo delle brodocolture di controllo mostra, per ogni organismo, una curva di crescita tipo; poichè il grafico è stato tracciato in base ai dati della nefelometria, non è apprezzabile l'ultimo periodo della curva (fase di declino). Nelle brodocolture contenenti l'eritromicina, si nota che, con *concentrazioni relativamente piccole di antibiotico* (0,01-0,1 γ/cm^3) la crescita batterica subisce un arresto che può durare anche cinque giorni, dopo di che essa riprende un andamento quasi normale, raggiungendosi talvolta valori opacimetrici corrispondenti alle colture di controllo. L'antibiotico cioè

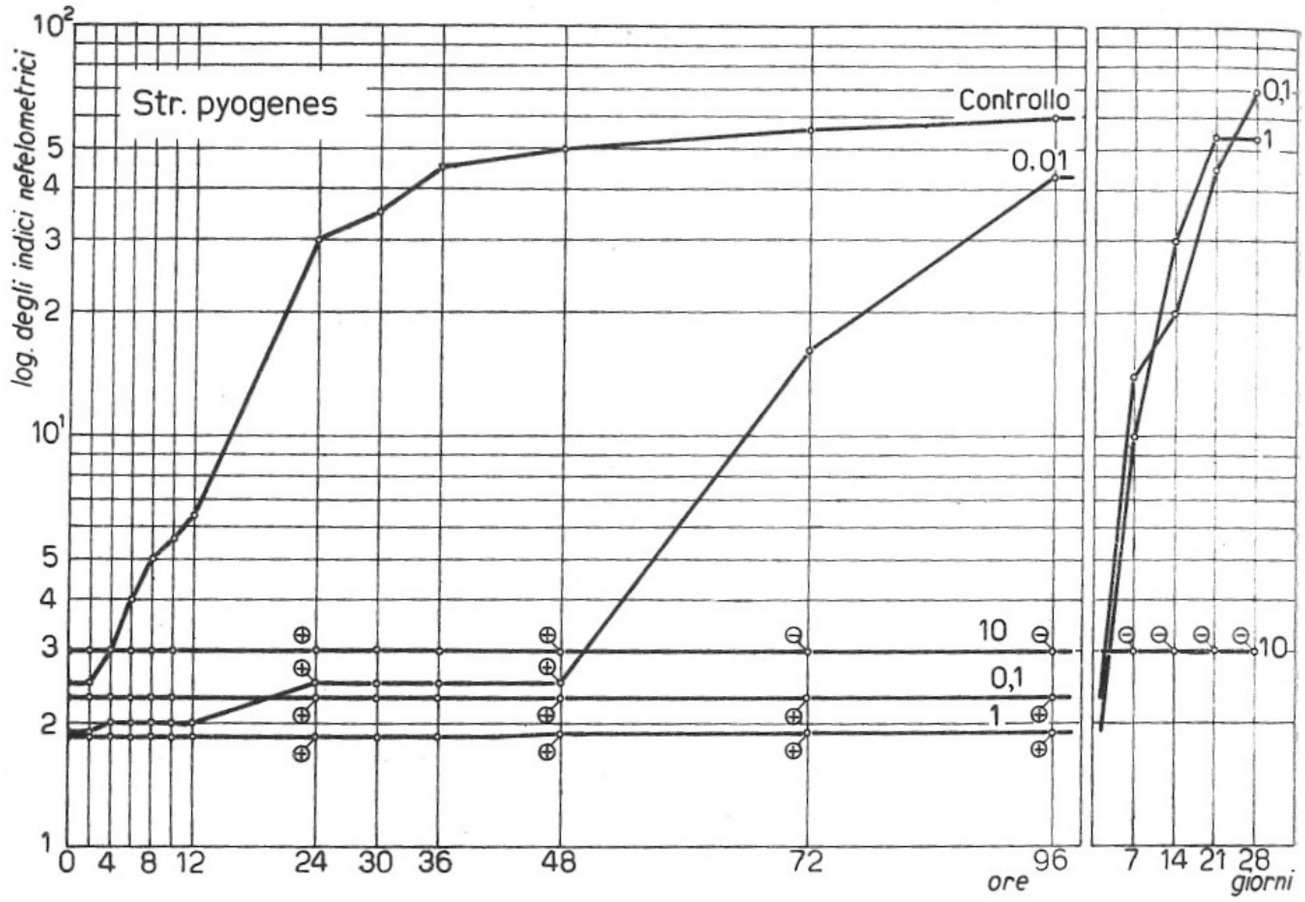


Grafico 2. - *Streptococcus pyogenes*: curva di crescita di organismi in terreno di coltura senza antibiotico (controllo) e con concentrazioni varie di eritromicina (0,01 - 0,1 - 1 - 10 γ/cm^3)

