

56. Littoria von LORCH. — Metodica per ottenere sospensioni microbiche a resistenza eterologa agli antibatterici.

Riassunto. — L'A. rende nota una metodica per ottenere sospensioni microbiche a resistenza eterologa ai sulfamidici (succinilsulfotiazolo, sulfamido tiazolo ametilato, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfamidodimetilpirimidina, sulfamidoisossazolo) e agli antibiotici (penicillina, streptomicina, neomicina, cloramfenicolo, ossitettraciclina, clorotetraciclina, tetraciclina cloridrato).

Ciò è di somma importanza in quanto a tutt'oggi non era stato possibile ottenere sospensioni microbiche resistenti a 13 antibatterici.

Tale procedimento consiste nel realizzare mutanti indotte a resistenza omologa verso ogni antibatterico considerato. Ottenute tali mutanti, si procede, previo « lavaggio » delle popolazioni microbiche in terreno privo di antibatterico, al miscuglio finale, che risulterà costituito da popolazioni microbiche a resistenza omologa con funzione eterologa.

Gli stipiti impiegati in tali ricerche sono: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*.

Il grado di resistenza omologa ottenuto è del seguente ordine:

penicillina	10 U/cm ³
streptomicina	>1.000 γ/cm ³
neomicina	>1.000 γ/cm ³
cloramfenicolo	100 γ/cm ³
ossitettraciclina	100 γ/cm ³
clorotetraciclina	100 γ/cm ³
tetraciclina cloridrato	100 γ/cm ³
succinilsulfotiazolo	100 γ/cm ³
sulfamido tiazolo ametilato	100 γ/cm ³
sulfadiazina	100 γ/cm ³
sulfamerazina	100 γ/cm ³
sulfamidodimetilpirimidina	100 γ/cm ³
sulfamidoisossazolo	100 γ/cm ³

Il procedimento è estensibile anche ad altri schizomiceti (*B. subtilis*, *E. coli*, ecc.).

L'A. discute l'impiego di tali miscugli di lattobacilli, a resistenza eterologa agli antibiotici e chemioterapici, per la preparazione di «fermenti lattici» a scopo terapeutico, e per la produzione di formaggi freschi, yogurt, ecc., utilizzando il latte di bovine trattate con antibiotici.

Résumé. — L'auteur fait connaître une méthode pour obtenir des suspensions microbiennes à résistance hétérologue aux sulfamides (succinylsulfathiazol, sulfamidothiazolaméthylate, sulfadiazine, sulfamidodiméthylpyrimidine, sulfamidoisoxazol) et aux antibiotiques (pénicilline, streptomycine, néomycine, tétracycline chlorhydrate).

C'est là un fait de grande importance, car il n'avait pas été possible, jusqu'à ce jour, d'obtenir des suspensions microbiennes résistantes à 13 bactéricides.

Ce procédé consiste en la réalisation de mutants provoqués à une résistance homologue envers chaque antibactérien considéré.

Après avoir obtenu ces mutants, on procède après « lavage » préalable des populations microbiennes, en terrain dépourvu d'antibactériens, au mélange final, qui sera constitué de populations microbiennes à résistance homologue avec fonction hétérologue.

Les souches employées dans ces recherches sont: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*.

Le degré de résistance homologue obtenu est de l'ordre suivant:

pénicilline	10 U/cm ³
streptomycine	>1000 γ/cm ³
néomycine	>1000 γ/cm ³
chloramphénicol	100 γ/cm ³
oxytétracycline	100 γ/cm ³
chlorotétracycline	100 γ/cm ³
tétracycline chlorhydrate	100 γ/cm ³
succinylsulfathiazol	100 γ/cm ³
sulfamidothiazolaméthylate	100 γ/cm ³
sulfadiazine	100 γ/cm ³
sulfamidodiméthylpyrimidine	100 γ/cm ³
sulfamidoisoxazol	100 γ/cm ³

Ce procédé peut également être employé pour d'autres schizomycètes (*B. subtilis*, *E. coli*, etc.).

L'auteur discute l'emploi de ces mélanges de lactobacillus à résistance hétérologue aux antibiotiques et aux thérapeutiques chimiques pour la préparation de « ferments lactiques » à utilisation thérapeutique et pour la production de fromage frais, yoghourt, etc, en utilisant le lait de bovidées traitées avec des antibiotiques.

Summary. — The author report on a method to obtain microbic suspensions at heterological resistance to sulfamides (succinylsulfathiazole, sulfamidethiazole-amethyl, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamidedimethylpyrimidine, sulfamideisoxazole) and to antibiotics (penicillin, streptomycin, neomycin, chloramphenicol, oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline chloride).

This is of the greatest importance, inasmuch as up to the present time it has not been possible to obtain resistant microbic suspensions to 13 antibacteric products.

This method consist of obtaining homologue-resistant induced mutants against all tested antibacterial substances.

Once these mutants have been obtained, the microbic population is « washed » in antibacteria-free medium and subsequently submitted to a final mixture that will thus result made up of homologue-resistant microbic population having heterologue function.

The strains used are: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*.

The degree of homologue resistance obtained is of the following order:

penicillin	10 U/cm ³
streptomycin	>1000 γ/cm ³
neomycin	>1000 γ/cm ³
chloramphenicol	100 γ/cm ³
oxytetracycline	100 γ/cm ³
chlortetracycline	100 γ/cm ³
tetracycline chloride	100 γ/cm ³
succinylsulfathiazole	100 γ/cm ³
sulfamidethiazole-amethyl	100 γ/cm ³
sulfadiazine	100 γ/cm ³
sulfamerazine	100 γ/cm ³
sulfamidedimethylpyrimidine	100 γ/cm ³
sulfamideisoxazole	100 γ/cm ³

The method can be applied also to other schyzomycetes (*B. subtilis*, *E. coli*, ecc.).

The author discusse the practical use of such lactobacilli mixtures having heterologue-resistance to antibiotics and to chemotherapeutic substances, for the preparation processes of « lactis ferments » for therapeutic purposes and for the preparation of fresh cheese, yoghourt, ecc., utilizing milk of cows treated with antibiotics.

Zusammenfassung. — Mitgeteilt wird ein Verfahren zur Erzielung von Mikrobensuspensionen mit heterologer Resistenz gegen Sulfamide (Succinylsulfothiazol, Sulfamidthiazolamethylat, Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfamidodimethylpyrimidin, Sulfamidoisooxazol) und gegen Antibiotika (Penizyllin, Streptomycin, Neomycin, Chloramphenikol, Oxytetracyclin, Chlorotetracyclin, Tetracyclinchlorhydrat). Dies ist von grösster Bedeutung, da es bis heute nicht möglich war, gegen 13 Antibakterienmittel resistente Mikrobensuspensionen zu erhalten.

Das Verfahren besteht darin, Stämme zu züchten, die gegen jedes der benutzten Antibakterienmittel gleichmässig widerstandsfähig sind. Danach werden die Mikrobenstämme auf einem von Antibakterienmitteln freien Boden « gewaschen », worauf die endgültige Mischung vorgenommen wird, die aus gleichmässig resistenten Mikrobenstämmen mit heterologer Funktion besteht.

Die hierbei benutzten Stämme sind: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*.

Der erzielte homologe Resistenzgrad ist:

Penizyllin	10 U/cm ³
Streptomycin	>1.000 γ/cm ³
Neomycin	>1.000 γ/cm ³
Chloramphenikol	100 γ/cm ³
Oxytetracyclin	100 γ/cm ³
Chlorotetracyclin	100 γ/cm ³
Tetracyclinchlorhydrat	100 γ/cm ³
Succinylsulfothiazol	100 γ/cm ³
Sulfamidthiazolamethylat	100 γ/cm ³
Sulfadiazin	100 γ/cm ³
Sulfamerazin	100 γ/cm ³
Sulfamidodimethylpyrimidin	100 γ/cm ³
Sulfamidoisooxazol	100 γ/cm ³

Das Verfahren ist auch für anderen schizomyceten anwendbar (*B. subtilis*, *E. coli*, usw.).

Der Verfasser untersucht die Verwendungsmöglichkeit solcher Mischungen von Lactobazillen mit heterologer Resistenz gegen Antibiotika und chemotherapeutische Mittel zur Herstellung von « Milchfermenten » für therapeutische Zwecke und bei der Herstellung von Frischkäse, Joghurt, usw., aus mit Antibiotika behandelter Kuhmilch.

Il fenomeno della resistenza dei germi agli antibiotici è stato segnalato quasi subito dopo la scoperta di questi, ed è andato man mano assumendo maggiore importanza sia per il sempre più vasto impiego della terapia antibatterica, sia per le ricerche che molti AA. hanno svolto in questo campo.

Il meccanismo patogenetico del fenomeno di resistenza agli antibiotici può essere interpretato come espressione di una mutazione spontanea del germe, indipendente dall'azione dell'antibiotico, oppure come fenomeno di induzione, conseguente ad interazione tra antibiotico e germe [ENGLISH ⁽¹⁾; SAZ ⁽²⁾; CHABBERT ⁽³⁾; HAAS ⁽⁴⁾; HOTCHKISS ⁽⁵⁾; SEVAG ⁽⁶⁾].

Dallo studio di queste interazioni si è giunti a distinguere il fenomeno in:

I) *Resistenza omologa o specifica*: dimostrata da un germe, sia « in vivo » e che « in vitro », verso un determinato antibiotico.

II) *Resistenza eterologa o crociata*: dimostrata, sia « in vivo » che « in vitro », da un germe resistente ad un antibiotico verso altri antibiotici, con i quali tale germe non era mai stato in contatto.

III) *Sensibilità collaterale*: un germe può contemporaneamente divenire più resistente ad un antibiotico e più sensibile ad un altro.

Inizialmente vennero svolte numerose ricerche relative allo studio della resistenza omologa, alla penicillina e alla streptomina, di diversi germi (stafilococco, pneumococco, streptococco, *E. coli*, ecc.) [SEVAG ⁽⁵⁾; SAKAKIBARA ⁽⁷⁾; CANNELLA ⁽⁸⁾; ALEXANDER ⁽⁹⁾; VAISMAN ⁽¹⁰⁾; WRIGHT ⁽¹¹⁾; MAYR-HARTING ⁽¹²⁾; LINZ ⁽¹³⁾; GEZON ⁽¹⁴⁾; WELSCH ^(15, 16, 17); CIPPELLINI ⁽¹⁸⁾; BELYANSKI ⁽¹⁹⁾; MAYOUX ⁽²⁰⁾; LE MOANS ⁽²¹⁾; LEVADITI ⁽²²⁾; SMOLENS ⁽²³⁾; ANGELUCCI ⁽²⁴⁾; BACHRACH ^(25, 26); BARBER ^(27, 28); HAIGHT ^(29, 30, 31); ROUNTREE ⁽³²⁾; FUSILLO ⁽³³⁾; SCURO ⁽³⁴⁾; ORTONA ⁽³⁵⁾].

In questi ultimi tempi numerosi AA. hanno affrontato il problema della resistenza eterologa, ed il meccanismo patogenetico del fenomeno è stato considerato anche da un punto di vista genetico e statistico [VAISMAN ⁽¹⁰⁾; WRIGHT ⁽¹¹⁾; SZYBALSKI ⁽³⁶⁾; CURATOLA ^(37, 38); MACCACCARO ⁽³⁹⁾; CAVALLI SFORZA ⁽⁴⁰⁾; LEVADITI ⁽⁴¹⁾; MONNIER ⁽⁴²⁾; WRIGHT ⁽⁴³⁾; DE CARLI ⁽⁴⁴⁾; SCURO ⁽⁴⁵⁾].

Recentemente il tentativo di realizzare delle resistenze indotte agli antibiotici, ha implicato l'impiego dei più svariati mezzi: adattamento dei germi in presenza di dosi progressive dell'antibiotico, uso di sostanze chimiche (perossidi, derivati purinici, cloruro di manganese, ecc), esposizione delle cellule batteriche alle radiazioni ultraviolette.

Con tali tecniche si possono ottenere mutanti batteriche indotte,

sfruttabili per applicazioni pratiche di notevole importanza: mutanti fermentative per applicazioni industriali, e mutanti auxotrofiche per il dosaggio delle vitamine e degli aminoacidi.

Si possono inoltre ottenere stipiti batterici a resistenza omologa per la titolazione di preparazioni farmaceutiche contenenti più antibiotici [VON LORCH ⁽⁴⁶⁾; SELLA ⁽⁴⁷⁾].

DE CARLI ⁽⁴⁴⁾ in un recentissimo studio statistico della resistenza multipla naturale agli antibatterici, eseguito su 93 stipiti di *Staphilococcus aureus* isolati da materiale patogeno, ha potuto mettere in evidenza la seguente distribuzione delle frequenze dei vari multiplo-resistenti:

<i>Stipiti resistenti a tutti gli antibatterici considerati</i> (penicillina, streptomina, aureomicina, terramicina, eritromicina, cloramfenicolo, sulfotiazolo)	0%
<i>Stipiti resistenti a cinque</i>	0%
<i>Stipiti resistenti a quattro</i>	3,2%
<i>Stipiti resistenti a tre</i>	7,5%
<i>Stipiti resistenti a due</i>	46,2%
<i>Stipiti resistenti a uno</i>	29,1%

Allo stato attuale quindi è possibile ottenere delle mutanti naturali o indotte, a resistenza omologa, mentre è molto più difficile ottenere mutanti doppio-resistenti o multiplo-resistenti (al massimo resistenti a quattro antibiotici); comunque già il grado di resistenza ad una coppia di antibiotici, è inferiore a quello che si ottiene con gli antibiotici isolati e ciò farebbe pensare che la resistenza ad una coppia di antibiotici sia controllata da due sistemi poligenici solo parzialmente sovrapposti [VAISMAN ⁽¹⁰⁾; WRIGHT ⁽¹¹⁾; SZYBALSKI ⁽³⁶⁾; MACCACARO ⁽³⁹⁾; LEVADITI ⁽⁴¹⁾; MONNIER ⁽⁴²⁾; WRIGHT ⁽⁴³⁾].

SCOPO DEL LAVORO

Da quanto sopra brevemente esposto risulta che non è possibile isolare od ottenere mutanti batteriche resistenti a tutti gli antibiotici usualmente impiegati.

Poichè da molti anni ci interessiamo dei complessi e poco noti problemi relativi ai lattobacilli (terreni culturali, sopravvivenza, attività biochimiche e sierologiche, ecc.) ci è parso logico eseguire uno studio sulla resistenza eterologa indotta agli antibatterici, impiegando tale specie microbica.

Infatti con l'introduzione dei chemioterapici e degli antibiotici si sono venuti a creare, accanto alla favorevole azione terapeutica, effetti collaterali negativi secondari a dismicrobismo intestinale.

Ormai è risaputo che la distruzione della flora batterica commensale intestinale da parte di antibiotici e chemioterapici, comporta un depauperamento vitaminico, specie del gruppo B, dell'organismo e notevoli danni per rottura del normale equilibrio biologico tra specie e specie microbica e miceti [CHINI (⁴⁸); DI RAIMONDO (^{49, 50, 51, 52, 53}); FIDANZA (⁵⁴); LEPPER (^{55, 56}); LUCHERINI (⁵⁷); MALAGUZZI (⁵⁸); PAOLANTONIO (^{59, 60}); SARETT (⁶¹); SBOROV (⁶²); TENTORI (⁶³)].

Da tutto ciò si rileva l'importanza di mantenere durante il trattamento chemioterapico-antibiotico, l'equilibrio biologico tra specie e specie microbica abituale ospite dell'intestino.

La somministrazione di vitamine, specie quelle del gruppo B, pone solo in minima parte riparo all'imponente squilibrio biologico apportato dalla distruzione della flora microbica intestinale, poichè la sua carenza non solo provoca disvitaminosi, ma sopprime altresì insostituibili funzioni metaboliche non del tutto note.

Non potendo naturalmente procedere alla reintegrazione di tutta la flora microbica intestinale, sarebbe sufficiente introdurre lattobacilli in conveniente stato di vitalità, oltre che per le loro proprietà di sintesi delle vitamine, anche per il loro noto antagonismo biologico nei confronti della flora alcaligeno-putrefattiva.

Allo stato attuale però una terapia sostitutiva o reintegrativa con gli usuali «fermenti lattici», non è possibile in quanto i lattobacilli impiegati sono sensibilissimi all'azione degli antibatterici [NEGRI (⁶⁴)].

Da ciò la necessità di realizzare delle mutanti resistenti agli usuali antibiotici e chemioterapici impiegati.

Altra applicazione di notevole interesse economico di queste mutanti, è quella relativa all'utilizzazione di latte di bovine nutrite con mangimi contenenti antibiotici in funzione di fattori di crescita, oppure trattate con antibiotici a scopo terapeutico. Tale latte contiene quantità sufficiente di antibiotico che lo priva della flora abituale, compresi i lattobacilli. Di conseguenza tale latte non può essere adibito alla produzione di formaggi freschi e quindi la preparazione di un « inoculum », costituito da lattobacilli resistenti agli antibatterici, potrebbe risolvere il problema.

Ai fini del nostro lavoro, abbiamo creduto opportuno utilizzare stipiti batterici della nostra collezione; tali stipiti non erano mai stati in contatto con antibiotici, in quanto isolati avanti la scoperta di questi.

Dalla bibliografia consultata non risulta che siano state realizzate delle mutanti di lattobacilli a resistenza eterologa agli antibiotici; mentre

risulta che, per successivi passaggi in mezzo liquido contenente dosi progressive di antibiotico, BACHRACH e collaboratori (²⁵, ²⁶) sono riusciti a creare una mutante di *Lactobacillus acidophilus* resistente alla streptomicina. Il grado di resistenza raggiunto è stato di mg 75 di streptomicina/cm³.

MATERIALI USATI

Stipiti batterici: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis* (2 stipiti).

Terreni culturali: brodo carota-fegato pH 6, agar carota-fegato pH 6, agar carota-fegato-latte pH 6, latte scremato.

Antibiotici: penicillina, streptomicina, neomicina, cloramfenicolo, ossitetraciclina, clorotetraciclina, tetraciclina cloridrato.

Sulfamidici: 1) succinilsulfotiazolo, 2) sulfamido tiazolo ametilato, 3) sulfadiazina, 4) sulfamerazina, 5) sulfamidodimetilpirimidina, 6) sulfamidoisossazolo.

Sorgente d'irradiazione: è stata usata una lampada germicida da 15 Watt General Electric, alla distanza di cm 16,5 per un periodo di esposizione di 5'.

TECNICA DELLE RICERCHE

Dopo aver accertata con l'antibiogramma, la sensibilità ($>$ di I U o I γ) degli stipiti in studio, abbiamo seguito due procedimenti allo scopo di realizzare delle mutanti resistenti agli antibatterici:

I) Adattamento in presenza di dosi progressive di antibatterico su terreno solido o liquido, previa esposizione alle radiazioni ultraviolette.

II) Adattamento in presenza di dosi progressive di antibatterico su terreno solido o liquido.

Poichè dalle prove preliminari è risultato che solo raramente con le radiazioni ultraviolette si ottenevano mutanti a sensibilità inferiore di quella naturale, abbiamo creduto opportuno seguire la seconda metodica.

Per quanto concerne l'uso del terreno colturale liquido o solido (brodo carota-fegato e agar carota-fegato pH 6), abbiamo subito rilevato che era possibile ottenere facilmente un elevato grado di resistenza omologa alla streptomicina e alla neomicina, su terreno liquido con passaggi suc-

cessivi in presenza di dosi crescenti di antibiotico; ciò non era invece possibile per gli altri antibiotici e per i sulfamidici.

Di conseguenza, onde uniformare la tecnica di lavoro, abbiamo creduto opportuno effettuare le nostre ricerche impiegando agar carota-fegato pH 6.

La resistenza omologa del *Lactobacillus bulgaricus*, è stata invece realizzata per mezzo di successivi passaggi dello stipite in latte scremato contenente dosi crescenti di antibatterico.

Pertanto la tecnica usata è stata la seguente:

Gli stipiti batterici venivano coltivati su brodo carota-fegato pH 6 a 37°C. per 18-24 ore, sotto agitazione. A sviluppo ottenuto si seminava per strisciamento su agar carota-fegato pH 6 (piastre di Petri del diametro di cm 10) contenente l'antibatterico verso il quale si voleva ottenere la resistenza. Le dosi iniziali furono le seguenti:

penicillina	0,1 U/cm ³
streptomicina	0,1 γ/cm ³
neomicina	0,1 γ/cm ³
cloramfenicolo	0,1 γ/cm ³
ossitetraciclina	0,1 γ/cm ³
clorotetraciclina	0,1 γ/cm ³
tetraciclina cloridrato	0,1 γ/cm ³
succinilsulfotiazolo	0,1 γ/cm ³
sulfamido tiazolo ametilato	0,1 γ/cm ³
sulfadiazina	0,1 γ/cm ³
sulfamerazina	0,1 γ/cm ³
sulfamidodimetilpirimidina	0,1 γ/cm ³
sulfamidoisossazolo	0,1 γ/cm ³

Le piastre venivano poste a 37°C. e già dopo 48 ore si poteva rilevare lo sviluppo di microcolonie isolate; controllata la purezza delle colonie, venivano eseguite diverse subcolture, sempre su terreno solido, contenente la dose di partenza di antibatterico, in modo da ottenere mutanti sicuramente resistenti all'antibatterico in esame.

Le successive subcolture venivano eseguite in provette contenenti agar carota-fegato pH 6 e l'antibatterico a concentrazione gradualmente superiore.

Un grado elevato di resistenza omologa alla streptomicina e neomicina ($> 1.000 \gamma/\text{cm}^3$) si poteva ottenere in meno di 10 subcolture, dimostrando così il facile adattamento degli stipiti in esame a questi antibio-

tici, mentre per gli altri antibiotici e per i chemioterapici, occorre-
vano 20-30 subcolture per arrivare ai seguenti gradi di resistenza omologa:

penicillina	10 U/cm ³
cloramfenicolo	100 γ/cm ³
ossitetraciclina	100 γ/cm ³
clorotetraciclina	100 γ/cm ³
tetraciclina cloridrato	100 γ/cm ³
succinilsulfotiazolo	100 γ/cm ³
sulfamido tiazolo ametilato	100 γ/cm ³
sulfadiazina	100 γ/cm ³
sulfamerazina	100 γ/cm ³
sulfamidodimetilpirimidina	100 γ/cm ³
sulfamidoisossazolo	100 γ/cm ³

Nel corso delle nostre ricerche è stato rilevato come esista correlazio-
ne massima tra resistenza alla streptomina e neomicina e tra ossitetraci-
clina-clorotetraciclina-tetraciclina cloridrato.

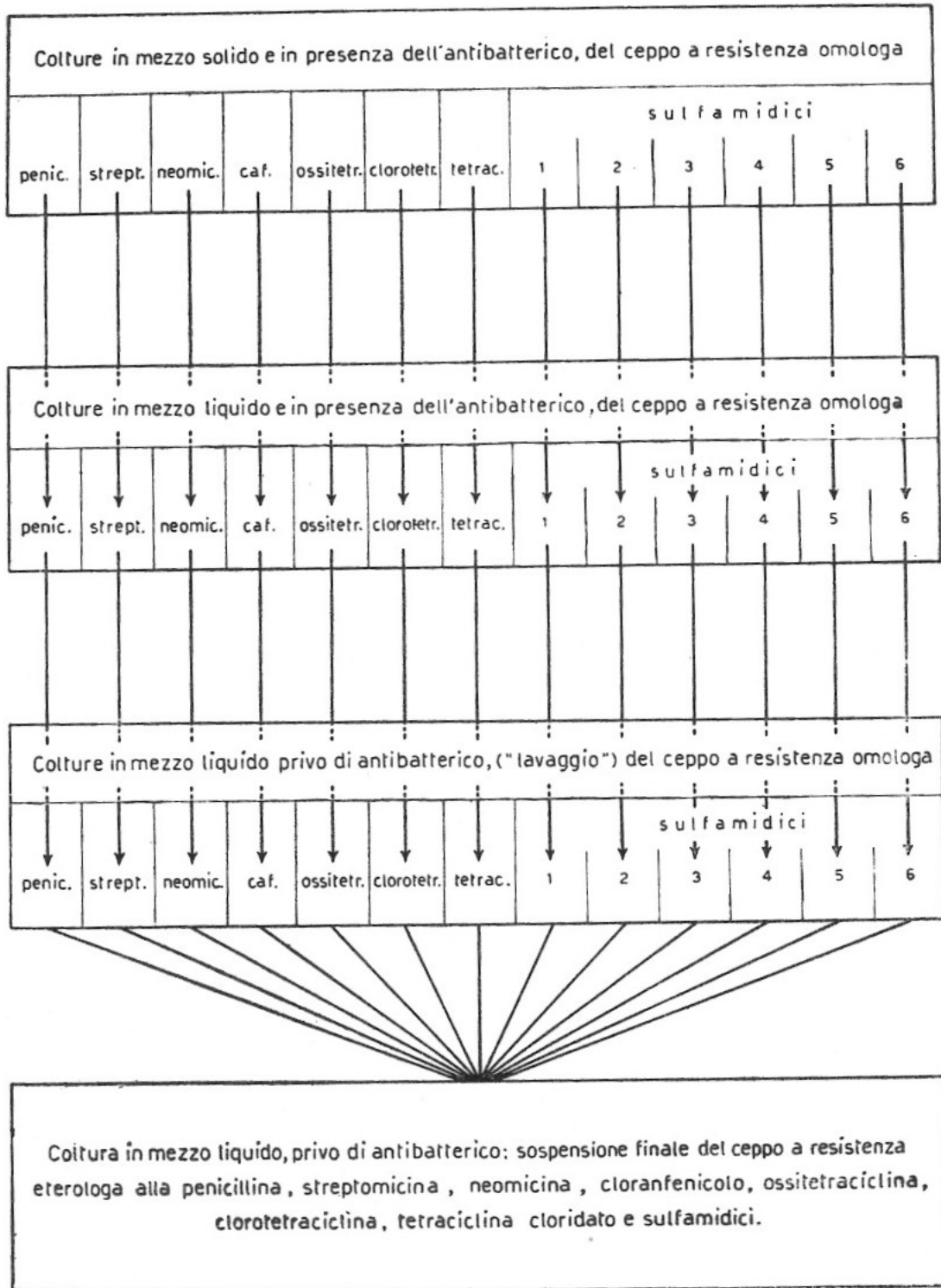
Gli stipiti resistenti venivano conservati in collezione su agar carota-
fegato pH 6 aggiunto del 10% di latte e dell'antibatterico alla dose massi-
ma di resistenza. I successivi passaggi venivano effettuati ogni 15-20
giorni.

La presenza del latte nel terreno colturale, permette il mantenimento
delle caratteristiche biochimiche del germe, e in particolare dell'attività
fermentativa.

Ottenuta quindi per un determinato stipite la resistenza omologa verso
ogni antibatterico considerato, si procedeva alla realizzazione di una so-
spensione microbica, costituita dal miscuglio delle mutanti a resistenza
omologa verso i singoli antibatterici. In tal modo la sospensione finale
risultava essere un miscuglio di lattobacilli a resistenza omologa, con fun-
zione eterologa, verso tutti gli antibatterici considerati.

Poichè la presenza di tracce di antibatterico nelle singole colture a
resistenza omologa, potrebbe far sorgere nel miscuglio delle popola-
zioni microbiche, stipiti a sensibilità collaterale verso qualche antibat-
terico, si procedeva, prima del miscuglio finale, al seguente accorgimento:
le colture a resistenza omologa verso i singoli antibatterici, prima di es-
sere mescolate tra di loro, vengono seminate su terreno colturale privo
di antibatterico, procedendo in tal modo ad un « lavaggio » della popo-
lazione microbica. Dopo tale passaggio, in terreno privo di antibatterico,

SCHEMA PER OTTENERE SOSPENSIONI MICROBICHE A RESISTENZA ETEROLOGA AGLI ANTIBATTERICI



si mescolano tra di loro le singole colture, ottenendo una sospensione finale a resistenza omologa con funzione eterologa (vedi schema).

Bisogna tener presente che è opportuno limitare al minimo i passaggi delle singole sospensioni a resistenza omologa nei terreni colturali privi di antibatterico (al massimo 2-3 subcolture), onde non causare diminuzione o perdita della resistenza.

CONCLUSIONI

Da quanto sopra riferito risulta che fino ad ora era possibile ottenere delle mutanti batteriche, naturali o indotte, a resistenza omologa verso gli antibiotici, mentre era molto più difficile ottenere mutanti doppio-resistenti o multiplo-resistenti, con un massimo di resistenza a quattro.

Seguendo invece la metodica sopra descritta, e applicando il sistema di « lavaggio » delle popolazioni microbiche a resistenza omologa, prima del miscuglio finale, è possibile ottenere una sospensione batterica a resistenza eterologa verso i sulfamidici e gli antibiotici impiegati.

Il cosiddetto « lavaggio » della sospensione microbica è risultato esse indispensabile, onde evitare fenomeni di sensibilità collaterale.

Tale procedimento, consistente nella realizzazione di un miscuglio di lattobacilli a resistenza omologa, ma con funzione eterologa verso gli antibatterici, può riuscire utile nella preparazione dei « fermenti lattici », intesi a limitare o evitare i danni provocati dalla somministrazione di antibiotici, relativi a dismicrobismo intestinale con conseguente stato B-disvitaminosico e impianto di miceti.

Inoltre, tale procedimento, estensibile a molti altri germi (*B. subtilis*, *E. coli*, ecc.), può trovare applicazione pratica nei casi in cui i germi debbono esplicare la loro azione fermentativa in presenza di antibiotici.

Per esempio, è noto che le bovine affette da mastite infettiva e trattate con antibiotici, danno un latte contenente antibiotici, in quantità sufficiente per uccidere i lattobacilli.

L'impiego di tale latte, nella fabbricazione di formaggi freschi, yogurt, ecc., sarà solo possibile usando come « inoculum » lattobacilli a resistenza eterologa agli antibiotici.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ENGLISH A. R. e MCCOY E. - J. Bact., 62: 49 (1951).
- (²) SAZ A. W. e coll. - J. Bact., 63: 543 (1952).
- (³) CHABBERT J. - Presse Med., 60: 1683 (1952).
- (⁴) HAAS F. L. e coll. - J. Bact., 63: 354 (1953).
- (⁵) HOTCHKISS R. D. - cit. da WYSS O. - Bacter. Rev., 17: 47 (1953).
- (⁶) SEVAG M. G. - Rec. Progr. Med., 46: 432 (1954).
- (⁷) SAKAKIBARA E. e GUILLOT N. - Compt. Rend. Soc. Biol., 147: 1977 (1953).
- (⁸) CANNELLA A. - Giorn. Batt. Immun., 45: 231 (1953).
- (⁹) ALEXANDER H. E. - Antibiot. Malad. Enfance, 197 (1952).
- (¹⁰) VAISMAN A. e HENRY-EVENO J. - Rev. Immunol., 48: 485 (1954).
- (¹¹) WRIGHT S. S. e coll. - J. Labor. Clin. Med., 42: 877 (1953).

- (12) MAYR-HARTING A. - J. Gen. Microb., 13: 9 (1955).
- (13) LINZ R. e coll. - Compt. Rend. Soc. Biol., 143: 726-728-577-987-1138-1140-1278-1279 (1949).
- (14) GEZON H. M. e COLLINS G. R. - Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., 84: 269 (1952).
- (15) WELSCH M. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 16/Sp. Nr.: 216 (1953).
- (16) WELSCH M. - Compt. Rend. Soc. Biol., 143: 1282 (1949).
- (17) WELSCH M. - Boll. Org. Mond. San., 6: 173 (1952).
- (18) CIPPELLINI A. - Boll. Ist. Sierot. Mil., 33: 236 (1954).
- (19) BELYANSKI M. - Ann. Inst. Pasteur, 84: 402 (1953).
- (20) MAYOUX R. e coll. - Presse Med., 61: 1398 (1953).
- (21) LE MOANS M. G. - Ann. Pharm. Franc., 11: 383 (1953).
- (22) LEVADITI C. e HENRY-EVENO J. - Ann. Inst. Pasteur 85: 108 (1953).
- (23) SMOLENS J. e VOGT A. B. - J. Bact., 66: 140 (1953).
- (24) ANGELUCCI R. e DEFRANCESCHI A. - Nuovi Ann. Ig. Micr., 5: 291 (1953).
- (25) BACHRACH E. e GUILLOT N. - Compt. Rend. Soc. Biol., 148: 1004 (1954).
- (26) BACHRACH E. e GUILLOT N. - Compt. Rend. Soc. Biol., 147: 1977 (1953).
- (27) BARBER M. - Brit. Med. J., 2: 863 (1947).
- (28) BARBER M. e ROZWADOWSKA-DOWZENKO M. - