

3. L. TENTORI e G. VIVALDI — **Sindrome mortale caratterizzata da manifestazioni a carico del sistema nervoso nel ratto alimentato con dieta altamente purificata contenente solfonamidoguanidina. - III. Sulla attività preventiva delle feci di ratti ad alimentazione normale e di alcune frazioni di esse.**

Riassunto. — Nel corso di nuove ricerche sulla sindrome mortale caratterizzata da manifestazioni a carico del sistema nervoso (S.M.N.) che insorge in ratti alimentati con una dieta sintetica altamente purificata contenente solfonamidoguanidina, gli AA. hanno potuto compiere le seguenti osservazioni:

1) la S.M.N. è sempre riproducibile alimentando gli animali con le diete usate nei precedenti esperimenti.

2) La mancanza nella dieta di acido folico non ha alcuna relazione con la produzione della S.M.N.

3) Alimentando i ratti con la dieta naturale standard di McCOLLUM non si osserva in nessun caso l'insorgenza della S.M.N. anche aggiungendo a questa dieta il 2% di solfonamidoguanidina.

4) L'aggiunta alla dieta di feci essiccate e polverizzate provenienti da animali ad alimentazione normale è attiva nel prevenire l'insorgenza della S.M.N.

5) Questa attività è posseduta anche, ma in minor grado, dalle feci di animali alimentati con una dieta sintetica addizionata di streptomina, mentre le feci di animali alimentati con la stessa dieta sintetica contenente solfonamidoguanidina sono inattive.

6) Una parte della attività rimane nel residuo dopo estrazione con etere delle feci di animali ad alimentazione normale, mentre l'estratto eterico non dimostra alcuna attività. Riunendo le due frazioni non si ricostituisce la attività primitiva.

7) Il trattamento con il calore secco in stufa a 100° distrugge in gran parte, ma non completamente, l'attività preventiva contro la S.M.N. presente nelle feci di animali ad alimentazione normale.

Sulla base dei risultati ottenuti gli AA. hanno emesso l'ipotesi che l'attività preventiva contro la S.M.N., posseduta dalla dieta naturale standard di McCOLLUM, sia dovuta alla presenza in essa di una sostanza, o di un gruppo di sostanze non identificate; l'attività preventiva delle feci sarebbe invece in relazione con i microrganismi costituenti la flora intestinale degli animali normali ed emessi da questi con le feci, o attraverso la loro azione diretta sulla composizione della flora intestinale degli animali trattati, o attraverso l'apporto di prodotti del loro metabolismo.

Résumé. — Au cours de nouvelles recherches sur le syndrome mortel caractérisé par des manifestations dues au système nerveux (S.M.N.) chez les rats alimentés avec une diète synthétique hautement purifiée contenant de la sulfonamidoguanidine, les auteurs ont pu faire les observations suivantes :

1) On peut toujours produire le S.M.N. en nourrissant les animaux avec les diètes dont on s'est servi dans les expériences précédentes.

2) Le manque d'acide folique dans la diète n'a aucune relation avec la production de S.M.N.

3) En nourrissant les rats avec la diète naturelle standard de McCOLLUM, on n'observe en aucun cas les manifestations de S.M.N. même si l'on ajoute à cette diète le 2% de sulfonamidoguanidine.

4) L'addition à la diète de fèces desséchées et pulvérisées provenant d'animaux dont l'alimentation est normale et active pour prévenir les manifestations du S.M.N.

5) Cette activité, mais à un degré inférieur, est aussi possédée par les fèces des animaux nourris avec une diète synthétique ayant une addition de streptomycine, tandis que les fèces des animaux nourris avec la même diète synthétique contenant sulfonamidoguanidine sont inactives.

6) Une partie de cette activité reste dans le résidu après extraction par l'éther des fèces des animaux à nourriture normale, tandis que l'extrait étheré ne montre aucune activité. En réunissant les deux fractions, l'activité primitive ne se reconstitue pas.

7) Le traitement à la chaleur sèche au four à 100° détruit en grande partie, mais non pas complètement, l'activité préventive contre le S.M.N. présente dans les fèces des animaux à nourriture normale.