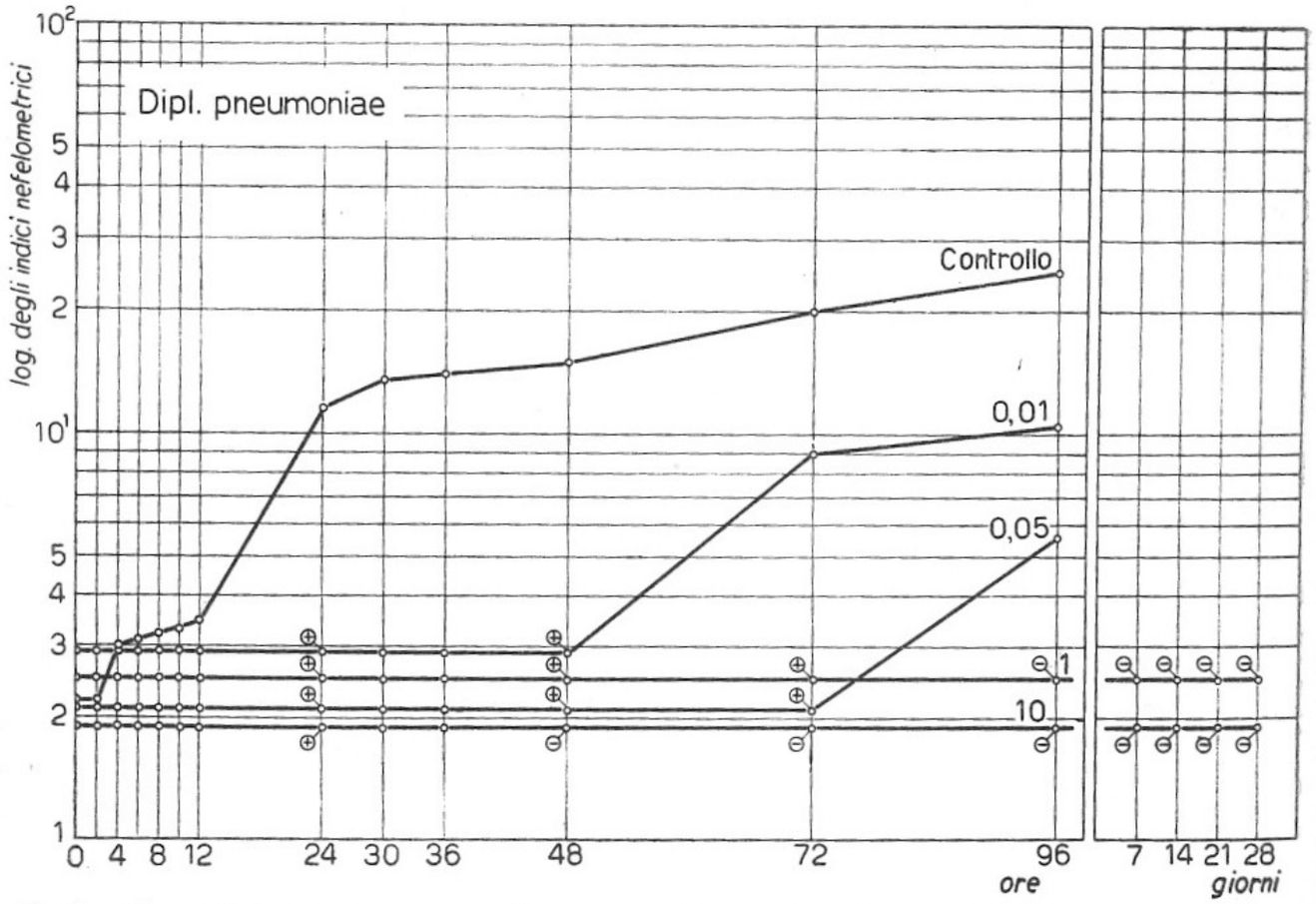


Grafico 3. - *Diplococcus pneumoniae*: curva di crescita di organismi in terreno di coltura senza antibiotico (controllo) e con concentrazioni varie di eritromicina (0,01 - 0,05 - 1 - 10γ/cm^3).

esercita, con tali concentrazioni, un'azione decisamente batteriostatica: le subcolture su piastra, eseguite ogni 24 h, dalle brodocolture che all'esame opacimetrico risultavano ferme al punto di partenza, hanno infatti dato sempre esito a crescita batterica; ne' il numero di colonie sviluppatesi nelle piastre ha mostrato una sensibile diminuzione in rapporto alla durata del contatto della coltura con l'antibiotico.

Dopo un periodo di stasi quindi di durata variabile a seconda del germe e della concentrazione dell'eritromicina, la crescita batterica riprende, così che, in ultima analisi, l'azione dell'antibiotico, in concentrazioni piccole, si traduce, come rivelano i tre grafici, in un semplice *prolungamento del periodo di latenza.*

La ripresa della moltiplicazione batterica potrebbe essere spiegata con due ipotesi:

1) progressiva inattivazione dell'eritromicina, che raggiungerebbe nel liquido colturale, un livello inferiore al minimo richiesto dal germe in prova per subire un'azione batteriostatica;

2) rapido insorgere di una eritromicina-resistenza, da parte del germe saggiato.

La prima ipotesi, però, al vaglio dell'esperienza, non si è dimostrata attendibile perchè la quantità di eritromicina presente alla fine del periodo di batteriostasi si è rivelata pressocchè identica a quella presente al principio.

Anche la seconda ipotesi non spiega completamente il fenomeno, giacchè abbiamo constatato lo stabilirsi di una resistenza soltanto nei microorganismi provenienti dalle brodocolture nelle quali la *crescita batterica si è osservata dopo il 4° giorno di contatto con l'antibiotico.*

Per quanto riguarda l'azione esplicata da *concentrazioni maggiori di eritromicina* (da 10 a 100 γ/cm^3), rileviamo invece che l'azione batteriostatica è definitiva: le subcolture in piastra, se anche nei primi quattro giorni rimangono in qualche caso positive, finiscono, poi, con il dare assenza completa di sviluppo batterico.

L'azione dimostrata perciò in vitro dall'eritromicina su germi ad essa sensibili, consiste in una batteriostasi di breve durata, se si usano piccole concentrazioni di antibiotico, ed in una batteriostasi definitiva, se si usano concentrazioni relativamente alte.

Nei riguardi poi dei germi *eritromicino-resistenti,* mentre nel caso della *Kl. pneumoniae* non si osserva alcuna differenza tra colture controllo e colture con antibiotico, nel caso dell'*E. coli,* concentrazioni elevate di eritromicina (25 γ/cm^3) possono dare un prolungamento di alcune ore del periodo di latenza, ma poi la crescita batterica segue un andamento

regolare (grafico 4). E' interessante rilevare che subcolture eseguite in 7ª, 14ª, 21ª e 28ª giornata di contatto della coltura con l'antibiotico, hanno dato sempre esito a sviluppo batterico.

