

79. Brenno BABUDIERI. — L'associazione streptomicina-sulfone.
I. Ricerche in vitro.

Riassunto. — L'A. in base a ricerche sperimentali condotte su numerosi ceppi batterici, e fra questi anche su alcuni germi acido-resistenti, nega che si possa dimostrare in vitro, usando terreni solidi, un'azione sinergica o additiva tra sulfone e streptomicina. Si manifesta anzi, in tale associazione, una diminuzione d'attività dei due componenti.

I benefici risultati ottenuti in vivo e anche in vitro, ma solo in terreni liquidi, da tale associazione, sono molto probabilmente riferibili ad una azione dei sulfoni sugli individui batterici relativamente streptomicino-resistenti, e quindi ad un'azione ritardante l'insorgenza della streptomicino-resistenza. Si potrebbe perciò parlare forse di un « sinergismo biologico ».

Tale sinergismo, per quanto probabile, non si può ancora ritenere come sicuramente dimostrato nell'infezione tubercolare.

Résumé. — D'après les résultats de recherches expérimentales effectuées sur de nombreuses souches bactériennes, aussi sur quelques germes acido-résistant, l'A. nie la possibilité de démontrer in vitro, en utilisant des milieux solides de culture, une action synergique ou additive entre sulfone et streptomycine. On voit plutôt se manifester dans leur association une diminution d'activité des deux composants.

Les résultats favorables qu'on a pu obtenir de cette association in vivo, et aussi in vitro, mais alors seulement dans des milieux liquides, sont probablement rapportables à une action des sulfones sur les bactéries individuelles relativement résistantes à la streptomycine, et par conséquence à une action retardant l'apparition de la streptomycine-résistance.

Il serait donc possible, éventuellement, parler d'une « synergie biologique ».

Cette synergie, tout probable qu'elle est, ne peut encore être considérée comme sûrement démontrée dans l'infection tuberculeuse.

Summary. — On the basis of experimental researches conducted on a number of bacterial strains, among them also on some acid-fast germs, the A. denies the possibility of demonstrating in vitro, using solid culture medius, a synergistic or additive action between sulphone and

streptomycin. One can observe, namely a decrease of activity of the two components.

The results obtained from this association, in vivo and also in vitro, but good only in liquid mediums, are most likely to be attributed to an action of the sulphones on such bacterial individuals as are relatively streptomycin-resistant, and therefore, to an action retarding the appearance of the streptomycin-resistance. One may perhaps speak of a «biological synergisms».

Such a synergism, however probable, cannot as yet be considered as surely demonstrated in tubercular infection.

Zusammenfassung. — Auf Grund experimenteller Untersuchungen auf zahlreiche Bakterienstämme und unter anderen auch auf einige säurefeste Keime, glaubt der Verfasser nicht, dass man bei Anwendung fester Nährböden eine synergische oder additive Wirkung zwischen Sulfon und Streptomycin in vitro beweisen kann. Bei dieser Assoziation, macht sich sogar eine Verminderung der Aktivität der beiden Komponenten bemerkbar.

Die heilsamen Ergebnisse, die durch diese Assoziation, in vivo sowie auch in vitro, auf flüssigen Nährböden erzielt wurden, sind sehr wahrscheinlich auf die Wirkung der Sulfone auf relativ streptomycinresistente Bakterien zurückzuführen und somit auf eine Wirkung, die das Hervortreten der Streptomycinresistenz verzögert. Man könnte dies somit als «biologische Synergie» bezeichnen.

Diese Synergie kann aber, obwohl wahrscheinlich, in der tuberkulösen Infektion nicht als sicher bewiesen gelten.

Fin da quando ricerche sperimentali ed esperienza clinica hanno rivelato l'efficacia dei sulfoni e della streptomicina rispetto al bacillo di Koch, si è pensato di associare i due farmaci per ottenere risultati migliori. Questa associazione, impiegata dapprima nella terapia della tubercolosi, fu successivamente estesa ad altre malattie, là dove la streptomicina da sola non era in grado di dare risultati netti e definitivi.

I risultati pratici ottenuti da questa associazione, furono per lo più soddisfacenti; alcune volte, come nella terapia delle Brucellosi, addirittura brillanti.

Le prove sperimentali condotte sull'animale tubercolotico, hanno in genere confermato questi risultati.