Sur la base des résultats obtenus, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'activité préventive contre les S.M.N. par la diète naturelle standard de McCOLLUM, soit due à la présence d'une substance, ou d'un groupe de substances non identifiées; l'activité préventive des fèces serait au contraire due aux micro-organismes de la flore intestinale des animaux normaux (et émis par ceux-ci dans les fèces), ou moyennant leur action directe sur la composition de la flore intestinale des animaux traités, ou moyennant l'apport de produits de leur métabolisme.

Summary. — 1) Further researches have been performed on the mortal syndrome characterized by neurological symptoms (S.M.N.) which affects rats fed a purified synthetic diet containing sulfaguanidine;

2) S.M.N. can always be produced feeding animals with the diets used in the foregoing experiments;

3) The absence of folic acid in the diet is by no means related to the production of S.M.N.;

4) Rats fed McCOLLUM's standard natural diet, did never show S.M.N., even when 2% of sulfaguanidine was added;

5) Dried and pulverized feces from normally fed animals added to the diet in the amount of 5% were active in preventing the S.M.N.;

6) Such activity was shown, although in a less degree, by the feces of animals fed with the same synthetic diet containing streptomycin, while the feces of animals fed with the same diet containing sulfaguanidine were ineffective;

7) A part of this activity remained in the residue after ether extraction of the feces of normally fed animals; no activity was shown by ether extract. Recollection of the two fraction did not restore original activity;

8) Treatment with dry heat in a stove at 100° resulted in a large but not complete destruction of S.M.N. preventive activity present in the feces of normally fed animals.

The authors have therefore put forward the hypothesis that the S.M.N. preventive activity shown by McCOLLUM's standard diet is due to the presence in its of a unidentified substance or group of substances; the activity of the feces, on the other hand, could be related to the microorganisms of the intestinal flora of normal animals contained in them, through a direct action on the composition of the intestinal flora of treated animals or through the supply of products of their metabolism.

Zusammenfassung. — Im Lauf neuer Forschungen über durch Manifestationen des Nervensystems gekennzeichnete Lethasynndrome (S.M.N.) bei mit stark gereinigter synthetischer, Sulfonamidguanidin enthaltender Diät gefütterten Ratten konnten die Verfasser folgende Beobachtungen anstellen:

1) Die S.M.N. kann immer durch Fütterung der Tiere mit der in den vorhergehenden Versuchen verabreichten Diät hervorgerufen werden.

2) Der Mangel an Folin-Säure in der Diät hat nichts mit dem Auftreten der S.M.N. zu tun.

3) Bei Verabreichung der natürlichen Standarddiät nach McCOLLUM wurde in keinem Fall das Auftreten der S.M.N. beobachtet und zwar auch nicht nach Hinzufügen von 2% Sulfonamidguanidin zu der Diät.

4) Das Hinzufügen von getrocknetem und pulverisiertem Kot von normal ernährten Tieren verhütet das Auftreten der S.M.N.

5) Die gleiche Wirkung hat, wenn auch in geringerem Ausmass, Kot von Tieren, die mit synthetischer Diät unter Hinzufügung von Streptomycin gefüttert waren, während der Kot von Tieren, die mit der gleichen synthetischen Diät gefüttert wurden, die jedoch Sulfonamidguanidin enthielt, wirkungslos war.

6) Nach Extraktion des Kots normal ernährter Tiere mit Aether blieb ein Teil der Wirksamkeit im Rückstand erhalten, während der Extrakt selbst keinerlei Wirkung hat. Durch Wiederverbindung der beiden Fraktionen wird die ursprüngliche Wirksamkeit nicht wiederhergestellt.

7) Trockene Hitze im Ofen bei 100° zerstört zum grossen Teil wenn auch nicht vollständig die Verhütungswirkung gegen die S.M.N., die im Kot normal ernährter Tiere vorhanden ist. Aufgrund der erzielten Ergebnisse stellten die Verfasser die Hypothese auf, dass die Verhütungswirkung der natürlichen Standarddiät nach McCOLLUM gegen die S.M.N. nicht einer in derselben vorhandenen, nicht identifizierten Substanz oder einer Gruppe solcher Substanzen zu verdanken ist. Die Verhütungswirkung sei vielmehr den mit dem Kot ausgeschiedenen Mikro-Organismen der Darmflora normal ernährter Tiere zu verdanken bzw. der direkten Einwirkung dieser Mikro-Organismen auf die Darmflora der behandelten Tiere oder auch der Zufuhr von Stoffwechselprodukten.

In due precedenti lavori (1-2) abbiamo descritto la sindrome mortale caratterizzata da manifestazioni a carico del sistema nervoso (S.M.N.) che insorge in ratti albinetti alimentati con una dieta sintetica purificata contenente il 2% di solfonamidoguanidina e addizionata di tutti i fattori vitaminici conosciuti ad eccezione dell'acido folico. I risultati ottenuti nel corso dei due esperimenti hanno dimostrato che questa sindrome non è provocata dall'azione tossica della solfonamidoguanidina assorbita in piccola percentuale attraverso il tratto intestinale, e che può essere prevenuta mediante la somministrazione di feci essiccate e polverizzate di ratti ad alimentazione normale mescolate alla dieta nella proporzione del 5%. Pertanto abbiamo emesso l'ipotesi che le cause dell'insorgenza della S.M.N. risiedano nelle modificazioni della flora microbica intestinale provocate dall'azione locale del prodotto solfonamidico usato, e che la

attività protettiva delle feci sia dovuta alla presenza in esse di un « quid » sconosciuto nella natura e nel meccanismo d'azione.

Il presente lavoro è stato concepito con i seguenti scopi:

1) Controllare i risultati e le conclusioni a cui eravamo giunti nei precedenti esperimenti.

2) Stabilire se le feci provenienti da animali alimentati con dieta basale sintetica contenente streptomycina all'1‰ e quelle di animali alimentati pure con la stessa dieta ma contenente solfonamidoguanidina al 2% possiedano o meno la stessa attività preventiva delle feci di animali alimentati con regime alimentare standard di allevamento.

3) Indagare se sia possibile ritrovare la presenza del « quid » attivo, dopo un preliminare frazionamento delle feci di animali normali.

TECNICA SPERIMENTALE — Le diete usate nel presente esperimento sono state le seguenti:

Dieta A 6

Regime alimentare standard di McCOLLUM per allevamento.	
(Frumento macinato 67,5%; caseina greggia 15%; polvere di latte intero 10%; burro 5,2%; NaCl 0,8%; CaCO ³ 1,5%)	
	g 100
Lievito di birra secco iperattivo	g 2
Acido ascorbico	mg. 20
Solfonamidoguanidina	g 2

Dieta A 1

Caseina purificata priva di fattori idrosolubili	g 18
Saccarosio	g 67
Miscela salina secondo Osborne e Mendel	g 4
Burro	g 9
Olio di fegato di merluzzo	g 2

Ad ogni Kg. della dieta venivano aggiunte le seguenti sostanze ad attività vitaminica:

Tiamina	mg 10
Riboflavina	mg 20
Piridossina	mg 10
Acido nicotinico	mg 100
Pantotenato di calcio	mg 100
Acido p-aminobenzoico	mg 100
Acido ascorbico	mg 100
Colina cloridrato	mg 200
Inositolo	mg 200
Menadione sodio bisolfito	mg 50
Alfa tocoferolo	mg 100
Linoleato di etile	mg 100

Dieta II

Dieta A 1	g 1000
Solfonamidoguanidina	g 20

Dieta A 2

Dieta II	g 1000
Acido folico	mg 5

Dieta A 3

Dieta A 1	g 1000
Acido folico	mg 5
Streptomycina	g 1

Le altre diete che riportiamo sotto sono tutte modificazioni della dieta A 2; ad essa sono state aggiunte volta a volta feci essiccate e frazioni di feci ottenute con vari trattamenti, sottraendo contemporaneamente la stessa quantità di saccarosio allo scopo di non alterare la percentuale di solfonamidoguanidina presente nella dieta.

Dieta A 7

Dieta A 2	g 950
Feci essiccate e polverizzate di ratti ad alimentazione normale	g 50

Dieta A 8

Dieta A 2	g 950
Feci essiccate e polverizzate di ratti alimentati con dieta A 2 contenente streptomycina 1‰ al posto della solfonamidoguanidina	g 50

Dieta A 9

Dieta A 2	g 950
Feci essiccate e polverizzate di ratti alimentati con Dieta A 2	g 50

Dieta A 10

Dieta A 2	g 1000
Estratto etereo di g. 50 di feci di ratti ad alimentazione normale	

Dieta A 11

Dieta A 2	g 950
Residuo dopo estrazione eterea di feci di ratti ad alimentazione normale	g 50

Dieta A 12

Dieta A 2	g 950
Residuo dopo estrazione eterea di feci di ratti ad alimentazione normale	g 50
Estratto etereo di g. 50 di feci di ratti ad alimentazione normale	

Dieta A 13

Dieta A 2	g 950
Feci essiccate e polverizzate di ratti ad alimentazione normale sottoposti alla temperatura di 100° per 1 ora in stufa a secco	g 50

Le feci che sono state usate nel corso dell'esperimento provenivano dai ratti albinì della colonia di allevamento dell'Istituto Superiore di Sanità alimentati con Regime alimentare standard di McCOLLUM, o da un gruppo dei ratti albinì che ricevevano la dieta A 3 contenente streptomicina 1‰ o la dieta A 2 contenente solfonamidoguanidina al 2%. Dopo un preliminare lavaggio con acqua di fonte, le feci venivano essiccate in stufa a bassa temperatura in corrente d'aria e quindi polverizzate; l'estratto etereo si otteneva mediante estrazione continua in apparecchio di Soxhlet per 24 h con etere privo di perossidi; la frazione solubile in etere veniva aggiunta alla dieta ancora disciolta nel solvente: l'etere evaporava completamente durante l'impastamento; anche il residuo dopo estrazione eterea veniva aggiunto alla dieta direttamente, evaporando, anche in questo caso, l'etere durante l'impastamento. Nel caso della dieta A 10 le due frazioni venivano riunite prima di essere aggiunte alla dieta. Un'altra parte delle feci essiccate e polverizzate veniva sottoposta al riscaldamento in stufa a secco per 1 h a 100°.

In un primo esperimento 166 ratti albinì dei due sessi del peso di circa 40 g. provenienti dall'allevamento del nostro Istituto, sono stati suddivisi in 11 gruppi seguendo il metodo del sorteggio e curando che in ciascun gruppo fossero presenti un ugual numero di ratti dei due sessi.

Ciascun gruppo ha ricevuto « ad libitum » per tutta la durata dello esperimento, una delle diete sopraelencate che sono state distribuite tra i gruppi secondo il seguente schema:

Gruppo I	19 animali	Dieta II
Gruppo II	19 animali	Dieta A 2
Gruppo III	19 animali	Dieta A 3
Gruppo IV	12 animali	Dieta A 7
Gruppo V	12 animali	Dieta A 8

Gruppo VI	12 animali	Dieta A	9
Gruppo VII	12 animali	Dieta A	10
Gruppo VIII	12 animali	Dieta A	11
Gruppo IX	12 animali	Dieta A	13
Gruppo X	28 animali	Dieta A	6
Gruppo XI	28 animali	Dieta A	1

Gli animali venivano pesati una volta alla settimana ed osservati ogni giorno per rilevare eventuali segni patologici. Quando essi presentavano i primi segni della S.M.N. venivano posti in gabbia isolata e sottoposti a sorveglianza fino alla morte. Di ogni animale venuto a morte veniva eseguita l'autopsia; gli organi venivano pesati e fissati per l'esame istologico.

In un secondo esperimento 70 ratti albinici anche essi provenienti dall'allevamento del nostro Istituto, del peso di circa 40 g. e dei due sessi sono stati suddivisi, sempre mediante sorteggio, in 6 gruppi secondo lo schema seguente:

Gruppo XII	40 animali	Dieta II	
Gruppo XIII	5 animali	Dieta A	2
Gruppo XIV	5 animali	Dieta A	7
Gruppo XV	5 animali	Dieta A	10
Gruppo XVI	5 animali	Dieta A	11
Gruppo XVII	10 animali	Dieta A	12

Anche in questo secondo esperimento è stato seguito lo stesso procedimento per l'osservazione e l'autopsia degli animali.