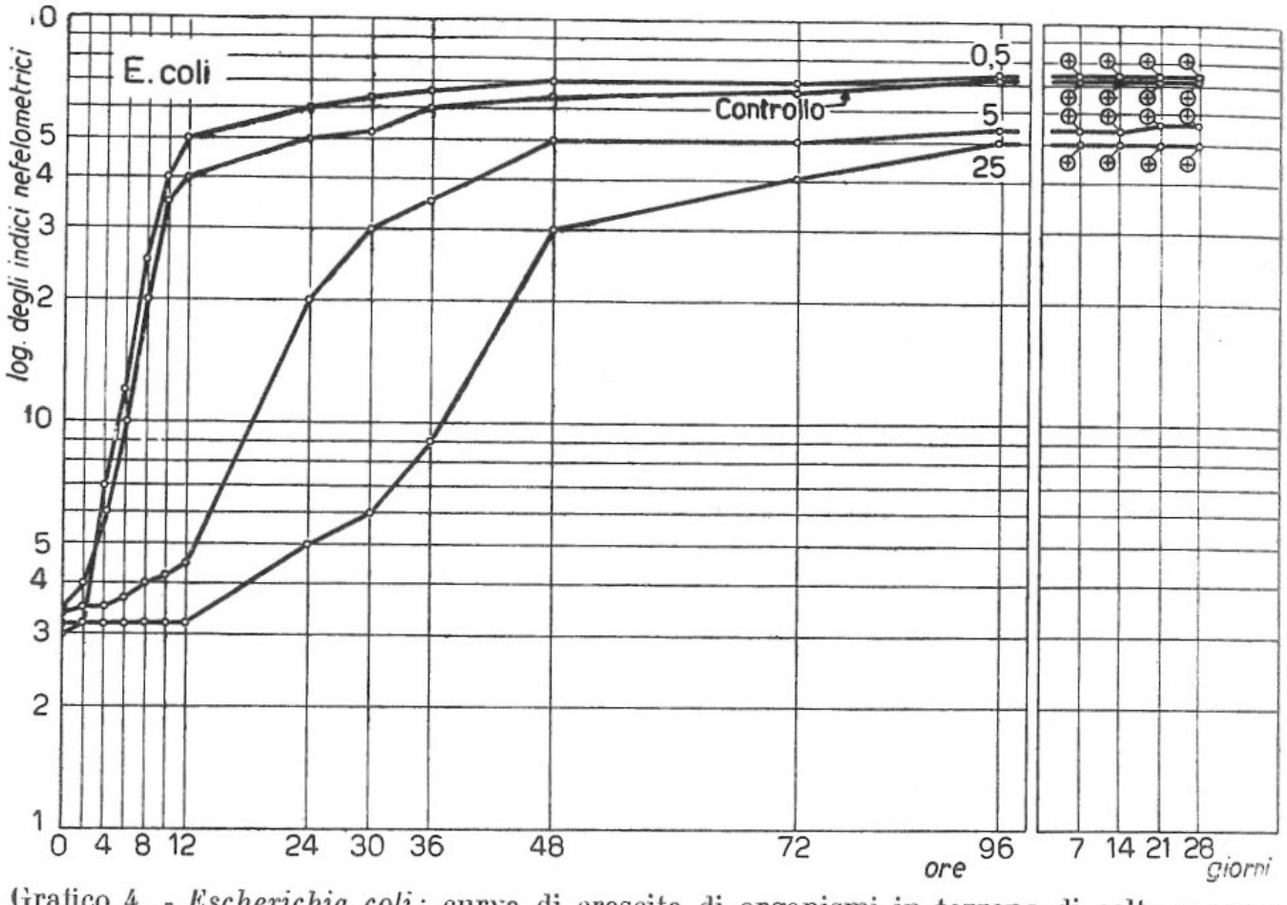


Grafico 4. - *Escherichia coli*: curva di crescita di organismi in terreno di coltura senza antibiotico (controllo) e con concentrazioni varie di eritromicina (0,5 - 5 - 25 γ/cm^3).

L'azione dell'eritromicina sui germi è stata studiata mediante osservazioni sistematiche al microscopio elettronico, secondo la tecnica e le modalità descritte da uno di noi in precedenti lavori.

Il primo gruppo di osservazioni è stato svolto su germi in fase biotica, vale a dire su organismi mantenuti in terreno colturale ed a temperatura di crescita. In provette contenenti 5 cm^3 di terreno colturale (brodo carne, brodo glucosato o altro terreno adatto per il germe in prova) si aggiungeva un'ansata di una brodocoltura di 18 h del germe in esame e quindi una quantità di eritromicina capace di esercitare un'azione inibente parziale sulla crescita batterica (dose subinibente). Le provette erano quindi tenute in termostato per periodi di tempo variabile: per 24 h per *Staph. aureus*, *E. coli*, *V. cholerae* e *Kl. pneumoniae;* per 48 h per *Strept. pyogenes*, *Dipl. pneumoniae* e *Haem. pertussis*.

Il contatto con dosi subinibenti di antibiotico non ha provato, in ge-

nerale, modificazioni apprezzabili sulla morfologia dei germi: in qualche caso (*V. cholerae*, *Staph. aureus*, *Strept. pyogenes*), il microrganismo appariva più grande che di norma, ma le caratteristiche morfologiche essenziali si erano mantenute integre.

Diversi sono stati invece i risultati ottenuti con l'impiego di quantità maggiori di antibiotico. Per queste prove abbiamo utilizzato brodocolture di 18 h del germe in esame, alle quali abbiamo aggiunto eritromicina in concentrazioni variabili da 0,5 a 100 γ/cm^3. Le colture erano quindi tenute per altre 24 h in termostato e poi osservate al microscopio elettronico. In queste condizioni di esperimento le alterazioni sono risultate molto più evidenti, ma simili nel complesso a quelle già osservate da uno di noi per l'azione di altri antibiotici ([16], [17]).

Descriviamo alcune delle più caratteristiche alterazioni morfologiche determinate dall'eritromicina, così come la microscopia elettronica ci ha permesso di evidenziare.

Le figg. 1 e 2 mostrano un ceppo di *Dipl. pneumoniae* proveniente da una coltura di 24 h, tenuto per altre 24 h a 37° C a contatto con 100 γ/cm^3: il germe appare ingrossato e mostra contorni irregolari; inoltre (fig. 2) ha perduto il caratteristico aspetto a fiamma di candela che, come risulta dai nostri precedenti lavori, è una caratteristica di questo ceppo.

La fig. 3 mostra lo *Staph. aureus*, ceppo Oxford, trattato nella identica maniera del pneumococco: i germi appaiono ingranditi e presentano un contorno irregolare; si osserva talvolta la presenza di vere e proprie estroflessioni del citoplasma. Anche il bacillo del carbonchio (fig. 4) trattato nella stessa maniera, mostra alterazioni strutturali che, in questo caso, arrivano fino alla frammentazione dell'elemento batterico.

L'*Haemophilus pertussis* (fig. 5) che, come abbiamo visto, è molto sensibile all'azione dell'eritromicina, trattato nell'identica maniera dei precedenti germi, mostra un disfacimento cellulare più intenso e completo.

Abbiamo voluto osservare anche al microscopio elettronico l'azione dell'eritromicina su germi relativamente resistenti all'antibiotico: la fig. 6 mostra l'*E. coli* tenuta per 24 h a 37° C a contatto con 100 γ/cm^3: nel citoplasma batterico si notano delle incisure a forma di semiluna; questo tipo di alterazione è ancora più evidente in un altro germe, anche esso resistente all'eritromicina: la *Kl. pneumoniae* (figg. 7 e 8).

Talvolta, come nel caso della *Br. melitensis*, l'eritromicina determina in maniera più evidente l'aumento delle dimensioni dell'organismo e la perdita della normale forma, come si rileva dal confronto tra la fig. 9

([16]) Scanga F. - Rend. Ist. Sup. San., XI: 980 (1948).
([17]) Scanga F. - Rend. Ist. Sup. San., XIII: 3 (1950).