Così nel 1946 Smith, Mc Closky ed Emmart ⁽¹⁾, hanno reso noto che, mentre nel ratto tubercolotico il sulfone da solo non dà risultati favorevoli, e la streptomicina dà solo un miglioramento, l'associazione dei due medicamenti è invece in grado di sterilizzare in maniera definitiva il 41,6% degli animali. Risultati simili sono stati ottenuti nel 1947 da Smith, Mc Closky e Jackson ⁽²⁻³⁾ nella cavia, in cui l'associazione dei due medicamenti ha dato risultati notevolmente superiori a quelli corrispondenti alla semplice somministrazione degli effetti della streptomicina e del sulfone usati isolatamente. Anche Callomon, Kolmer, Rule e Paul ⁽⁴⁾, Brownlee e Kennedy ⁽⁵⁾, Bazzicalupo, Contieri, De Franciscis, De Michele, Gangemi ⁽⁶⁾ hanno confermato questi reperti.

Risultati buoni, ma non altrettanto dimostrativi, sono stati ottenuti da Wayson e Mc Mahon ⁽⁷⁾ nei topi infettati con il bacillo pestoso.

(¹) M. I. SMITH, W. T. MC CLOSKEY e E. W. EMMART, Influence of Streptomycin and Promin on proliferation of tubercle bacilli in the tissues of albino rat., Proc. Soc. exp. Biol. et Med., 62, 157 (1946).

(²) M. I. SMITH, W. T. MC CLOSKEY e E. L. JACKSON, Studies in chemotherapy of tuberculosis. VIII. The comparative action of four sulfones in experimental tuberculosis in guinea pigs and the combined action of Streptomycin with one of the sulfones, Am. Rev. Tbc., 55, 366 (1947).

(³) M. I. SMITH, W. T. MC CLOSKEY e E. L. JACKSON, Chemotherapeutic action of Streptomycin and Streptomycin with a sulfone or sulfadiazin on tuberculosis, Proc. Soc. exp. Biol. et Med., 64, 261 (1947).

(⁴) F. T. CALLOMON, J. A. KOLMER, A. M. RULE e A. J. PAUL, Streptomycin and diazone in treatment of experimental tuberculosis of guinea pigs, Proc. Soc. exp. Biol. et Med., 63, 237 (1946).

(⁵) G. BROWNLEE e C. R. KENNEDY, The chemotherapeutic action of Streptomycin, Sulphetrone, and Promin in experimental tuberculosis, Brit. J. Pharmacol., 3, 37 (1948).

(⁶) C. BAZZICALUPO, M. CONTIERI, V. DE FRANCISCIS, G. DE MICHELE e GANGEMI, Alcuni aspetti delle modalità d'azione della streptomicina nella tubercolosi sperimentale, ed attività dell'antibiotico associato ad altre sostanze, Arch. Tisiol., 2, 660 (1947).

(⁷) N. E. WAYSON e M. C. MC MAHON, Plague: Treatment of experimental animals with Streptomycin, Sulfadiazine and Sulfapyrazine, J. Lab. et Clin. Med., 31, 323 (1946).

Non mancano però voci discordi. Così Levaditi e Vaisman ⁽⁸⁾ e Moeschlin, Jaccard e Bosshard ⁽⁹⁾ negano che l'associazione streptomycin-solfone presenti nella tubercolosi sperimentale, vantaggi sulla streptomycin usata da sola.

Più concordi sono i giudizi desunti dall'osservazione clinica. Ricorderò a questo proposito i risultati brillanti comunicati da Cocchi e Pasquinucci ⁽¹⁰⁻¹¹⁾ nella cura della miliare e della meningite tbc., risultati che hanno avuto ampia eco in Italia e all'estero. Buoni risultati sono stati comunicati anche da Frontali ⁽¹²⁾, da Magrassi e Chessa ⁽¹³⁾, da Lincoln, Kirmse e De Vito ⁽¹⁴⁾, da O'Leary, Ceder, Hinshaw e Feldman ⁽¹⁵⁾ (questi ultimi nella tbc cutanea).

Risultati meno soddisfacenti sono stati ottenuti da Colarizi ⁽¹⁶⁾, da

⁽⁸⁾C. LEVADITI e A. VAISMAN, Effets thérapeutiques de la Promine (p, p'-diamino-diphényl-sulfone-N, N'-didextrose-sulfonate de sodium) dans l'infection tuberculeuse de la Souris, C. R. Soc. de Biol., 142, 308 (1948).

⁽⁹⁾S. MOESCHLIN, G. JACCARD e M. BOSSHARD, Experimentelle Untersuchungen ueber die Therapie der Tuberkulose durch Kombination von Streptomycin mit PAS oder Sulfon-N-azetat, Experientia, 4, 158 (1948).

⁽¹⁰⁾ C. COCCHI, Terapia della meningite tubercolare e della tubercolosi miliare generalizzata con streptomycin associata a solfone (Promin: p-p-diamino-difenil-solfon-N-N'-didestrosio bisolfito) e a vitamina in alte dosi, Notiz. Ammin. Sanit., 7, 3 (1946).