RISULTATI E DISCUSSIONE — I risultati ottenuti nel corso del primo esperimento sono riportati nella tabella I, quelli del secondo esperimento nella tabella II. Nella stesura delle tabelle abbiamo ritenuto opportuno distinguere gli animali morti durante i primi 20 giorni dell'esperimento da quelli che sono sopravvissuti oltre tale periodo di tempo, arbitrariamente stabilito, in modo da escludere quegli animali che non resistevano al cambiamento di ambiente e di alimentazione. Sia la sopravvivenza media sia la percentuale di mortalità sono state calcolate tenendo conto soltanto degli animali che avevano superato il primo periodo di adattamento; di questi sono state inoltre indicate, in giorni dall'inizio dell'esperimento, i limiti estremi della sopravvivenza per fornire un quadro della durata della vita dei ratti di ciascun gruppo.

Nel corso del primo esperimento abbiamo istituito dei gruppi di controllo: il gruppo I, per verificare la riproducibilità della S.M.N., è stato alimentato con la dieta II usata nel corso delle esperienze i cui ri-

TABELLA I

Gruppi	Dieta	N° animali	Morti che hanno presentato la S.M.N.			Morti che non hanno presentato la S.M.N.			
			N°	sopravvi- venza media (giorni dallo inizio dello esperimento)	periodo in cui sono morti gli animali che hanno superato la fase iniziale dell'esperimento	N°	sopravvi- venza media (giorni dallo inizio dello esperimento)	periodo in cui sono morti gli animali che hanno superato la fase iniziale dell'esperimento	
								%	
Gruppo I	II	19	13	130	13	94-187	6	40	23,5
Gruppo II	A2	19	13	139	13	66-230	6	47	18,8
Gruppo III	A3	19	—	—	—	—	19	590	
Gruppo IV	A7	12	—	—	—	—	12	404	
Gruppo V	A8	12	2	389	2	208-570	10	409	83,3
Gruppo VI	A9	12	9	142	9	82-215	3	80	18,2
Gruppo VII	A10	12	8	148	8	74-213	4	211	20,0
Gruppo VIII	A11	12	6	448	6	122-640	6	380	45,5
Gruppo IX	A13	12	7	274	7	135-641	5	371	36,4
Gruppo X	A6	28	—	—	—	—	28	655	
Gruppo XI	A1	28	—	—	—	—	28	640	

TABELLA II

Gruppo XII	II	40	33	64	33	24-112	7	62	10,8
Gruppo XIII	A2	5	3	157	3	153-160	2	99	40,0
Gruppo XIV	A7	5	—	—	—	—	5	289	
Gruppo XV	A10	5	4	85	4	76-93	1	70	20,0
Gruppo XVI	A11	5	1	470	1	470	4	271	75,0
Gruppo XVII	A12	10	4	152	4	107-184	6	230	60,0

sultati sono stati già pubblicati; naturalmente gli animali di questo gruppo che presentavano segni di carenza di acido folico sono stati volta a volta curati con la somministrazione di questo fattore per via parenterale alla dose di 250 µg alla settimana. Il gruppo II ha invece ricevuto la stessa dieta contenente però 5 mg di acido folico per Kg., in modo da escludere definitivamente che questo possa giocare un qualsiasi ruolo nella produzione della sindrome. Gli animali del gruppo III hanno ricevuto la dieta A 1 addizionata di acido folico e di streptomina (dieta A 3) per accertare se l'aggiunta di questo antibiotico, attraverso la sua azione a livello della flora intestinale, provochi, a lungo andare, l'insorgenza della S.M.N. Per escludere inoltre che questa sia dovuta ad un'azione tossica cronica della solfonamidoguanidina, gli animali del gruppo X sono stati alimentati con la dieta A 6 costituita di una dieta standard naturale di allevamento addizionata di solfonamidoguanidina nella stessa percentuale delle altre diete usate. Un ultimo gruppo di controllo, l'XI è stato allestito per accertare se la dieta basale sintetica A 1 priva di solfonamidoguanidina, è capace di assicurare ai ratti un normale accrescimento ed un normale svolgimento della vita. Nella quasi totalità degli animali appartenenti ai gruppi di controllo I e II, è insorta la caratteristica malattia con gli stessi sintomi e lo stesso decorso già descritti; la piccola percentuale di animali che non ha presentato questi sintomi è deceduta nei primi mesi dell'esperimento, prima in ogni modo che la S.M.N. cominciasse ad apparire negli animali sopravvissuti. Non essendosi riscontrata nessuna differenza significativa fra le mortalità degli animali dei due gruppi, si può concludere che la mancanza di acido folico nella dieta non giuoca alcun ruolo nella produzione della S.M.N.

Nessuno degli animali degli altri 3 gruppi di controllo, III, X, XI, ha presentato la S.M.N. Naturalmente per escludere con certezza assoluta la possibilità della insorgenza, anche molto tardiva, della S.M.N. in questi animali è stato necessario seguirli fino alla loro morte avvenuta, in molti casi, oltre due anni dopo l'inizio dell'esperimento. Particolarmente interessante il caso degli animali del gruppo XI, nessuno dei quali, pur avendo ricevuto solfonamidoguanidina in aggiunta alla dieta standard naturale per tutta la durata della vita, ha presentato la S.M.N.: ciò permette di escludere definitivamente che la S.M.N. sia dovuta all'azione tossica prolungata del prodotto solfonamidico somministrato.

I risultati di questi primi 3 gruppi permettono di stabilire alcuni punti necessari a chiarire il meccanismo di produzione della S.M.N. Per un normale andamento della vita in animali che vivono fisiologicamente,

quindi, ad esempio, non in condizioni di sterilità (*), riveste, è vero, una fondamentale importanza l'assunzione dall'esterno di sostanze plastiche, energetiche, vitaminiche e dei sali minerali necessari, ma è ugualmente importante che venga mantenuto quel normale equilibrio nella composizione della flora intestinale caratteristica per ciascuna specie animale; dei danni provocati dagli spostamenti nella composizione della flora intestinale si sono in questi ultimi tempi moltiplicati gli esempi tanto che è sempre più valido il concetto di simbiosi tra flora intestinale e organismo ospite. Ora, la somministrazione della dieta sintetica A 1, completa delle vitamine conosciute, è perfettamente sufficiente a sostenere una vita normale nei ratti la cui flora intestinale conserva una composizione normalmente equilibrata, non lo è più quando l'equilibrio di questa viene alterato con l'aggiunta alla stessa dieta sintetica della solfonamidoguanidina come nel caso della dieta A 2. Invece l'alimentazione sempre con la stessa dieta addizionata di streptomina (dieta A 3) non provoca negli animali l'insorgenza della S.M.N.: le variazioni della flora intestinale indotte dalla persistente presenza di questo antibiotico non hanno evidentemente alcuna relazione con la produzione della malattia. D'altra parte l'aggiunta di solfonamidoguanidina ad una dieta naturale non ha come risultato la produzione della S.M.N.; questo fa pensare che nei prodotti naturali che compongono questa dieta sia contenuta una sostanza, o un gruppo di sostanze, capaci di prevenire la S.M.N., oppure che la composizione di essa offra alla flora intestinale un pabulum che le permetta di opporsi, in qualche modo, agli squilibri indotti in essa dalla presenza di solfonamidoguanidina. Di queste due possibilità la prima ci sembra però che sia da tenersi in maggiore considerazione.

Questa sostanza o gruppo di sostanze, non è evidentemente contenuta nella dieta sintetica: il fatto che l'alimentazione con la dieta A 1 non provoca negli animali la S.M.N. dimostra che la prevenzione di essa è legata ad un normale equilibrio della flora intestinale: l'alterazione di questo equilibrio indotta dalla solfonamidoguanidina, evidentemente, riduce o annulla l'apporto, da parte della flora intestinale, di quel « quid » capace di prevenire la S.M.N.

Partendo appunto da questo concetto, nel precedente lavoro abbiamo sperimentato l'attività preventiva delle feci di ratti ad alimentazione normale ottenendo risultati positivi. Rimaneva però sempre aperta la possibilità, in verità piuttosto remota, che l'attività preventiva delle feci fosse dovuta a residui della dieta standard naturale di McCOLLUM

(*) Ci si riferisce agli animali cosiddetti « germ free » i quali nascono e sono allevati in un ambiente perfettamente sterile, e ricevono una dieta anche essa sterile.

ancora presenti in esse. Per questo abbiamo istituito nel presente esperimento i gruppi IV, alimentato con dieta contenente feci di animali ad alimentazione normale, V, alimentato con la dieta A 8 contenente feci di ratti alimentati con una dieta sintetica contenente streptomina, VI, che riceveva la dieta A 9 contenente feci provenienti da animali alimentati con una dieta sintetica contenente solfonamidoguanidina. I risultati del gruppo IV sono perfettamente identici a quelli ottenuti nel precedente esperimento; le feci dei ratti alimentati con una dieta sintetica contenente streptomina (Dieta A 3) prevengono la S.M.N. nella quasi totalità dei casi; nella A 3, che è una dieta sintetica, non sono sicuramente presenti la sostanza, o il gruppo di sostanze contenute nella dieta naturale di McCOLLUM, e pertanto è escluso che le feci di animali alimentati con essa contengano, come residui alimentari, questa sostanza; la frazione attiva nel prevenire la S.M.N. non è quindi, in questo caso, di origine alimentare, ma piuttosto di origine batterica; la differenza di attività con le feci di animali ad alimentazione normale è probabilmente dovuta al fatto che la streptomina provoca pur sempre uno squilibrio nella composizione della flora intestinale. Sono numerosi del resto gli esempi di fattori dietetici essenziali presenti negli alimenti ma alla cui mancanza nella dieta può ovviare in parte, o del tutto, la sintesi che di essi avviene ad opera della flora normalmente presente nel tratto intestinale: è il caso ad es. dell'inosite, della biotina, dell'acido p-amino-benzoico, della vitamina K, dell'acido folico, della vitamina B₁₂ ecc. Queste deduzioni sono ulteriormente confermate dal gruppo VI del quale, salvo la solita minima percentuale di morti per malattie intercorrenti, tutti i ratti sono venuti a morte presentando la S.M.N.; in questo caso, ferma rimanendo l'impossibilità dell'apporto del fattore che la previene quale residuo alimentare, anche le feci non contengono questo fattore provenendo da animali la cui flora intestinale è profondamente alterata dalla solfonamidoguanidina e che sono tutti venuti a morte per S.M.N.

Finalmente i gruppi VII, VIII, IX sono stati istituiti, come abbiamo detto, allo scopo di ricercare la parte attiva dopo un grossolano frazionamento delle feci di animali ad alimentazione normale. Come risulta dalla tabella la frazione liposolubile di queste è assolutamente inattiva, mentre una certa attività è posseduta dalla frazione residua dopo estrazione con etere. Il trattamento con il calore distrugge in buona parte l'attività contro la S.M.N. delle feci di animali ad alimentazione normale.

Poichè l'attività completa non è stata ritrovata in nessuna delle due frazioni: estratto etero e residua dopo estrazione con etere, abbiamo eseguito un secondo esperimento, i cui risultati sono sintetizzati nella

tabella II, allo scopo di osservare se fosse possibile ricostituire l'attività completa riunendo le due frazioni.

I primi tre gruppi di controllo, XII, XIII e XIV, hanno confermato i risultati dell'esperimento precedente. Anche i gruppi XV e XVI hanno praticamente confermato quanto era stato osservato precedentemente; c'è solo da rimarcare che la frazione residua dopo estrazione con etere si è dimostrata, in questo caso, un poco più attiva, essendo del 25% la mortalità per S.M.N. degli animali appartenenti al gruppo alimentato con una dieta che la conteneva.

Nell'ultimo gruppo, che riceveva una dieta contenente sia l'estratto eterico che la frazione residua dopo estrazione con etere, la mortalità per S.M.N. è stata del 40%, praticamente uguale, quindi, a quella riscontrata per i gruppi di animali che ricevevano soltanto la parte residua dopo estrazione con etere; l'attività contro la S.M.N. posseduta dalle feci di animali ad alimentazione normale, non passa dunque nell'estratto eterico di esse o perchè non solubile in questo solvente, o perchè viene distrutta da esso. Questa seconda ipotesi sembra meno plausibile perchè una parte dell'attività rimane nel residuo dopo estrazione eterica; poichè però quest'ultima frazione non ha dimostrato di possedere tutta l'attività contro la S.M.N. posseduta dalle feci di animali normali, si potrebbe pensare ad una parziale distruzione di essa nel corso della estrazione con etere nell'apparecchio di Soxhlet. Sarebbe in questo caso verosimile che il trattamento con etere distrugga in parte la flora batterica presente nelle feci di animali normali, e resterebbe quindi il dubbio se l'attività posseduta da queste sia dovuta alla presenza in esse di una sostanza sempre di origine batterica, o non piuttosto alla flora batterica che, assunta dagli animali con le feci, potrebbe modificare le nuove condizioni microbiologiche create dalla solfonamidoguanidina a livello del tratto intestinale. Una riprova di questo secondo assunto potrebbe essere fornita dal fatto che le feci di animali ad alimentazione normale conservano ancora una certa attività anche dopo essere state sottoposte in stufa al calore secco a 100°; è noto infatti che questa temperatura non è sufficiente ad operare una sterilizzazione completa specialmente se si tratta di microrganismi contenuti in materiale proteico, e le forme batteriche resistenti potrebbero essere responsabili della attività ancora conservata dalle feci dopo questo trattamento.

Ulteriori passi avanti nella conoscenza del « quid » attivo contro la S.M.N., potranno essere mossi sia con lo studio della attività di culture di germi normalmente presenti nell'intestino di ratto somministrate per via orale mescolate alla dieta, sia indagando sulla attività di varie

frazioni ottenute per estrazione con vari solventi dai componenti della dieta naturale.

CONCLUSIONI — In sostanza da quanto sopra è stato detto è possibile dedurre i seguenti punti:

1) la S.M.N. è sempre riproducibile alimentando gli animali con le diete usate nei precedenti esperimenti.

2) La mancanza nella dieta di acido folico non ha alcuna relazione con la produzione della S.M.N.

3) Alimentando i ratti con la dieta naturale standard di McCOLLUM, non si osserva in nessun caso l'insorgenza della S.M.N. anche aggiungendo a questa dieta il 2% di solfonamidoguanidina.

4) L'aggiunta alla dieta di feci essiccate e polverizzate provenienti da animali ad alimentazione normale è attiva nel prevenire l'insorgenza della S.M.N.

5) Questa attività è posseduta anche, ma in minor grado, dalle feci di animali alimentati con una dieta sintetica addizionata di streptomina, mentre le feci di animali alimentati con la stessa dieta sintetica contenente solfonamidoguanidina sono inattive.

6) Una parte della attività rimane nel residuo dopo estrazione con etere delle feci di animali ad alimentazione normale, mentre l'estratto eterico non dimostra alcuna attività. Riunendo le due frazioni non si ricostituisce l'attività primitiva.

7) Il trattamento con il calore secco in stufa a 100° distrugge in gran parte ma non completamente, l'attività preventiva contro la S.M.N. presente nelle feci di animali ad alimentazione normale.

Questi risultati suggeriscono l'ipotesi che l'attività preventiva contro la S.M.N., posseduta dalla dieta naturale standard di McCOLLUM, sia dovuta alla presenza in essa di una sostanza, o di un gruppo di sostanze non identificate; l'attività preventiva delle feci sarebbe invece in relazione con i microrganismi costituenti la flora intestinale degli animali normali ed emessi da questi con le feci, o attraverso la loro azione diretta sulla composizione della flora intestinale degli animali trattati, o attraverso l'apporto di prodotti del loro metabolismo.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

(¹) TENTORI L., VIVALDI G.: Rend. Ist. Sup. di Sanità, XIII, 670, 1950.

(²) TENTORI L., VIVALDI G.: Rend. Ist. Sup. di Sanità, XIV, 246, 1951.