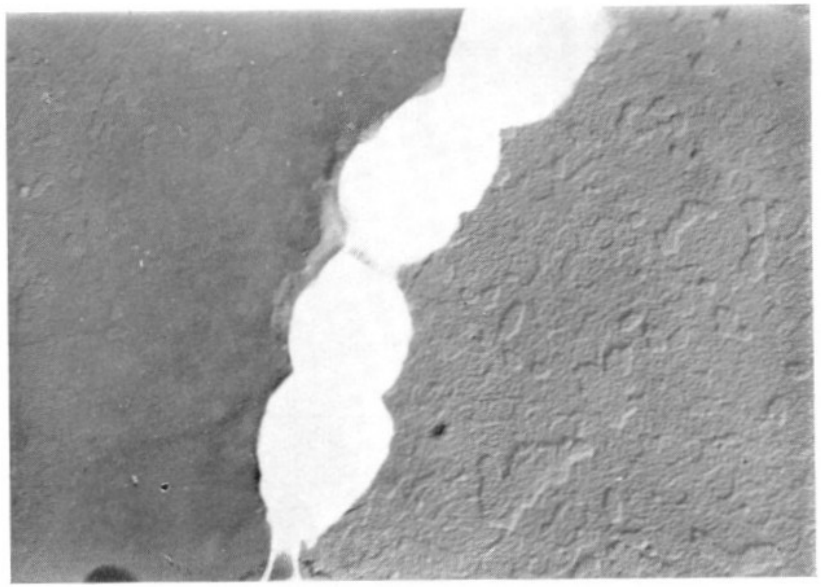
(elementi batterici normali) e la fig. 10 (elementi batterici trattati con eritromicina).

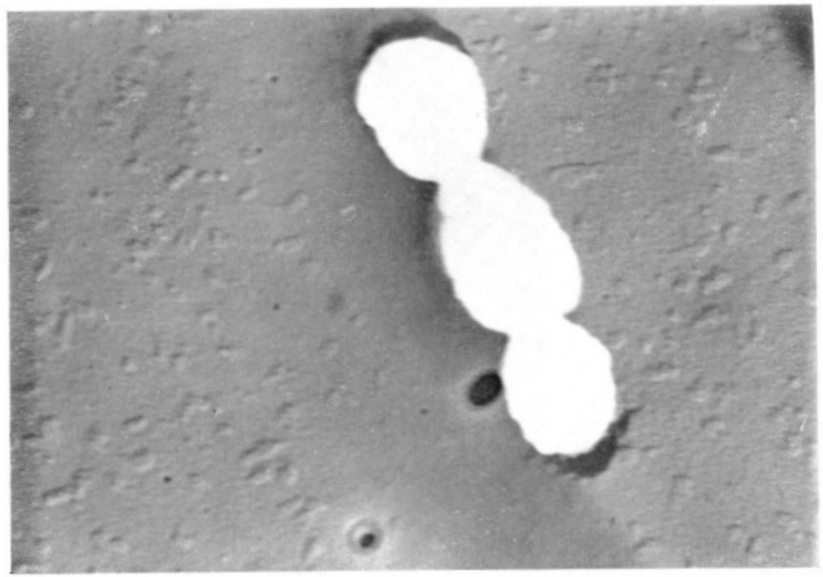
Ma le alterazioni più interessanti le abbiamo osservate nel vibrione del colera: come è noto, questo germe si può presentare sotto forma bacillare incurvata, spirillare o rotondeggiante; queste ultime forme compaiono in genere nelle colture vecchie. Noi abbiamo potuto rilevare nelle colture tenute a contatto con quantità minime di antibiotico (0,5 γ/cm^3, fig. 11), una netta prevalenza delle forme spirillari e rotondeggianti. In qualche organismo si è rilevata un'alterazione nel processo di scissione: la fig. 12 mostra una forma spirillare con un accenno di scissione nella sua parte centrale, là dove presenta una specie di estroflessione della membrana; ad una estremità si osserva invece la presenza di un organismo sferoidale ancora unito ad essa. Nella fig. 13 si rileva l'inizio del disfacimento della cellula batterica che appare più evidente nella fig. 14. Talvolta le formazioni rotondeggianti appaiono costituite dalla sola membrana cellulare, contenente frammenti di citoplasma (fig. 15), oppure appaiono aumentate nelle dimensioni e di forma irregolare (figg. 15 e 16).

Le alterazioni finora descritte si osservano con concentrazioni piccole di eritromicina (0,5-1,5 γ/cm^3); con concentrazioni maggiori (10 γ/cm^3) le alterazioni sono più intense: la struttura bacillare è completamente perduta, il germe disfatto, il citoplasma fuoriuscito all'esterno (figg. 17, 18 e 19). In qualche caso l'elemento cellulare è costituito unicamente dalla membrana batterica priva di ogni contenuto (fig. 19), alterazione questa da noi già messa in evidenza per azione della penicillina e della streptomicina.

Sui germi in fase anabiotica, tenuti cioè in soluzione fisiologica, a contatto con l'eritromicina, l'antibiotico non determina alterazioni apprezzabili. La fig. 20 mostra il vibrione del colera tenuto in soluzione fisiologica, a contatto con 10 γ di eritromicina/cm^3 per 48 h: si osserva solo una coartazione centrale, ma uniforme di tutto il citoplasma, imputabile, verosimilmente, alle condizioni tecniche di esperimento.

Dalle nostre esperienze risulta che l'eritromicina esplica la sua azione sui germi in fase di moltiplicazione attiva e non su quelli in « *resting phase* »; tale azione è strettamente dipendente dalla sensibilità dell'organismo batterico verso l'eritromicina e dalla concentrazione dell'antibiotico. Nei casi in cui tale concentrazione è tenuta ad un livello relativamente basso, dopo un periodo di arresto della crescita batterica, di durata variabile, a seconda del germe e della concentrazione dell'antibiotico, la moltiplicazione batterica riprende, così che, in ultima analisi, l'azione del-





Figg. 1 e 2. - Dipl. pneumoniae, ceppo Ist. Pasteur, tenuto a contatto con 100 γ di eritromicina per cm^3: organismi ingrossati, a contorni irregolari, che non mostrano più la caratteristica forma a fiamma di candela (× 20.000).

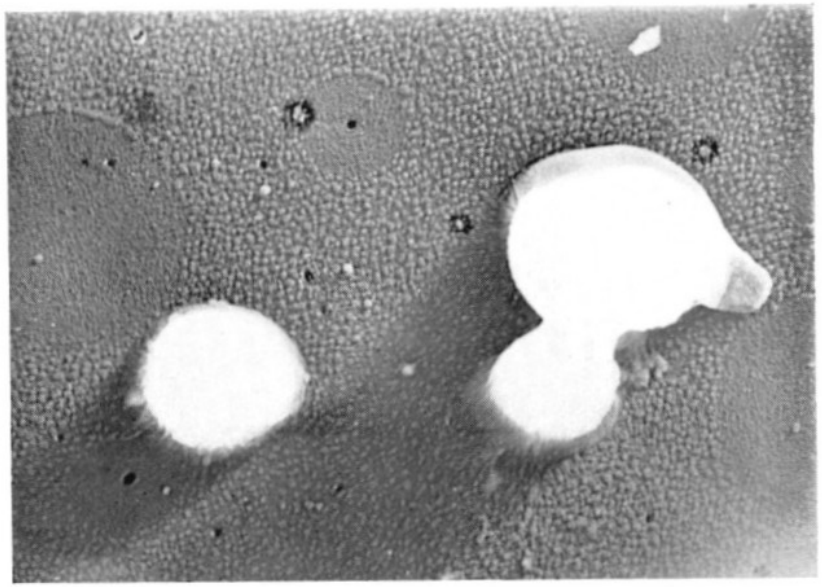


Fig. 3. - Staph. aureus, ceppo Oxford, trattato con antibiotico come il pneumococco: oltre all'ingrossamento e al contorno irregolare del germe, si notano delle vere e proprie estroflessioni di citoplasma (× 20.000).

Fig. 4. - B. anthracis, ceppo Perugia, trattato nella stessa maniera: si osserva una vera e propria frammentazione dell'elemento batterico (× 12.000).

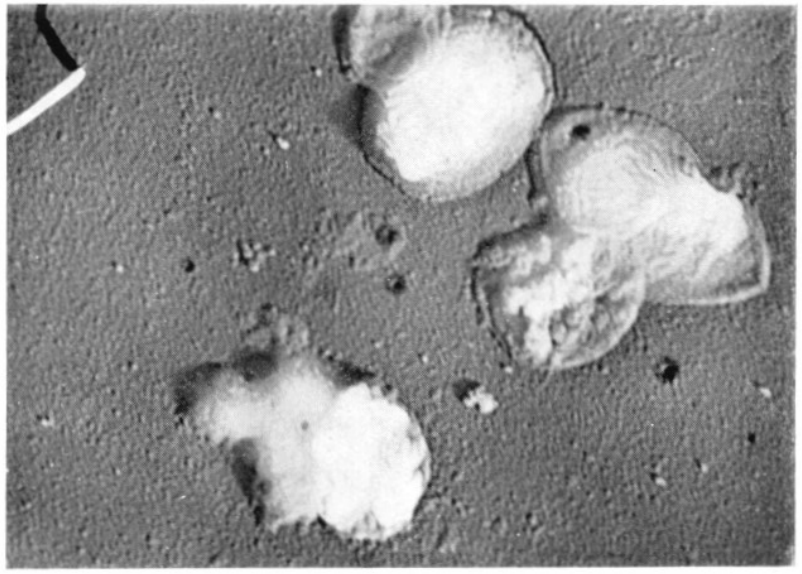


Fig. 5. - Haem. pertussis, ceppo 4 a, trattato nella stessa maniera: il disfacimento cellulare appare più intenso e completo (× 20.000).

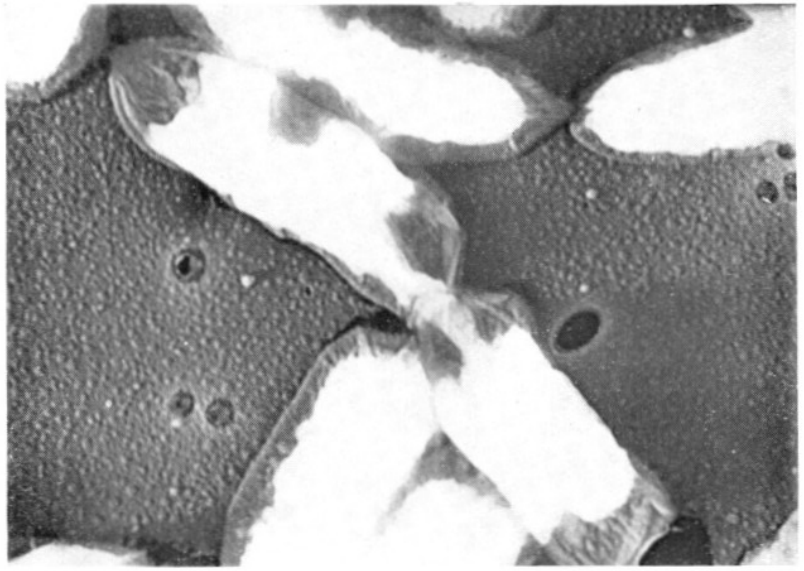
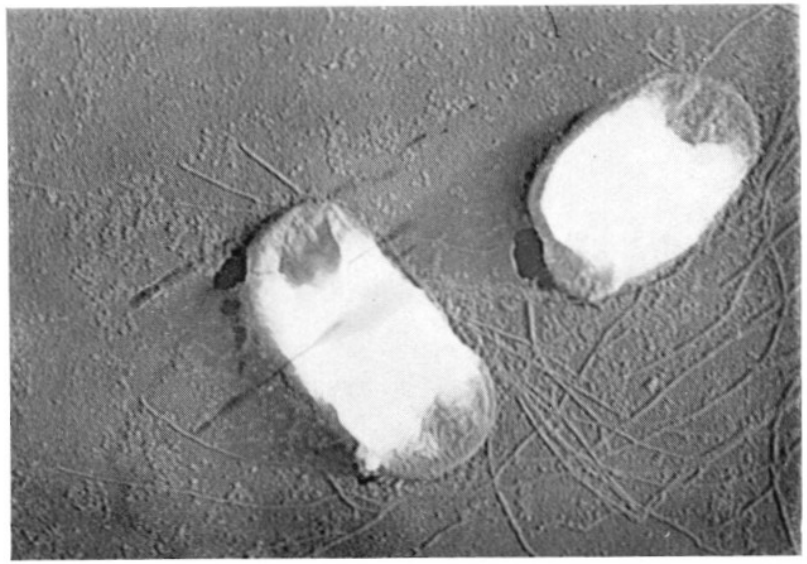
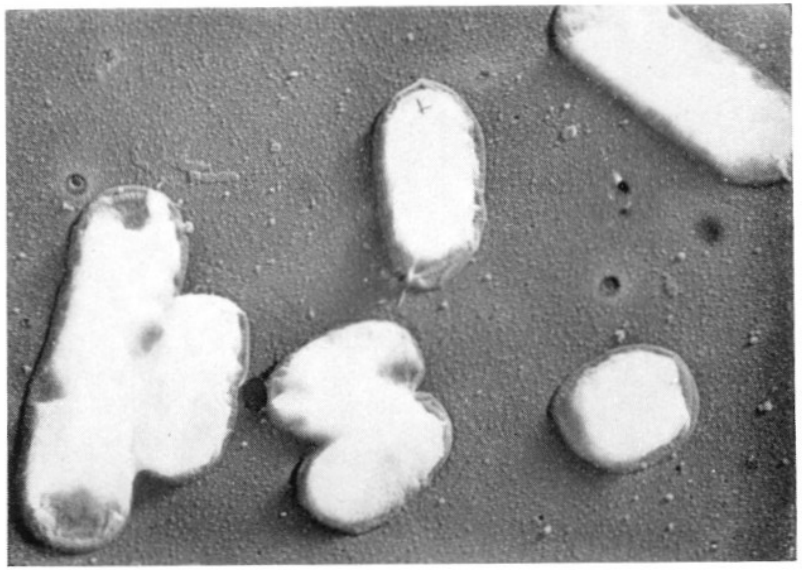
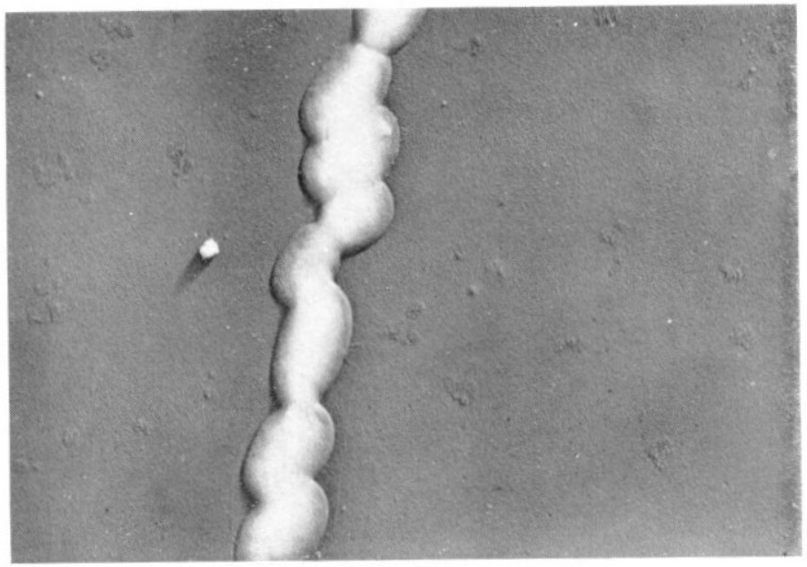


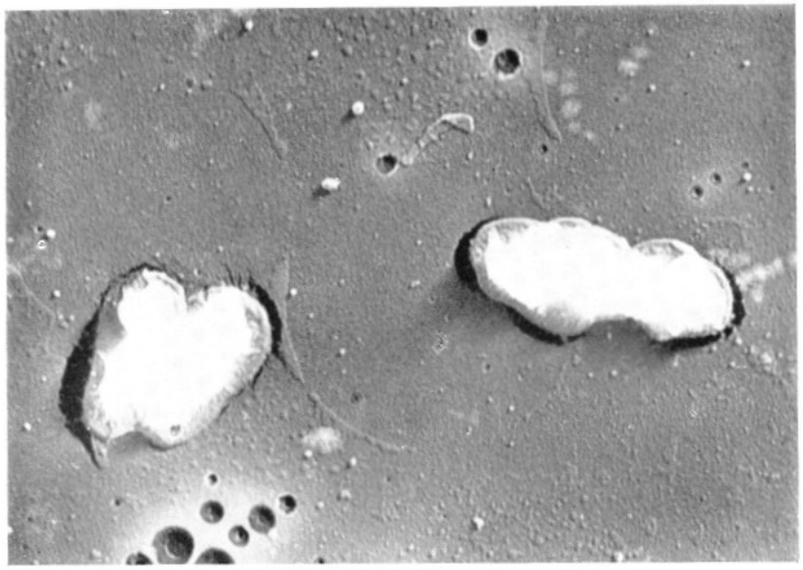
Fig. 6. - E. coli, ceppo N. 4, trattato nella stessa maniera: nel citoplasma batterico si notano delle perdite di sostanza a forma di semiluna (× 20.000).



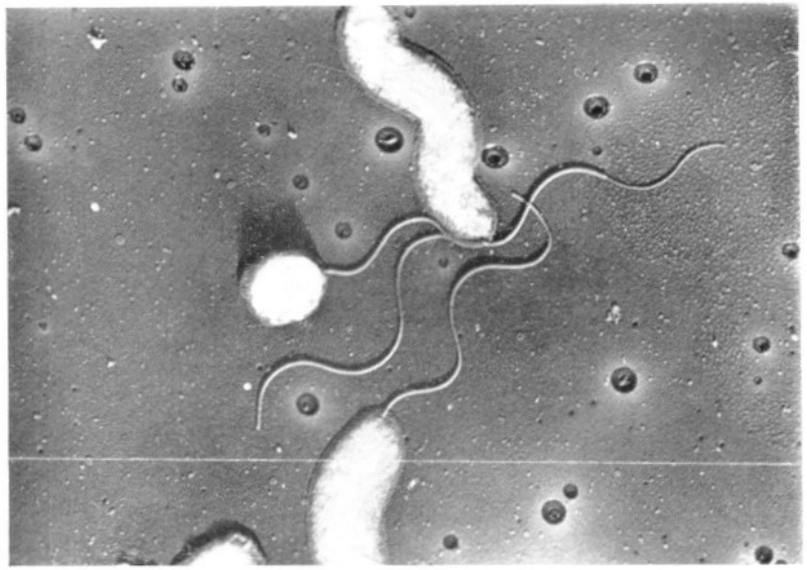


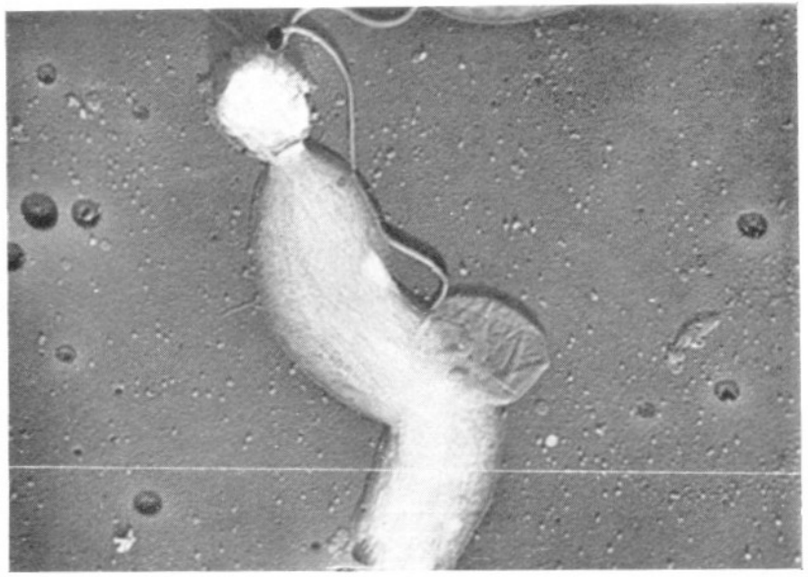
Figg. 7 e 8. - Kl. pneumoniae, ceppo PCI 602, organismo resistente all'azione dell'eritromicina: si osservano, tuttavia, le stesse alterazioni dell'*E. coli* (fig. 7, × 20.000; fig. 8, × 12.000).



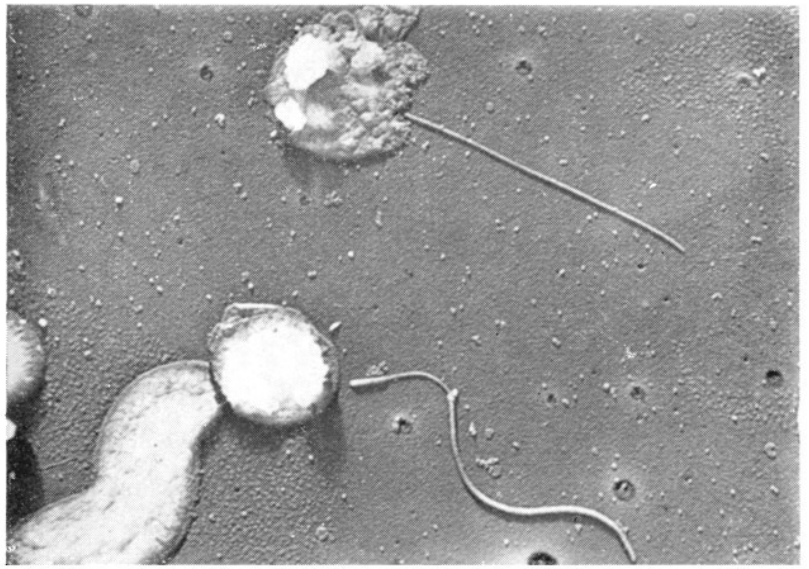


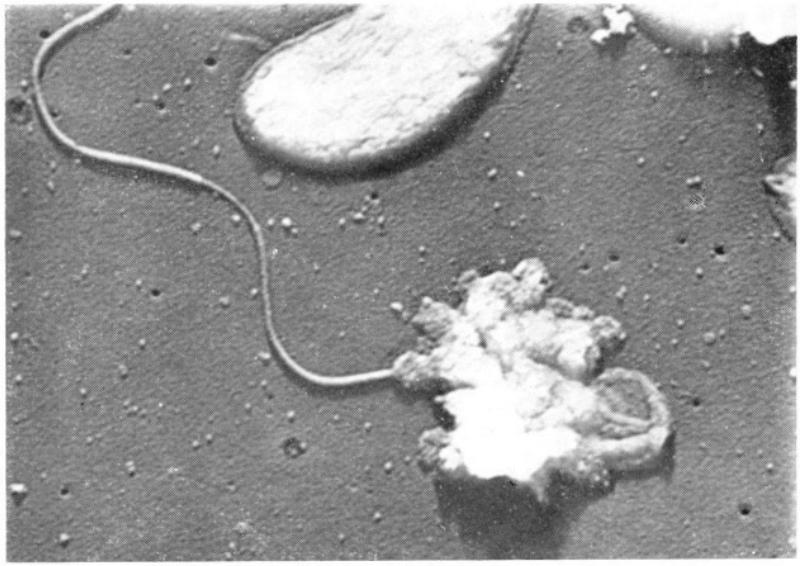
Figg. 9 e 10. - Br. melitensis, ceppo Allemandi, da brodocoltura normale, nella fig. 9 (× 12.000) e da brodocoltura trattata con eritromicina nella fig. 10 (× 11.000): si rileva un aumento delle dimensioni del germe ed una alterazione cospicua della normale forma batterica.

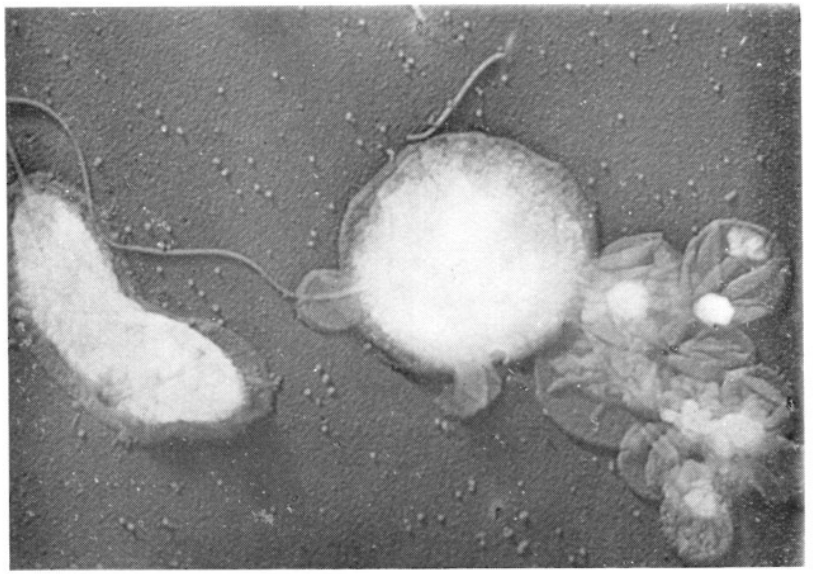


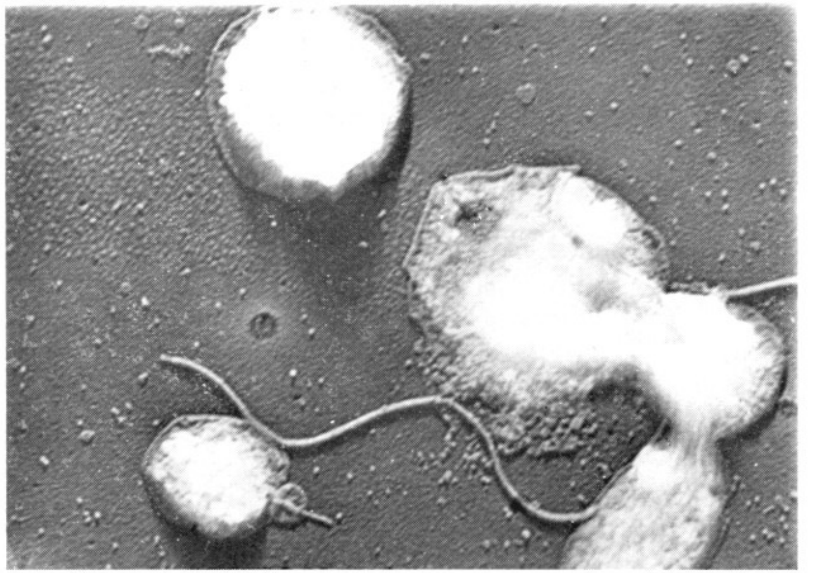


Figg. 11 e 12. - V. cholerae, ceppo Inaba, trattato con dosi minime di eritromicina (0,5 γ/cm^3): si nota il prevalere di forme spirillari e a palla (fig. 11, × 10.000); nella fig. 12 (× 15.000) si osserva anche un processo di scissione irregolare e la presenza di una estroflessione della membrana cellulare.

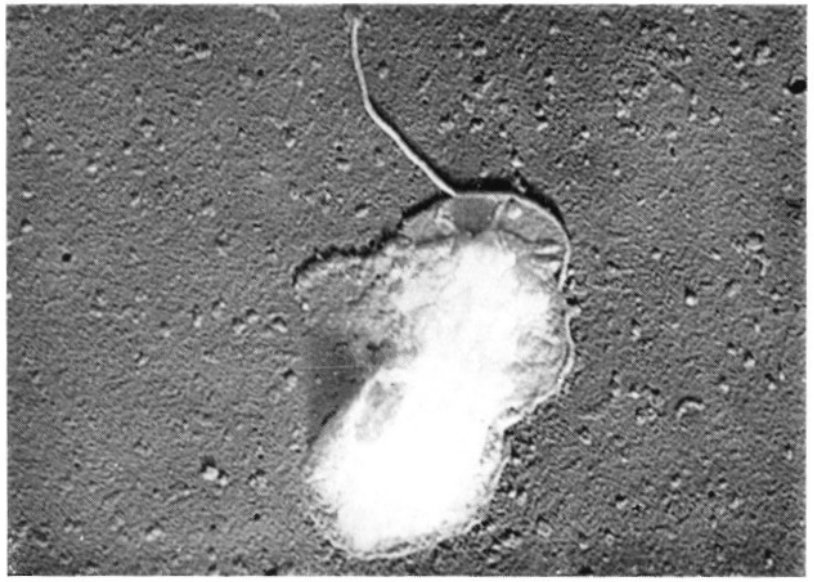








Figg. 13, 14, 15 e 16. - V. cholerae, ceppo Inaba, trattato con 1,5 γ/cm^3 di eritromicina: vari tipi di alterazioni determinate dall'antibiotico; si rilevi l'intenso disfacimento cellulare, in alcuni casi (fig. 13, × 15.000; figg. 14, 15 e 16, × 20.000).



Figg. 17 e 18. - V. cholerae, ceppo Inaba, trattato con 10 γ/cm^3 di eritromicina: la normale struttura bacillare è completamente perduta, il corpo batterico appare disfatto ed il citoplasma uscito all'esterno (× 15.000).

Fig. 19. - V. cholerae, ceppo Inaba, trattato con 10 γ/cm^3 di eritromicina: l'elemento cellulare risulta costituito unicamente dalla membrana batterica svuotata di ogni suo contenuto (× 15.000).

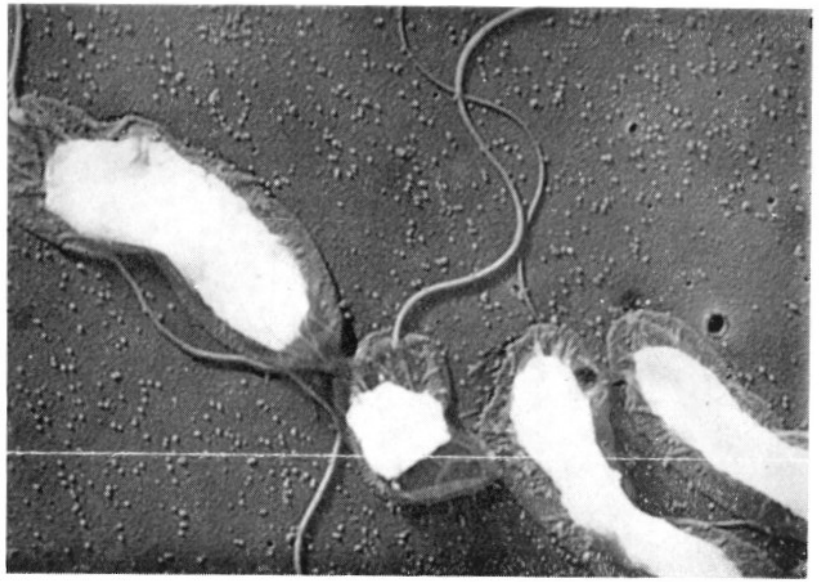


Fig. 20. - V. cholerae, ceppo Inaba, sospeso in soluzione fisiologica e tenuto a contatto con 10 γ/cm^3 di eritromicina: coartazione centrale ma uniforme di tutto il citoplasma, imputabile verosimilmente alle condizioni tecniche di esperienza (× 15.000).

l'antibiotico in tali condizioni di esperimento, consiste in una batteriostasi transitoria e, nella rappresentazione grafica dell'accrescimento batterico, si traduce in un semplice prolungamento del normale periodo di latenza.

Nei casi in cui l'eritromicina trovasi a contatto con germi molto sensibili ed in concentrazioni piuttosto elevate (10-100 γ/cm^3), l'azione batteriostatica dell'antibiotico si prolunga, nelle nostre condizioni di esperimento, oltre i 28 giorni e, durante questo periodo, le subcolture eseguite su terreno senza antibiotico risultano sterili.

Nelle osservazioni al microscopio elettronico si è rilevato che concentrazioni subinibenti di antibiotico non determinano sui microorganismi modificazioni morfologiche apprezzabili; in qualche caso si è osservato un aumento delle dimensioni, ma generalmente le caratteristiche citologiche sono rimaste immutate.

Concentrazioni maggiori di eritromicina (da 0,5 a 100 γ/cm^3) danno alterazioni morfologiche più marcate: i microorganismi appaiono infatti ingranditi, presentano un contorno irregolare, mostrano talvolta vere e proprie estroflessioni citoplasmatiche o delle incisure nel citoplasma a forma di semiluna; in alcuni casi si arriva ad osservare un disfacimento cellulare completo. Le alterazioni più intense e più caratteristiche sono quelle osservate nel *V. cholerae*.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.