

45. Leonida RAVAIOLI. — Tentativo di differenzazione delle varie specie di *Brucella* con antibiotici. (*)

Riassunto. — L'A. saggia la sensibilità di 20 stipti di *Brucella melitensis*, di 16 *Br. abortus* e di 6 *Br. suis* verso quattro antibiotici (streptomycina, cloromicetina, aureomicina e terramicina). Dai risultati ottenuti conclude che la sensibilità media è massima per la specie *Br. suis*, minima per la *Br. melitensis*, intermedia per la *Br. abortus*. Tale risultato, convalidato da elaborazione statistica, può essere tenuto presente come metodo coadiuvante nella identificazione di specie delle Brucelle.

Inoltre la sensibilità delle fasi R è sempre stata maggiore a paragone delle S.

Tale metodo non può essere applicato a ceppi antibiotico-resistenti o antibiotico-dipendenti.

Résumé. — L'auteur fait l'essai de la sensibilité de 20 souches de *Brucella melitensis*, de 16 *Br. abortus* et de 6 *Br. Suis* contre quatre antibiotiques (streptomycine, chloromycetine, aureomycine et terramycine).

Selon les résultats obtenus, l'A. conclut que la sensibilité moyenne est maximum pour l'espèce *Br. Suis*, minimum pour la *Br. melitensis*, et entre les deux pour la *Br. abortus*. Ce résultat, confirmé par l'élaboration statistique, peut servir comme méthode auxiliaire pour l'identification des espèces de *Brucella*.

En outre la sensibilité des phases R a toujours été supérieure à celle des S.

Cette méthode n'est pas applicable aux souches résistantes ou dépendantes des antibiotiques.

Summary. — The Author tested the sensitiveness of 20 strains of *Brucella melintensis*, 16 of *Br. abortus* and 6 of *Br. suis* to four antibiotics (streptomycin, chloromycetin, aureomycin, and terramycin). The results obtained led him to the conclusion that the average sensitiveness is maximal for *Br. suis*, minimal for *Br. melintensis* and intermediary for *Br. abortus*. This result, confirmed by statistical elaboration, could be borne in mind as an auxiliary method when identifying the species of *Brucellae*.

(*) Il presente lavoro è stato oggetto di comunicazione al VI Convegno della Società Italiana delle Scienze Veterinarie - Sanremo, 24-28 settembre 1952.

Furthermore, the sensitiveness of R phases is invariably greater than that of S phases.

This method cannot be applied to antibiotic-resisting or antibiotic-dependent strains.

Zusammenfassung. — Der Verfasser hat die Empfindlichkeit von 20 Stämme von *Brucella melitensis*, 16 Stämme von *Br. abortus* und 6 Stämme von *Br. suis* gegenüber 4 Antibiotica (Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin und Terramycin) geprüft. Die Ergebnisse, die man erzielt hat, liessen den Autor darauf schliessen, dass durchschnittlich eine maximale Empfindlichkeit für *Br. suis*, eine minimale für *Br. melitensis* und eine zwischengradige für *Br. abortus* gegenüber besteht. Dieses Ergebnis, welches durch statistische Ausarbeitungen bestätigt wurde, könnte als eine Aushilfsmethode betrachtet werden, wenn es sich darum handelt, die Arten der *Brucellae* zu identifizieren.

Ausserdem ist die Empfindlichkeit der R-Phase standhaft grösser als die der S-Phase.

Diese Methode kann jedoch nicht bei Arten, die einem Antibioticum widerstandsfähig sind, oder bei solchen, die von einem Antibioticum abhängen, in Anwendung gebracht werden.

La differenziazione del genere *Brucella* nelle tre specie *melitensis*, *abortus*, *suis* viene eseguita con metodi ormai divenuti classici per la conferma avuta in centinaia di lavori e non è quindi il caso che mi soffermi a descriverli e a discuterli.

La scoperta e l'uso degli antibiotici nella terapia delle Brucellosi ha aperto la via a una lunga serie di lavori, atti a saggiare la sensibilità delle Brucelle in vitro, nei riguardi dei diversi antibiotici. Non sempre vi è stata concordanza costante tra attività in vitro e in vivo, tuttavia le prove in vitro costituiscono senz'altro una base di partenza indispensabile per le possibili applicazioni pratiche.

La penicillina è comunemente ritenuta incapace di inibire lo sviluppo delle Brucelle, sebbene DEL VECCHIO C. e AGENZIANO (1) abbiano osservato alcuni ceppi di *melitensis*, *abortus*, e *parabortus* venir inibiti nella crescita da dosi di 1-2 U.O.

BRUNNEL, HUCHINGS e DONHAM (2) hanno risultati analoghi nei riguardi di *Brucella suis*.

(1) DEL VECCHIO G. e AGENZIANO R. - Boll. Soc. It. Biol. Sper. 1946, 22, 14.

(2) BRUNNEL D. E., HUCHINGS L. M. e DONHAM G. R. - Am. J. Vet. Res. 1947, 8, 367.

L'attività della streptomina è invece assai notevole verso le Brucelle.

Secondo MURRAY, PAINE e FINLAND ⁽³⁾ e W. H. HALL e W. W. SPINK ⁽⁴⁾ sono sufficienti 0,5 γ/cm^3 per inibire completamente le crescite di *Brucella melitensis* e *Brucella suis* e da 0,5 γ/cm^3 a 3,75 γ/cm^3 per inibire la crescita di *Brucella abortus*.

R. NEGRI e L. RAVAIOLI ⁽⁵⁾ con 10 γ di streptomina su terreno solido ottengono aloni di inibizione pari a 28 mm per l'*abortus*, 24 mm per la *melitensis* e 28 per la *suis*, e con 1 γ aloni d'inibizione rispettivamente di 20-12-18 mm.

H. LACY e C. E. LANKFORD ⁽⁶⁾ studiando comparativamente l'attività dell'aureomicina e della streptomina sulle Brucelle notano che mentre quantitativi da 0,06 a 0,6 mg/cm³ della prima inibiscono la crescita su piastre, per ottenere uguali effetti con la seconda è necessario giungere a concentrazioni da 0,4 a 1 mg/cm³.

M. MARRAL ⁽⁷⁾ da ricerche comparative in vitro con un sulfamidico, un composto salicilico e la streptomina nota che la sensibilità delle tre specie di *Brucella* verso la streptomina è massima per *Brucella suis*, minima per *Brucella abortus*, intermedia per *Brucella melitensis*.

La cloromicetina è attiva a dosi di 2 mg/cm³ di terreno nei riguardi di *Brucella abortus* secondo J. ERLICH, R. Q. BARTZ, R. M. SMITH, D. JOSLIN e P. R. BURCKHOLDER ⁽⁸⁾. Per McLEAN e coll. ⁽⁹⁾ l'*abortus* viene inibito da 2,5 a 10 γ/cm^3 di cloromicetina, e la *melitensis* e la *suis* da 5 γ/cm^3 .

Secondo SMITH *Brucella abortus* viene inibita da 2 γ/cm^3 , *B. melitensis* e *B. suis* da 0,5 γ/cm^3 , secondo GOTTHIEB l'*abortus* da 0,1-0,5 γ/cm^3 e secondo i ricercatori della Parke e Davis citati da F. SCANGA e M. DE CARO ⁽¹⁰⁾ l'*abortus* è inibito da 10 γ/cm^3 e la *melitensis* e *suis* da 5 γ/cm^3 .

SCANGA e DE CARO ⁽¹⁰⁾ ritengono che non vi siano sensibili differenze tra le tre specie di Brucelle nella sensibilità verso tale antibiotico.

NEGRI e RAVAIOLI ⁽⁵⁾ notano invece che l'attività della cloromicetina nei riguardi delle tre specie di Brucelle è maggiore verso la *suis*, minore verso la *melitensis*, intermedia verso l'*abortus*.

⁽³⁾ New. Engl. J. Med. 1947, 136, 701.

⁽⁴⁾ Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 1947, 64, 403.

⁽⁵⁾ Rend. Ist. Sup. Sanità 1951, 14, 179.

⁽⁶⁾ Texas Rep. on Biol. a. Med. 1949, 7, 260.

⁽⁷⁾ Compt. R. des Sean. de la Soc. de Biol. 1947, 141, 942.

⁽⁸⁾ Science 1947, 106, 417.

⁽⁹⁾ Mc. LEAN J. W., SCHWAB J. L., HILLEGAS A. B., SCHLINGMAN A. S. - J. Clin. Inv. 1949, 28, 953.

⁽¹⁰⁾ Omnia Therapeutica 1950, 1, 145.

L'aureomicina è l'antibiotico sul quale si sono rivolte le maggiori attenzioni nella terapia delle brucellosi e quindi più numerose sono state le ricerche in vitro sulla sua attività verso le tre specie di Brucelle.

Per M. J. BRYER, E. B. SCHOENBACH, C. A. CHANDLER, L. A. BLISS e S. H. LONG ⁽¹¹⁾ le *Brucellae abortus* e *suis* sono sensibili a 0,75 γ/cm^3 e l'*abortus* a volte si rivela più resistente della *suis*. M. TERNI e A. TESI ⁽¹²⁾ provando la sensibilità all'aureomicina di 51 ceppi di *melitensis* e di 10 *abortus* li hanno ugualmente trovati tutti sensibili all'azione batteriostatica di 1 γ/cm^3 . A concentrazione di 0,5 γ/cm^3 hanno notato una maggiore resistenza dei ceppi di *abortus* (33%) a paragone dei *melitensis* (5,12%).

LACY e LANKFORD ⁽⁶⁾ constatano un'assai maggiore sensibilità verso l'aureomicina a paragone della streptomina e ottengono inibizione in brodo con concentrazioni di aureomicina da 0,03 a 0,2 mg/cm³.

SCANGA e DE CARO ⁽¹⁰⁾ notano una sensibilità assai più spiccata di *Brucella abortus* e *suis* verso l'aureomicina a paragone di *Brucella melitensis*, differenze che si mantengono costanti sia a concentrazioni diverse di antibiotico che a concentrazioni diverse di carica batterica. Analogamente NEGRI e RAVAIOLI ⁽⁵⁾ notano una sensibilità massima verso l'antibiotico da parte di *Brucella suis* minima da parte di *Brucella melitensis*, intermedia da parte di *Brucella abortus*.

La terramicina è, tra gli antibiotici che si sono affermati, l'ultima in ordine cronologico. Il suo amplissimo spettro antibiotico non ha indirizzato gli Autori a numerose e particolari ricerche nel campo delle Brucellosi, campo ancora pienamente dominato dall'aureomicina. Tuttavia negli « Annales of the New York Accademy of Science » ⁽¹³⁾ interamente dedicato alla terramicina un intero capitolo tratta esclusivamente dell'uso dell'antibiotico nella terapia delle Brucellosi. In esso è descritta l'attività in vitro della terramicina verso ceppi di *melitensis*, *abortus*, e *suis* a confronto con l'attività verso gli stessi ceppi dell'aureomicina e della cloromicetina. Tutti indistintamente i ceppi sono inibiti da concentrazione di mg 0,4/cm³ dell'antibiotico, mentre per l'aureomicina e la cloromicetina occorrono concentrazioni maggiori di 4-16 volte.

NEGRI e RAVAIOLI ⁽⁵⁾ hanno notato una sensibilità massima di *Brucella suis*, minore di *Brucella melitensis* e di *Brucella abortus* nei riguardi della terramicina. T. V. KNIGHT ⁽¹⁴⁾ saggia in vitro l'azione della

⁽¹¹⁾ J.A.M.A. 1948, 138, 117.

⁽¹²⁾ Boll. Ist. Sier. Mil. 1949, 28, 259.

⁽¹³⁾ Annales of the New York Acc. of Sc., 1950, 53, 332.

⁽¹⁴⁾ Ann. N. Y. Acad. Sci., 1950, 53, 332.

terramicina, dell'aureomicina e della cloromicetina su nove ceppi di *Brucella* di cui 7 *melitensis*, 1 *suis* e 1 *abortus*. Egli nota come l'attività della terramicina sia assai maggiore a paragone degli altri due antibiotici.

G. T. SICCA ⁽¹⁵⁾ in esperienze comparative tra terramicina, aureomicina, e cloranfenicolo condotte su 20 ceppi di *Brucella melitensis* rileva come l'attività della terramicina sia nettamente superiore a quella dell'aureomicina e cloranfenicolo.

DEL VECCHIO e la sua Scuola ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ hanno sperimentato con successo diversi derivati chinonici. Essi hanno osservato come il 2-metil-1,4-naftochinone e alcuni suoi derivati agiscano in vitro sulle Brucelle fino a diluizioni di 1 : 800.000 con variazione di sensibilità da ceppo a ceppo.

G. RITA ⁽¹⁸⁾ sperimentando il 2-metil-1,4-naftochinone su 42 ceppi di Brucelle ha messo in evidenza una minore sensibilità di *Brucella abortus*, *paraabortus* e *paramelitensis* nei confronti di *Brucella melitensis*. Il derivato più attivo è però il sale sodico del 2-metil-6-ossi-1,4-naftochinone, noto col nome di Antibrucellina. La sua attività in vitro ha variazioni notevolissime nei riguardi dei diversi ceppi di Brucelle ⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

Anche la Vitamina H₁ (acido paraminobenzoico) è stata sperimentata nella sua attività verso le Brucelle. Per C. M. COTTON e R. E. SWOPE ⁽²¹⁾ sono sufficienti 2 mg di sostanza per cm³ in terreno solido per inibire lo sviluppo di tutte e tre le specie di Brucelle. In brodo tryptose invece il sale sodico dell'acido paraminobenzoico è notevolmente più attivo verso la *Br. melitensis*, che non verso l'*abortus* e *suis*.

Assai recentemente N. B. McCALLOUGH e G. A. DEAL ⁽²²⁾ hanno studiato al Warburg gli effetti della sulfodiazina, della streptomicina, della cloromicetina, dell'aureomicina e della terramicina, su diversi substrati con ceppi di *Br. melitensis*, *abortus* e *suis*. Con solfodiazina non hanno notato alcuna variazione nel consumo di O₂, con streptomicina invece un iniziale incremento con successiva inibizione, con gli altri antibiotici notevole inibizione, massima con l'aureomicina. L'associazione aureomicina e streptomicina ha dimostrato effetto inibitore sinergico. Tuttavia gli Autori non hanno preso in considerazione la diversità di comportamento delle tre specie di Brucelle.

⁽¹⁵⁾ Nuovi Ann. d'Ig. e Microb. 1932, 3, 4

⁽¹⁶⁾ DEL VECCHIO G., DEL VECCHIO V., AGENZIANO R. - Boll. Soc. It. Biol. Sper. 1946, 22, 4.

⁽¹⁷⁾ DEL VECCHIO G., DEL VECCHIO V., NAPOLI A., CARATÙ G., BIONDI G. - Ig. e Sanità Pubbl. 1949, 5, 407.

⁽¹⁸⁾ Ig. e Sanità Pubbl. 1949, 5, 5.

⁽¹⁹⁾ NAPOLI A. - Ig. e Sanità Pubbl. 1948, 4, 214.

⁽²⁰⁾ PANEBIANCO F., NAPOLI A., D'ANIELLO L. - Ig. e Sanità Pubbl. 1948, 4, 230.

⁽²¹⁾ Amer. J. of Vet. Res. 1948, 9, 164.

⁽²²⁾ The J. of Inf. Dis. 1932, 90, 196.

R. FAUSTINI e V. ZAVAGLIO ⁽²³⁾ hanno saggiato in vitro la Neazina, la Vit. H₁, il P.A.S., la Vit. K, il 4-4'-diamino-difenilsolfene, la penicillina, la streptomina, l'aureomicina, neomicina e il cloramfenicolo soli e associati su due ceppi di *Brucella*, un *melitensis* e un *abortus*. Essi hanno notato in *Br. abortus* una resistenza lievemente maggiore all'azione dei farmaci a paragone di *Br. melitensis*.

Questa breve e incompleta rassegna bibliografica è tuttavia sufficiente a mettere in evidenza, pur tenendo conto della diversità delle tecniche usate, come i risultati della attività in vitro, di diversi antibiotici nei riguardi delle tre specie di Brucelle, siano tutt'altro che concordanti. Inoltre tutti i lavori su questo argomento sono stati eseguiti con finalità eminentemente cliniche, sia nel senso di determinare lo spettro antibiotico di una certa sostanza, sia nel rilevare la particolare sensibilità dei ceppi verso la sostanza stessa.

Non mi consta che alcuno finora abbia preso in considerazione la diversa sensibilità delle tre specie di Brucelle verso gli antibiotici a scopo di differenziarle, come invece è stato fatto col P.A.S. per differenziare i micobatteri ⁽²⁴⁾.

PARTE SPERIMENTALE

Descrizione dei ceppi. — I ceppi di Brucelle che ho usato sono in parte quelli della collezione dell'Istituto, in parte mi sono stati gentilmente concessi da altri Istituti e Laboratori. Condizione essenziale era quella di lavorare con ceppi sicuramente classificati; perciò tutti i ceppi indistintamente sono stati riclassificati tenendo presente: le condizioni di I isolamento in quelli che ne erano forniti, la produzione dell'H₂S su terreno al fegato, il comportamento su terreno di Petraghani, la batteriostasi di Huddleson. Per quest'ultima prova ho usato fucsina, tionina, e agar tryptose della casa Difco. Inoltre tutti i ceppi sono stati saggiati con la prova alla tripaflavina secondo Alessandrini e Sabatucci per la identificazione della fase. In tal maniera sono stati classificati 20 stipiti di *Brucella melitensis*, in cui 15 in fase S, 4 in fase R e una in fase S-R; 16 di *Brucella abortus*, di cui 15 in fase S e 1 in fase R, 6 di *Brucella suis*, di cui 4 in fase S e 2 in fase R, come è riportato nella tabella 1.

⁽²³⁾ Arch. Vet. Italiano 1932, 3, 33.

⁽²⁴⁾ CATTANEO C., MORELLINI M., ORTALI V., PENSO G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 1950, 13, 4.

TABELLA I

Ceppo	Fase	I isolamento	H ₂ S	Petra- gnani	Batterio- stasi sec. Huddleson	
					Tionina	Fucsina
Br. melitensis SFr2	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis SFr3	R	?	±	+	+	+
Br. melitensis SFr4	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis SFr5	R	?	+	+	+	+
Br. melitensis SFr6	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis Sieroterapico	R	?	—	+	+	+
Br. melitensis Ascoli	S	aerobiosi	—	+	+	+
Br. melitensis Termini 2	S	aerobiosi	—	+	+	+
Br. melitensis Termini 6	S	aerobiosi	—	+	+	+
Br. melitensis Gangi I	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis Termini 4	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis Marineo	S	aerobiosi	—	+	+	+
Br. melitensis Pecora Partanna	S-R	?	—	+	+	+
Br. melitensis Austria Schuller	S	?	+	+	+	+
Br. melitensis Austria Pfera	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis SFr40	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis Allemandi	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis Bonan	R	?	—	+	+	+
Br. melitensis SR5	S	?	—	+	+	+
Br. melitensis Istisan	S	?	—	+	+	+
Br. abortus MK64	S	?	+	—	—	+
Br. abortus SZR	S	?	±	—	—	+
Br. abortus Bang	S	?	+	—	—	+
Br. abortus KR16	S	?	+	—	—	+
Br. abortus Padera	S	?	±	—	—	+
Br. abortus Bonetti	S	semianaerobiosi	+	—	—	+
Br. abortus Rivoli	S	?	±	—	—	+
Br. abortus Cherasco	S	?	+	—	±	+
Br. abortus Roma	S	semianaerobiosi	+	--	±	+
Br. abortus Austria T614	S	?	—	—	±	+
Br. abortus Austria 619	S	?	—	—	—	+
Br. abortus Torello Ustica	S	semianaerobiosi	+	—	±	+
Br. abortus Arcozei	S	?	+	—	±	+
Br. abortus Kobeck	S	?	±	±	—	+
Br. abortus Ubertini	R	?	+	--	—	+
Br. abortus Giaveno	S	?	+	—	—	+
Br. suis Austria 60	S	?	—	—	+	—
Br. suis Austria 20	S	?	—	±	+	—
Br. suis Suis	R	?	±	±	+	—
Br. suis Austria 572	S	?	—	±	+	—
Br. suis Austria 5480	S	?	—	—	±	—
Br. suis Suis III	R	?	+	--	+	—

Nel corso delle esperienze due ceppi di *Brucella suis* in fase S si sono dissociate in senso S-R (vedi tabella 2).

Le Brucelle sono state conservate con trapianti mensili in agar tryptose Difco.

Tecnica usata. — Gli antibiotici presi in considerazione sono stati quattro: solfato di diidrostreptomina, cloroamfenicolo sintetico (cloromicetina), cloridrato di aureomicina, cloridrato di terramicina. Ho preparato diluizioni contenenti 1000 γ/cm^3 e 100 γ/cm^3 in acqua bidistillata sterile dei quattro antibiotici.

Per la determinazione dell'attività degli antibiotici ho usato piastre di agar-germi (metodo dei cilindri) ⁽²⁵⁾ su cui venivano depositati dei microcilindri di porcellana, capaci di assorbire per capillarità cm^3 0,01 di soluzione antibiotica. Pertanto, le quantità di antibiotico contenute realmente nei microcilindri corrispondevano a 10 γ e a 1 γ .

Le piastre di agar-germi sono state così preparate: il ceppo di *Brucella* veniva insemato in un tubo di brodo; dopo 24 h di termostato a 37° C. 1 cm^3 di tale brodo veniva versato su una piastra insieme a 25 cm^3 di agar tryptose, sciolto a bagno maria. Sulle piastre solidificate venivano posti i microcilindri e quindi incubate a 37° C per 24 h. Dopo tale periodo si eseguiva la lettura degli aloni d'inibizione in millimetri con un compasso.

Per ogni ceppo batterico e per ogni concentrazione di antibiotico sono state eseguite 4 letture. Nella tabella 2 sono state riportate le medie delle 4 letture per ogni ceppo e per ciascuna delle concentrazioni di antibiotico.

Risultati. — Nella tabella 3 sono riportate le medie corrispondenti alle *Br. melitensis*, *abortus* e *suis* in toto e in fase S ed R, sia per le concentrazioni di 10 γ che di 1 γ dei diversi antibiotici.

Per accertare statisticamente la fiducia da accordare alle medie ottenute, ho calcolato per ognuna di esse lo scostamento quadratico medio (σ) e l'errore probabile (E.P.). Per il calcolo del σ ho usato la formula dello STUDENT ⁽²⁶⁾:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$$

in cui: Σd^2 = somma degli scarti al quadrato

n = numero delle osservazioni.

⁽²⁵⁾ FLOREY H. W. e coll. - The Lancet 1941, 241, 177.

⁽²⁶⁾ DAVOLI R.: Tossine, anatossine, antitossine - Vallecchi, Firenze 1946, 106..

Ceppo	Fase	Streptomicina medie di 4 letture		Cloromicetina medie di 4 letture		Aureomicina medie di 4 letture		Terramicina medie di 4 letture	
		10 γ	1 γ	10 γ	1 γ	10 γ	1 γ	10 γ	1 γ
Br. melitensis SFr2	S	20,00	11,00	22,75	0,00	21,50	12,00	26,25	15,50
Br. melitensis SFr3	R	27,00	15,50	22,25	0,00	28,25	20,00	36,25	23,50
Br. melitensis SFr4	S	20,00	10,75	18,00	0,00	22,00	12,00	29,00	17,50
Br. melitensis SFr5	R	27,75	18,75	33,00	7,75	29,50	22,75	36,25	26,75
Br. melitensis SFr6	S	22,00	12,25	26,00	10,00	24,50	16,50	27,25	18,50
Br. melitensis Sieroterapico	R	25,25	15,50	21,50	6,50	21,00	14,00	25,00	12,75
Br. melitensis Ascoli	S	27,25	16,75	31,25	8,00	28,00	18,00	34,00	22,25
Br. melitensis Termini 2	S	20,25	10,25	22,25	1,50	22,00	13,50	26,50	15,00
Br. melitensis Termini 6	S	20,75	11,50	21,50	0,00	21,75	12,25	27,50	15,00
Br. melitensis Gangi I	S	22,75	11,00	21,75	0,00	22,25	13,00	26,75	15,50
Br. melitensis Termini 1	S	21,75	12,75	22,50	0,00	22,25	13,25	26,50	14,25
Br. melitensis Marineo	S	22,75	15,25	19,75	0,00	21,75	13,00	26,50	14,50
Br. melitensis Pecora Partanna	S-R	24,25	14,00	21,00	0,00	23,75	15,25	27,50	16,00
Br. melitensis Austria Schuller	S	27,50	16,75	27,00	3,00	27,50	18,00	29,50	18,00
Br. melitensis Austria Pfera	S	30,50	17,75	27,50	4,25	24,00	14,25	30,75	20,25
Br. melitensis SFr40	S	23,50	15,00	29,25	9,25	18,00	11,50	25,00	15,75
Br. melitensis Allemandi	S	25,50	16,75	21,50	0,00	21,00	11,00	23,00	10,50
Br. melitensis Bonan	R	27,75	14,50	25,50	0,00	36,25	26,75	31,50	18,00
Br. melitensis SR5	S	20,50	11,75	17,50	0,00	21,00	11,75	25,00	13,50
Br. melitensis ISTISAN	S	23,50	13,50	23,25	0,00	23,50	14,50	24,50	11,75
Br. abortus MK64	S	31,50	29,75	27,50	13,00	30,75	20,00	31,00	19,75
Br. abortus SZR	S	26,75	19,50	25,50	0,00	28,50	19,00	28,75	19,00
Br. abortus Bang	S	31,50	20,75	22,75	0,00	26,00	17,25	25,75	15,75
Br. abortus KR16	S	29,25	20,25	28,50	12,50	30,50	19,50	25,25	15,50
Br. abortus Padera	S	30,00	19,50	27,50	8,00	28,25	20,75	26,75	17,25
Br. abortus Bonetti	S	23,50	18,25	23,75	5,50	26,50	17,00	23,75	14,50
Br. abortus Rivoli	S	32,75	21,50	28,75	14,50	24,75	16,00	27,50	17,50
Br. abortus Cherasco	S	26,75	16,25	25,00	7,75	29,50	19,25	26,50	17,50
Br. abortus Roma	S	27,75	16,50	28,75	14,50	26,75	18,75	25,25	17,00
Br. abortus Austria T614	S	29,75	19,50	27,75	2,25	35,00	24,00	27,25	19,50
Br. abortus Austria 619	S	29,25	18,75	29,25	11,25	31,50	22,50	31,75	19,75
Br. abortus Torello Ustica	S	26,25	16,00	30,00	7,50	33,25	24,00	29,00	19,50
Br. abortus Arcozei	S	37,75	23,50	28,50	12,00	31,25	23,75	29,50	18,75
Br. abortus Kobeck	S	29,50	16,50	29,25	10,50	29,75	19,75	29,50	21,25
Br. abortus Ubertini	R	33,00	22,00	29,25	9,75	28,75	17,00	31,00	22,75
Br. abortus Giaveno	S	31,50	19,00	19,00	0,00	29,75	19,00	26,75	17,50
Br. suis Austria 60	S (1)	47,75	29,25	46,50	28,00	53,25	39,75	50,25	37,50
Br. suis Austria 20	S	31,00	22,00	28,00	11,00	35,50	23,00	29,50	19,25
Br. suis Suis	R	46,25	34,25	30,75	11,00	38,75	29,00	33,75	24,00
Br. suis Austria 572	S	36,00	23,50	28,75	12,50	35,50	24,00	28,50	19,25
Br. suis Austria 5480	S (1)	44,00	33,25	40,50	19,75	52,00	39,75	46,50	37,50
Br. suis Suis III	R	38,25	25,25	30,25	10,25	32,75	22,75	41,00	24,50

(1) Nel corso dell'esperienza (aureomicina e terramicina) la fase si è dissociata in S-R.

STREPTOMICINA

<i>Specie</i>	<i>Media</i> 10 γ	σ	<i>EP</i>	<i>Media</i> 1 γ	σ	<i>EP</i>
Br. melitensis (in toto)	24.02	± 3.04	± 0.46	14.06	± 2.55	± 0.38
Br. abortus (in toto)	29.79	± 3.34	± 0.56	19.22	± 2.17	± 0.36
Br. suis (in toto)	40.54	± 6.48	± 1.78	27.91	± 5.14	± 1.41
Br. melitensis (in fase S)	23.23	± 3.16	± 0.55	13.53	± 2.60	± 0.45
Br. melitensis (in fase R)	26.40	± 1.58	± 0.47	15.65	± 1.85	± 0.56
Br. abortus (in fase S)	28.91	± 3.41	± 0.59	19.03	± 2.10	± 0.36
Br. abortus (in fase R)	—	—	—	—	—	—
Br. suis (in fase S)	39.68	± 7.59	± 2.55	27.00	± 4.34	± 1.46
Br. suis (in fase R)	42.25	± 5.65	± 2.69	29.75	± 6.36	± 3.03

CLOROMICETINA

<i>Specie</i>	<i>Media</i> 10 γ	σ	<i>EP</i>	<i>Media</i> 1 γ	σ	<i>EP</i>
Br. melitensis (in toto)	23.74	± 4.15	± 0.63	2.51	± 3.07	± 0.46
Br. abortus (in toto)	26.93	± 2.99	± 0.50	8.06	± 3.67	± 0.62
Br. suis (in toto)	34.12	± 7.57	± 2.08	15.41	± 7.09	± 1.94
Br. melitensis (in fase S)	23.38	± 3.98	± 0.69	2.40	± 3.17	± 0.55
Br. melitensis (in fase R)	24.65	± 5.18	± 1.56	2.85	± 3.05	± 0.92
Br. abortus (in fase S)	26.78	± 3.03	± 0.53	7.95	± 3.82	± 0.67
Br. abortus (in fase R)	—	—	—	—	—	—
Br. suis (in fase S)	35.93	± 9.07	± 3.05	17.81	± 7.79	± 2.62
Br. suis (in fase R)	30.50	± 0.34	± 0.16	10.62	± 0.51	± 0.24

AUREOMICINA

<i>Specie</i>	<i>Media</i> 10 γ	σ	<i>EP</i>	<i>Media</i> 1 γ	σ	<i>EP</i>
Br. melitensis (in toto)	23.98	± 3.03	± 0.46	15.16	± 4.12	± 0.62
Br. abortus (in toto)	29.42	± 2.53	± 0.42	19.84	± 2.50	± 0.42
Br. suis (in toto)	41.29	± 7.28	± 2.00	29.70	± 8.10	± 2.23
Br. melitensis (in fase S)	22.73	± 2.52	± 1.69	13.63	± 2.24	± 0.39
Br. melitensis (in fase R)	27.75	± 5.85	± 1.76	19.75	± 5.28	± 1.59
Br. abortus (in fase S)	29.46	± 2.78	± 0.48	20.03	± 2.53	± 0.44
Br. abortus (in fase R)	—	—	—	—	—	—
Br. suis (in fase S)	35.50	—	—	23.50	± 0.70	± 0.33
Br. suis (in fase R)	44.18	± 10.06	± 3.39	32.81	± 8.41	± 2.83

TERRAMICINA

<i>Specie</i>	<i>Media</i> 10 γ	σ	<i>EP</i>	<i>Media</i> 1 γ	σ	<i>EP</i>
Br. melitensis (in toto)	28.22	± 3.78	± 0.57	16.73	± 4.02	± 0.61
Br. abortus (in toto)	27.82	± 2.21	± 0.37	18.29	± 2.15	± 0.36
Br. suis (in toto)	38.25	± 9.07	± 2.49	27.00	± 8.43	± 2.32
Br. melitensis (in fase S)	27.20	± 2.75	± 0.47	15.85	± 3.06	± 0.53
Br. melitensis (in fase R)	31.30	± 5.07	± 1.53	19.40	± 5.67	± 1.71
Br. abortus (in fase S)	27.61	± 2.24	± 0.39	18.00	± 1.86	± 0.32
Br. abortus (in fase R)	—	—	—	—	—	—
Br. suis (in fase S)	29.00	± 0.70	± 0.33	19.25	—	—
Br. suis (in fase R)	42.87	± 7.17	± 2.41	30.87	± 7.65	± 2.57

I valori del σ sono riportati nella tabella 3 accanto ai valori delle medie. L'errore probabile (E.P.) è quell'errore o scarto che ha 50 probabilità su 100 di prodursi ed è una frazione costante dello scarto quadratico medio.

Stabilito il valore del σ , si calcola facilmente lo E.P., applicando la formula

$$\text{E.P.} = 0,67449 \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

La conoscenza dell'E.P. permette di determinare i limiti di esattezza di una media, cioè è possibile determinare se una media è statisticamente significativa. In altre parole si ritiene statisticamente significativa una media che superi il triplo del suo E.P., poichè un errore maggiore di 3 E.P. ha soltanto 5 probabilità % di prodursi. I valori dell'E.P. sono riportati nella tabella 3, accanto a quelli del σ .

Dall'esame della tabella 3 è facile rilevare come il triplo E.P. di ogni media sia assai lontano dal superare la media stessa. E' possibile quindi dedurne come tali medie siano significative.

Confronto tra le medie. — Il confronto tra le medie, sia dei valori di 10 γ che di 1 γ permette le seguenti deduzioni:

L'attività della streptomicina è massima verso *Br. suis*, minore verso *l'abortus*, ancora più bassa per la *melitensis*. Per esaminare il valore che occorre accordare ai confronti tra le varie medie, ci si può valere del calcolo del « t » di Fischer. Essendo tale metodo piuttosto indaginoso ho preferito usare il metodo indicato da A. NICEFORO ⁽²⁷⁾. Il calcolo dell'errore probabile tra la differenza delle medie (Ed) è stato quindi ottenuto applicando la seguente formula:

$$E d = \sqrt{E P_1^2 + E P_2^2}$$

in cui EP^2 = errore probabile della media al quadrato.

Con tale metodo la differenza tra le medie poste a confronto è da considerarsi significativa quando supera di almeno tre volte l'errore probabile. Nella tabella 4 ho messo a confronto le medie, ne ho calcolato la differenza e l'Ed. Da essa risulta come la differenza tra le medie in toto sia dei valori di 10 che di 1 γ siano da considerarsi statisticamente significative. Per ciò che riguarda le fasi S a confronto di quelle R, mi è stato possibile confermare anche statisticamente come

⁽²⁷⁾ Il metodo statistico. Principato - Messina 600, 603.

STREPTOMICINA

<i>Specie</i>	<i>Medie</i> 10 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>	<i>Medie</i> 1 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>
Br. melitensis (in toto)	24,02	5,77	0,72	14,06	5,16	0,51
Br. abortus (in toto)	29,79			19,22		
Br. melitensis (in toto)	24,02	16,52	1,84	14,06	13,85	1,46
Br. suis (in toto)	40,54			27,91		
Br. abortus (in toto)	29,79	10,75	1,86	19,22	8,49	1,44
Br. suis (in toto)	40,54			27,91		
Br. melitensis (in fase S)	23,23	3,17	0,72	13,53	2,12	0,72
Br. melitensis (in fase R)	26,40			15,65		

CLOROMICETINA

<i>Specie</i>	<i>Medie</i> 10 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>	<i>Medie</i> 1 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>
Br. melitensis (in toto)	23,74	3,19	0,80	2,51	5,55	0,76
Br. abortus (in toto)	26,93			8,06		
Br. melitensis (in toto)	23,74	10,38	2,17	2,51	12,90	1,99
Br. suis (in toto)	34,12			15,41		
Br. abortus (in toto)	26,93	7,19	2,14	8,06	7,35	2,03
Br. suis (in toto)	34,12			15,41		
Br. melitensis (in fase S)	23,38	1,27	1,70	2,40	0,45	1,07
Br. melitensis (in fase R)	24,65			2,85		

AUREOMICINA

<i>Specie</i>	<i>Medie</i> 10 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>	<i>Medie</i> 1 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>
Br. melitensis (in toto)	23,98	5,44	0,62	15,16	4,68	0,74
Br. abortus (in toto)	29,42			19,84		
Br. melitensis (in toto)	23,98	17,31	2,05	15,16	14,54	2,31
Br. suis (in toto)	41,29			29,70		
Br. abortus (in toto)	29,42	11,87	2,04	19,84	9,86	2,27
Br. suis (in toto)	41,29			29,70		
Br. melitensis (in fase S)	22,73	5,02	2,44	13,63	6,12	1,63
Br. melitensis (in fase R)	27,75			19,75		

TERRAMICINA

<i>Specie</i>	<i>Medie</i> 10 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>	<i>Medie</i> 1 γ	<i>Difer. tra</i> <i>le medie</i>	<i>Ed.</i>
Br. melitensis (in toto)	28,22	0,40	0,67	16,73	1,56	0,70
Br. abortus (in toto)	27,82			18,29		
Br. melitensis (in toto)	28,22	10,03	2,55	16,73	10,27	2,40
Br. suis (in toto)	38,25			27,00		
Br. abortus (in toto)	27,82	10,43	2,51	18,29	8,71	2,34
Br. suis (in toto)	38,25			27,00		
Br. melitensis (in fase S)	27,20	4,10	1,60	15,85	3,55	1,79
Br. melitensis (in fase R)	31,30			19,40		

le fasi R siano assai più sensibili delle S solo nei riguardi di *Br. melitensis*. Il numero delle osservazioni con *Br. abortus* e *suis* è stato troppo esiguo per poter su di esse basare calcoli statistici di qualche valore. Tale calcolo anche quando è stato eseguito a solo scopo orientativo, mi ha dato quasi sempre risultati non probativi, sia nei riguardi della streptomicina che degli altri antibiotici usati.

Con la cloromicetina ho avuto gli stessi risultati che con la streptomicina nei riguardi delle specie *melitensis*, *abortus* e *suis* in toto sia

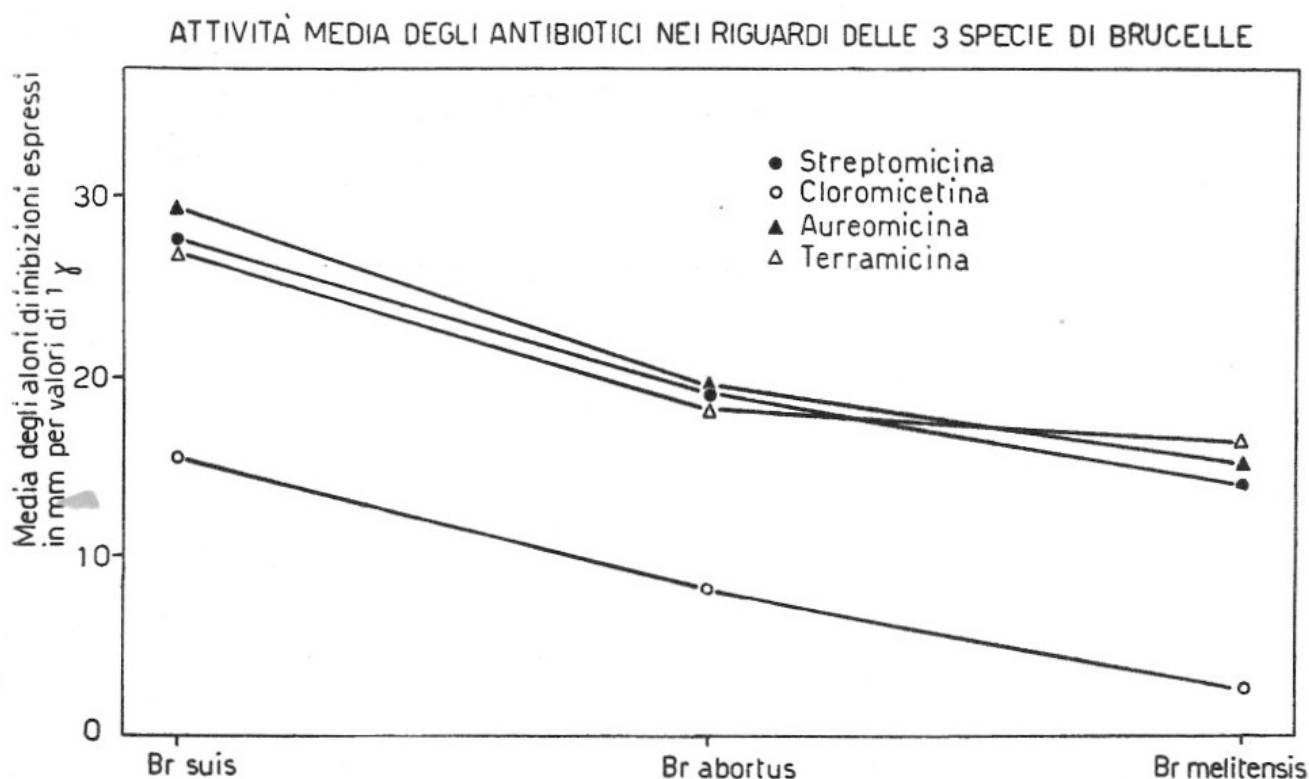


Fig. 1

con valori di 10, che di 1 γ . La differenza invece tra la fase S ed R della specie *melitensis*, sempre nel senso di assai maggior sensibilità della fase R a paragone della S, è risultata non significativa, sia per i valori di 10 che di 1 γ .

Con l'aureomicina le differenze tra *Br. melitensis*, *abortus* e *suis* in toto sono risultate pressochè dello stesso valore di quello dei due precedenti antibiotici.

La fase R di *Br. melitensis* sia per i valori di 10 γ che di 1 γ è risultata notevolmente più sensibile di quella S. Tale dato però non è risultato significativo per i valori di 10 γ .

La terramicina, contrariamente a quanto si era verificato con gli altri tre antibiotici, si è dimostrata più attiva verso la *melitensis* a paragone dell'*abortus* per i valori di 10 γ . Il contrario è avvenuto per

ATTIVITÀ MEDIA DEGLI ANTIBIOTICI NEI RIGUARDI DELLE 3 SPECIE DI BRUCELLE

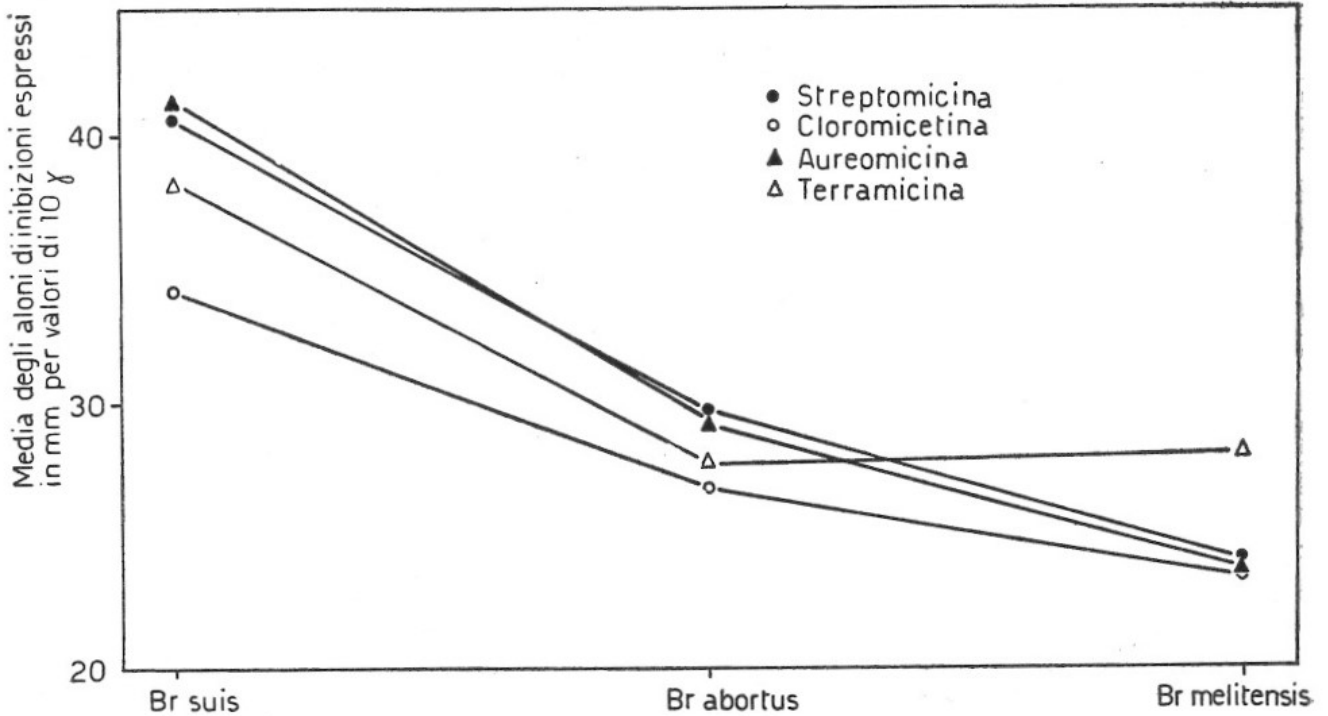


Fig. 2

i valori di 1 γ . Questi dati non sono risultati statisticamente significativi. I confronti invece tra le medie di *Br. melitensis* e *suis* e di *Br. abortus* e *suis*, sia per i valori di 10 che di 1 γ , hanno dato risultati simili a quelli avuti con gli altri tre antibiotici.

Anche per essi l'elaborazione statistica ha dato risultati probativi.

Anche qui le fasi R di *Br. melitensis* sono risultate assai più sensibili delle S, ma per entrambi i valori di 10 γ e di 1 γ l'elaborazione statistica ha dato risultati da non considerarsi probativi.

CONCLUSIONI

Da ciò che risulta dalle tabelle annesse e da quanto è stato brevemente esposto ritengo si possa concludere quanto segue:

1) le tre specie di Brucelle hanno una sensibilità media diversa rispetto agli antibiotici usati.

2) la sensibilità è di ordine crescente per tutti gli antibiotici considerati, a partire da *Br. melitensis* che è la meno sensibile, fino a giungere a *Br. suis*, che è la più sensibile. La *Br. abortus* ha una sensibilità intermedia tra le due. Questi risultati sono stati convalidati da elaborazione statistica che, sebbene si basi su di uno scarso numero di osservazioni e vada quindi presa con cautela, ha tuttavia permesso,

a mio avviso, di poter considerare i risultati con più fiducia. Unica eccezione a tale regola è stata presentata dall'attività della terramicina che ha dimostrato per i valori di 10 γ una maggiore attività nei riguardi della specie *melitensis* a confronto dell'*abortus*.

Questo risultato viene però invalidato dall'elaborazione statistica, che in questo caso è stata non probativa.

3) la sensibilità delle fasi R è sempre stata maggiore a paragone delle fasi S. Tuttavia l'elaborazione statistica, quasi sempre negativa, fa considerare tali risultati con molta cautela.

4) le differenze di sensibilità delle 3 specie non sono tali da permettere di classificare un ceppo in esame basandosi solo e unicamente su questo metodo.

Tutt'al più questo può essere un metodo coadiuvante a quelli universalmente usati per distinguere le 3 specie.

5) tale metodo non può naturalmente venire applicato a ceppi antibiotico-resistenti o antibiotico-dipendenti.

Ringrazio il dott. G. Russo di questo Istituto per i consigli datimi nella elaborazione statistica dei risultati.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.