⁽¹¹⁾ C. COCCHI e G. PASQUINUCCI, Primi risultati nella terapia delle meningiti tubercolari con la streptomycin associata a solfone e vitamina A, Riv. Clin. Pediatr., 45, 193 (1947).

⁽¹²⁾ G. FRONTALI, Miliare e meningite tubercolare trattate con streptomycin, Comunicaz. tenuta all'Accad. Med. di Roma (1948) (in corso di stampa).

⁽¹³⁾ F. MAGRASSI e F. CHessa, Su alcuni risultati di terapia associata con streptomycin e solfone nell'infezione tubercolare, Studi Sassaresi, 25, 527 (1947).

⁽¹⁴⁾ E. M. LINCOLN, T. W. KIRMSE e E. DE VITO, Tuberculous meningitis in children. A preliminary report of its treatment with Streptomycin and « Promizole », J.A.M.A., 136, 593 (1948).

⁽¹⁵⁾ P. O' LEARY, E. CEDER, H. C. HINSHAW e W. H. FELDMAN, Treatment of cutaneous tuberculosis with Promizole and Streptomycin, Arch. Dermat., Syph. Can., 55, 222 (1947).

⁽¹⁶⁾ A. COLARIZI, Relazione sui primi sedici casi di meningite tubercolare e di meningite e tubercolosi miliarica curati con streptomycin, Notiz. Ammin. Sanit., 7, 9 (1946).

Daddi ⁽¹⁷⁾, da Gambarin, L. Gueff e T. Gueff ⁽¹⁸⁾ e da Madigan, Swift e Brownlee ⁽¹⁹⁾. Questi ultimi AA. mettono in dubbio che nella tubercolosi umana l'associazione streptomicina-sulfone abbia un'azione sinergica.

Ottimi risultati sono stati ottenuti da questa associazione nelle Brucellosi, che quasi mai guariscono se trattate con la sola streptomicina [Pulaski e Amspacher ⁽²⁰⁾, Eisele e Mc Cullough ⁽²¹⁾, Spink, Hall, Shaffer e Braude ⁽²²⁾, Harris e Jett ⁽²³⁾, Guillemin ⁽²⁴⁾], nelle infezioni del tratto urinario da B. coli [Crowley e O'Connor ⁽²⁵⁾], nella meningite da *Hemophilus influenzae* [Alexander, Leidy, Rake e Donovan ⁽²⁶⁾], nelle ferite infette [Howes ⁽²⁷⁾].

Nessun vantaggio è stato invece ottenuto da Focosi e Scalfi ⁽²⁸⁾ nella terapia del tracoma.

⁽¹⁷⁾ G. DADDI, Discussione alla comunicaz. di Frontali all'Accad. Med. di Roma (1948) (in corso di stampa).

⁽¹⁸⁾ GAMBARIN, L. GRUEFF e T. GRUEFF, Considerazioni sopra due casi di meningite tubercolare curati con streptomicina, solfone e vitamina A, Gazz. Med. Ital., 106, 260 (1947).

⁽¹⁹⁾ D. G. MADIGAN, P. N. SWIFT e G. BROWNLEE, Treatment of tuberculosis with Streptomycin and Sulphetrone, Lancet II, 897 (1947).

⁽²⁰⁾ E. J. PULASKI e W. H. AMSPACHER, Streptomycin therapy in Brucellosis, Bull. U. S. Army M. Dept., 7, 221 (1947).

⁽²¹⁾ C. W. EISELE e N. B. MC CULLOUGH, Combined Streptomycin and Sulfadiazine treatment in Brucellosis, J.A.M.A., 135, 1053 (1947).

⁽²²⁾ W. W. SPINK, W. H. HALL, J. M. SHAFFER e A. I. BRAUDE, Human Brucellosis. Its specific treatment with a combination of Streptomycin and Sulfadiazine, J.A.M.A., 136, 382 (1948).

⁽²³⁾ H. J. HARRIS e P. C. JETT, Streptomycin and sulfadiazine (combined) in chronic Brucellosis, J.A.M.A., 135, 1053 (1948).

⁽²⁴⁾ J. GUILLEMIN, Le traitement des brucelloses par l'association de Streptomycine et de sulfadiazine, Sem. Hop. Paris, 24, 1345 (1948).

⁽²⁵⁾ E. CROWLEY e V. J. O'CONOR, Treatment of persistent Colon Bacillus infections of urinary tract by Sulfasuxidine and Streptomycin, Surgery, Gynecol. et Obstetrics, 86, 224 (1948).

⁽²⁶⁾ H. E. ALEXANDER, G. LEIDY, G. RAKE e R. DONOVICK, Hemophilus influenzae meningitis treated with Streptomycin, J.A.M.A., 132, 434 (1946).

⁽²⁷⁾ E. L. HOWES, Prevention of wound infection by injection of nontoxic antibacterial substances, Ann. of Surg., 124, 268 (1946).

⁽²⁸⁾ M. FOCOSI e L. SCALFI, Primi tentativi di terapia con streptomicina e streptomicina associata a sulfamidici nel tracoma, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 23, 701 (1947).

Bisogna riconoscere che è ben difficile trarre dai dati qui sopra esposti un giudizio ben preciso. Le conclusioni a cui i diversi AA. arrivano, sono spesso completamente divergenti e questa discordanza è abbastanza facilmente spiegabile quando si pensi che i composti sulfonici da essi usati non sono stati sempre gli stessi, che le modalità di somministrazione e le dosi di medicamento sono variate anche notevolmente da caso a caso, di modo che i risultati ottenuti non sono per nulla uniformi. Ancor più difficile è dare un giudizio in base alle osservazioni cliniche, per lo meno nella tubercolosi. Si tratta qui di una malattia così proteiforme, di decorso così diverso da caso a caso, per l'influenza di tanti fattori, non tutti facilmente identificabili, che non è assolutamente possibile, alle volte sui risultati ottenuti su pochi pazienti, dare un giudizio sicuro e stabilire se la streptomicina associata al sulfone sia più efficace o meno della streptomicina usata da sola. Certi prematuri entusiasmi sono stati certamente eccessivi: ma certi scetticismi a partito preso sono pure da condannarsi. Si ha l'impressione che l'associazione dei due medicinali sia veramente utile, ma solo numerose prove comparative attuate con rigoroso criterio scientifico, ed una lunga osservazione degli individui apparentemente guariti, ci permetteranno di dare una risposta senza limitazioni o riserve. Se ciò vale per la tubercolosi, si può invece dire che nel caso delle Brucellosi l'associazione dei due medicinali è certamente efficace e raccomandabile.

Piuttosto scarse sono le ricerche condotte in vitro per accertare la esistenza o meno di un sinergismo. Ricorderò a questo proposito le ricerche di Bozzo ⁽²⁹⁾, di Bozzo e Olia ⁽³⁰⁾ e quelle di Scalfi e Bozzo ⁽³¹⁾. Questi AA. affermano che in brodo l'associazione streptomicina-streptosiltiazolo è sulle Brucelle, sulle Eberthelle, sulle Salmonelle, sulle Shigelle e sulle Escherichie (in complesso 24 ceppi) da due a cinque volte più effi-

⁽²⁹⁾ A. Bozzo, Ricerche sui sinergismi chemioterapici in vitro. I. Sull'attività antibatterica della streptomicina associata a penicillina o a sulfamidici sulle Brucelle, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 23, 745 (1947).

⁽³⁰⁾ A. Bozzo e A. OLIA, Ricerche sui sinergismi chemioterapici in vitro. II. Sull'attività antibatterica della streptomicina con penicillina e sulfamidici sulle Eberthelle, Salmonelle, Shighelle ed Escherichie, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 23, 748 (1947).

⁽³¹⁾ L. SCALFI e A. Bozzo, Associazioni chemioterapiche multiple in vitro, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 24, 47 (1948).

cace della streptomicina usata da sola, e parlano perciò di un vero sinergismo.

C. H. Huang, C. Y. Huang, L. Chu e T. Huang ⁽³²⁾ affermano di aver constatato in vitro, sul bacillo pestoso, un'azione sinergica dall'associazione streptomicina-sulfodiazina. Al contrario Brownlee e Kennedy ⁽⁵⁾ affermano che in vitro, sul bacillo tubercolare, l'associazione streptomicina-sulphetrone non esercita alcuna azione sinergica, ma soltanto una additiva.

In complesso le ricerche in vitro sono piuttosto scarse e presentano inoltre qualche punto che si presta ad essere discusso.

Premetto che in primo luogo ci si deve bene intendere sul significato che si deve dare al termine « sinergismo », e che non si deve confonderlo, come spesso si fa, con un semplice effetto additivo. Sperimentando una associazione di due diversi farmaci ambedue attivi su di un determinato germe, accadrà spesso di ottenere un effetto maggiore di quello provocato dai singoli componenti. Tale effetto è però dovuto alla semplice sommazione delle due azioni, e quindi in questo caso non è lecito parlare di sinergismo. Questo termine potrà essere usato quando l'effetto dell'associazione, statisticamente valutato, è certamente superiore all'effetto dei singoli componenti. Non è neppure necessario in tale caso che ambedue i farmaci siano dei chemioterapici: è sufficiente che lo sia uno solo: ed abbiamo infatti parecchi esempi di sostanze di per sè inattive, che associate ad un chemioterapico o ad un antibiotico, ne potenziano notevolmente l'attività (per es. in vivo: metaboliti di *P. notatum* per la penicillina; in vitro: nicotinammide o metionina per la penicillina, ecc.).

Non è sempre facile stabilire se in un determinato caso si tratti o meno di vero sinergismo, e più difficile ancora è lo spiegare il meccanismo dell'azione sinergica.

Un'altra osservazione è da farsi. Nelle ricerche sull'attività degli antibiotici, e soprattutto quando, come in questo caso, si sospetti che possa essere in gioco il fattore della streptomicinoresistenza, bisogna andare molto cauti nelle prove in brodo, e bisogna preferire piuttosto i metodi basati sull'agar-germi. E ciò si spiega facilmente. E' noto che in una po-

⁽³²⁾ C. H. HUANG, C. Y. HUANG, L. CHU e T. HUANG, Pneumonic plague. A report of recovery in a proved case and a note on sulfadiazine prophylaxis, Amer. J. Trop. Med., 28, 361 (1948).

popolazione batterica ci sono spesso alcuni individui che posseggono, rispetto alla streptomicina, una resistenza alle volte notevolmente superiore alla media. Seminando i germi in una serie di provette di brodo contenenti dosi scalari di streptomicina, si determina, con la provetta che per prima resta sterile, il limite della resistenza massima all'antibiotico, e questo limite varierà notevolmente, a seconda che il ceppo che si usa sia più o meno ricco di mutanti relativamente streptomycinoresistenti, o a seconda del numero di germi seminati, e della conseguente maggiore o minore probabilità di trovare fra di essi tali mutanti. E' evidente infatti che saranno sufficienti uno o pochi germi per intorbidare, sia pure con un certo ritardo il brodo. Si comprende che un fattore che agisca su questi pochi elementi più resistenti sia sufficiente per modificare profondamente il risultato della prova. Concludendo, nelle prove eseguite in terreni liquidi si va incontro a troppe cause d'errore, alle volte difficilmente valutabili, e che si possono facilmente evitare se si scelgono i metodi basati sull'agar-germi. Qui la zona d'inibizione determinata dall'antibiotico è delimitata da un orlo netto che corrisponde alla sensibilità limite della massima parte degli individui componenti la popolazione batterica. Le poche colonie più resistenti che possano svilupparsi entro tale limite, sono facilmente individuabili e non falsano il risultato.

Insomma con i terreni liquidi si determina la streptomycinoresistenza massima di una determinata popolazione batterica: con quelli solidi si determina quella della grandissima maggioranza degli individui batterici, senza perciò precludersi le possibilità di controllare anche la streptomycinoresistenza massima di determinati individui. E' evidente che, tranne in casi di ricerche dirette a fini del tutto particolari, il secondo metodo sia nettamente preferibile.

Un altro elemento di cui si deve tener conto, è quello dell'azione antagonista esercitata dall'acido paraaminobenzoico sui sulfamidici. Ed è noto che nel peptone l'acido paraaminobenzoico è presente, in quantità più o meno elevata. Bisogna tener conto anche del numero dei germi, perchè è noto che l'attività dei sulfamidici è in rapporto inverso con la carica batterica.

Nelle ricerche da me eseguite ho preso in considerazione 18 ceppi batterici, e più precisamente 6 ceppi di germi Gram-positivi (stafilococ-

chi), 8 di germi Gram-negativi (4 coli, 1 Friedlaender, 2 tifi, 1 paratifo) e 4 di germi acidoresistenti (paratubercolari).

La streptomicina usata nelle esperienze era quella del commercio; il sulfone era quello De Angeli (*) e quello Cilag (**). Non ho trovato sensibili differenze di comportamento tra i due prodotti.

La tecnica d'allestimento dell'agar-germi è quella da me già descritta in un precedente lavoro ⁽³³⁾, con la differenza che qui ho usato una carica batterica più bassa (in genere di 0,1-0,3 cm³ per piastra). I medicinali erano contenuti in un volume totale di 0,05 cm³ per pozzetto. La lettura veniva eseguita dopo 24 ore, o dopo 48 per i germi acido-resistenti, di più lenta crescita. Di ogni alone veniva misurato il diametro. Bisogna qui rilevare che mentre la determinazione del diametro dell'alone d'inibizione causato dalla streptomicina non presenta difficoltà, lo stesso non si può dire per quello determinato dal sulfone. Qui il limite della zona sterile è spesso indistinto e alle volte l'inibizione di crescita dei germi contenuti entro tale limite è soltanto parziale. Ad ogni modo anche qui con un po' d'esperienza è possibile arrivare ad una determinazione sufficientemente precisa.

Le dosi di streptomicina e di sulfone usate variano da ceppo a ceppo e da esperienza ad esperienza. In genere sono state usate dosi tali da essere molto prossime al limite della loro attività.

In un primo gruppo di prove ho associato i due medicinali in dosi tali da essere capaci di dare, anche da sole, una ben evidente zona di inibizione.

Riporto nella tabella della pagina seguente i dati di alcune di queste prove.

Come si vede, l'associazione dei due medicinali non manifesta alcuna azione sinergica. L'area d'inibizione resta o uguale a quella massima determinata dal medicamento più attivo, oppure, ben più spesso, è lievemente inferiore a questa. Si direbbe cioè che esista, piuttosto che un

(*) N-piridina: soluzione al 40% di aminobenzon-sulfamidopiridina-metilsulfonato sodico.

(**) Soluzione al 10% di 4-carbossimetilamino-4'-amino-difenilsolfone (cortese-mente fornito dalla Ditta S. A. Bracco).

⁽³³⁾ B. BABUDIERI, Controllo di attività dei preparati di penicillina, Ann. d'Igiene, 56, 289 (1946).

Kl. pneumoniae Pavia S.			S. typhi Ty2			St. aureus B. 8		
S	inibiz.	15 mm	S	inibiz.	11 mm	S	inibiz.	25 mm
Str (2 γ)	»	9,5 mm	Str (20 γ)	»	10 mm	Str (5 γ)	»	14,5 mm
S + Str	»	14 mm	S + Str	»	9,5 mm	S + Str	»	25 mm
B. paratbc Beck			B. paratbc Danes					
S	inibiz.	25 mm (*)	S	inibiz.	minima			
Str (5 γ)	»	17 mm	Str (5 γ)	»	18 mm			
S + Str	»	25 mm (**)	S + Str	»	16 mm			

S— Sulfone De Angeli (1 : 2) Str — Streptomicina

(*) Area a limiti indistinti di inibizione parziale.

(**) Area a limiti indistinti di inibizione parziale. In essa è contenuta un'area di inibizione totale, con limiti ben delineati, di 15,5 mm di diametro.

sinergismo, un lieve antagonismo. Questo antagonismo si può manifestare da parte di ciascuno dei due due medicinali verso l'altro, ma è più frequente a danno della streptomicina. Infatti si constata che la riduzione dell'area avviene sia quando il componente più attivo è la streptomicina, sia quando lo è il sulfone. Però mentre in questo secondo caso l'associazione dei due medicinali non determina alle volte una riduzione dell'area, nel primo caso essa dà sempre un'area minore di quella data dalla sola streptomicina. Ciò è molto evidente nel caso dell'esperienza con il ceppo Beck, riportata nella precedente tabella. In questo caso è stato infatti possibile misurare sulla piastra l'ampiezza delle due aree di inibizione date dai due componenti la miscela. Si vide così che mentre l'area data dal sulfone non ha subito modificazioni, quella della streptomicina si è ridotta.

In un secondo gruppo di esperienze ho saggiato l'associazione dei due medicinali, impiegando dell'uno una dose sufficiente a dare un alone d'inibizione; dell'altro una dose insufficiente. Ecco i risultati di tali prove (vedi tabella a pagina seguente).

Anche queste prove non fanno che confermare quanto detto sopra. Esse dimostrano che non soltanto dosi subattive di sulfone deprimono l'azione della streptomicina, ma anche che, sia pure in misura minore, dosi subattive di streptomicina possono deprimere l'azione del sulfone.

Come si può spiegare questo inatteso comportamento? Poichè le soluzioni di sulfone sono acide e poichè è noto che in ambiente acido la

I. - DOSE INSUFFICIENTE DI SULFONE

S. typhi Ty2			Kl. pneumoniae Pavia S		
Sc	inibiz.	0	S 1:20	inibiz.	0
Str (20 γ)	»	9,5 mm	Str (4 γ)	»	21 mm
Sc + Str	»	0	S + Str	»	20 mm
St. aureus Oxford			B. paratyphicus Horn		
S 1:2	inibiz.	0	S 1:2	inibiz.	0
Str (4 γ)	»	15,5 mm	Str (5 γ)	»	19 mm
S + Str	»	minima	S + Str	»	16 mm

II. - DOSE INSUFFICIENTE DI STREPTOMICINA

S. typhi Ty2				Kl. pneumoniae Pavia S				St. aureus Oxford			
S 1:2	inibiz.	11 mm		S 1:5	inibiz.	minima		S	inibiz.	26 mm	
Str (10 γ)	»	0		Str (1 γ)	»	0		Str (2 γ)	»	0	
S + Str	»	9 mm		S + Str	»	minima		S + Str	»	26 mm	

Sc— Sulfone Cilag, S— Sulfone De Angelis, Str— Streptomicina.

streptomicina, pur senza essere distrutta, subisce tuttavia una diminuzione della sua attività [Abraham e Duthie (³⁴)], si poteva trovare qui la ragione della diminuita attività della streptomicina miscelata a sulfone. Ma a parte che recenti ricerche [Green e Waksman (³⁵)] tendano a mettere in dubbio l'influenza di scarse variazioni del pH sull'attività della streptomicina, e a parte il fatto che nell'agar-germi, ricco di sostanze tampone, il pH della miscela si equilibra rapidamente, prove fatte portando il pH della miscela allo stesso valore del pH della soluzione di streptomicina di controllo, non hanno mostrato sensibili variazioni d'attività. Del resto se il fattore pH potrebbe essere chiamato in causa per spiegare

(³⁴) E. P. ABRAHAM e E. S. DUTHIE, Effect of pH of the medium on activity of Streptomycin and Penicillin, Lancet, 250, 455 (1946).

(³⁵) S. R. GREEN e S. A. WAKSMAN, Effect of glucose, peptone and salts on Streptomycin activity, Proc. Soc. exp. Biol. et Med., 67, 281 (1948).

l'azione inibente esercitata dal sulfone sulla streptomycin, esso non può contare per spiegare l'azione inibente esercitata dalla streptomycin sul sulfone. Probabilmente questi fenomeni di inibizione non sono dovuti a semplici azioni di contatto chimiche o fisico-chimiche fra i due componenti la miscela, ma sono da riportarsi ad azioni più complesse, alle quali probabilmente non sono estranei i germi nei loro ricettori e nel loro metabolismo.

A completamento delle ricerche qui sopra esposte, e come controllo dei risultati ottenuti dagli AA. prima citati, ho saggiato l'associazione dei due medicinali in terreni liquidi, usando per ciò un brodo privo di peptone.

I risultati sono stati qui spesso diversi da quelli ottenuti sull'agar-germi, e possono anche essere considerati conferme di quanto pubblicato da Bozzo (²⁹), Bozzo e Olia (³⁰) e da Scalfi e Bozzo (³¹).

Ecco alcuni risultati delle prove eseguite:

S. typhi Ty2				Kl. pneumoniae Pavia S					
S	0,5 :	—	0,4 :	+	S	0,5 :	—	0,3 :	±
Str	0,3 :	—	0,2 :	+	Str	0,2 :	—	0,1 :	+
S+Str	0,4 + 0,1 :	—	0,4 + 0,05 :	±	S+Str	0,1 + 0,2 :	—	0,1 + 0,1 :	+

St. aureus Oxford				B. paratyphus Horn					
S	0,7 :	—	0,5 :	+	S	0,3 :	—	0,2 :	±
Str	0,3 :	—	0,2 :	+	Str	0,1 :	—	0,05 :	+
S + Str	0,5 + 0,2 :	—	0,4 + 0,1 :	+	S + Str	0,2 + 0,2 :	—	0,2 + 0,1 :	±

+ : crescita; — : inibizione di crescita.

Le prove sono state eseguite in provette contenenti ciascuna 5 cm³ di brodo. Le soluzioni di streptomycin e di sulfone avevano valore diverso, a seconda del ceppo studiato. I valori riportati nella tabella indicano, in cm³, la quantità di tali soluzioni aggiunta ad ogni provetta.

Nell'associazione sulfone-streptomycin, la prima cifra si riferisce al sulfone, la seconda alla streptomycin.

Come si vede, mentre nel caso di *S. typhi* e dello stafilococco, l'associazione dei due medicamenti dimostra in brodo un netto effetto, per lo meno additivo, se non sinergico, ciò non accade nel caso di *Kl. pneumoniae* e del paratubercolare Horn.

Riassumendo noi constatiamo che mentre l'associazione sulfone-streptomicina dimostra sperimentalmente in vivo una netta azione di potenziamento, questa è dimostrabile solo di fronte ad alcuni ceppi nelle prove eseguite in terreni liquidi, e manca del tutto e anzi è soppiantata da un'azione di antagonismo nell'agar-germi.

Come si possono conciliare questi risultati apparentemente opposti? Una spiegazione può essere trovata qualora si accetti l'interpretazione che Middlebroock e Yegian (³⁶) danno della benefica azione in vivo di tale associazione. Essa consiste nella circostanza che la presenza del sulfone rallenta grandemente l'insorgenza della streptomycinoresistenza e permette quindi alla streptomicina di esercitare a lungo la sua azione antibiotica sui germi, anche attraverso a ripetute generazioni di questi.

Questa ipotesi, che è ormai largamente condivisa, è stata di recente confermata da alcune interessanti esperienze di Scalfi, Leonardi e Olia (³⁷). Si potrebbe così pensare che mentre la streptomicina agisce sulla grande maggioranza dei germi, quelli pochi che, per la loro relativa resistenza si sottraggono alla sua azione, vengano efficacemente aggrediti dal sulfone, appunto in grazie al loro numero poco elevato. Naturalmente questa è soltanto un'ipotesi che deve essere ancora provata, ma essa spiegherebbe perchè in brodo, dove si determina il limite massimo di resistenza dei germi, l'associazione dei due medicamenti risulti efficace, mentre nell'agar-germi, dove si misura la resistenza della grande maggioranza dei germi, essa non dimostri alcun vantaggio. Il fatto poi che in brodo [vedi anche Bozzo (²⁹), Bozzo e Olia (³⁰), Scalfi e Bozzo (³¹)] l'efficacia dell'as-

(³⁶) G. MIDDLEBROOK e D. YEGIAN, Certain effects of Streptomycin on mycobacteria in vitro, Am. Rev. Tbc., 54, 553 (1946).

(³⁷) L. SCALFI, G. LEONARDI e A. OLIA, Ricerche sulla chemioresistenza acquisita dei batteri. I. Inibizione della streptomycinoresistenza acquisita in vitro col trattamento combinato penicillina-streptomicina-sulfamidici, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 24, 626 (1948).

sociazione varî abbastanza notevolmente da ceppo a ceppo, potrebbe essere spiegato dal fatto che nei varî ceppi il numero degli individui dotati di relativa streptomycinoresistenza è molto diverso. E' noto ad esempio che esso è piuttosto numeroso nel coli e nel tifo, mentre è molto scarso nelle Klebsielle. Alcune prove che ho eseguito sui due ceppi che non hanno avuto beneficio in brodo dall'associazione sulfone-streptomicina, seminandone un'abbondante sospensione batterica su piastre di agar contenente dosi scalari di streptomicina, m'hanno infatti rivelato che essi sono piuttosto poveri di individui resistenti. Infatti mentre alla dose di 1 γ per cm^3 lo sviluppo di colonie era ancora abbondante, questo era del tutto assente alla dose di 10 γ .

Nella spiegazione dell'azione benefica dell'associazione medicamentosa in vivo, non si può prendere in considerazione quanto dimostrato da Leonardi e Campus (³⁸) sulla proprietà che i sulfamidici hanno di inibire in vitro il potere inattivante del siero nei confronti della streptomicina, e ciò perchè questo potere inattivante si ha, come di recente dimostrato da Cattaneo (³⁹), soltanto per azione del siero denaturato con varii mezzi, e non per azione di quello fresco.

In conclusione mi pare che da quanto fin qui esposto si possa affermare che:

1) Non è dimostrabile in vitro un'azione sinergica da parte dell'associazione sulfone-streptomicina. Anzi fra i due medicinali si stabilisce una certa reciproca limitazione d'attività.

2) In vivo, di fronte ad alcuni germi, tale associazione esercita invece un'azione benefica, alle volte molto considerevole. Si ha ragione di ritenere che tale azione non sia dovuta ad un fenomeno di vero sinergismo, inteso nel significato chimico o fisico-chimico che ha tale termine, ma ad un'azione del sulfone sugli individui batterici streptomycinoresistenti. Si potrebbe quindi tutt'al più parlare di un sinergismo biologico.

(³⁸) G. LEONARDI e F. CAMPUS, Ricerche sul meccanismo dell'azione sinergica fra antibiotici e chemioterapici. IV. Inibizione del potere inattivante del siero nei confronti della streptomicina in presenza di sulfamidici in vitro, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 24, 632 (1948).

(³⁹) C. CATTANEO, Discussione alla comunicaz. di Frontali all'Accad. Med. di Roma (1948) (in corso di stampa).

3) Per quanto riguarda il bacillo tubercolare, questo sinergismo, per quanto molto probabile, non si può ancora considerare come definitivamente dimostrato, specie in clinica umana e per la meningite tubercolare. Ad ogni modo i risultati di alcune ricerche sperimentali e il tenore di certe pubblicazioni cliniche sono tali da consigliare di associare, quando possibile, nella cura della tubercolosi, il sulfone alla streptomina.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.
26 settembre 1948.
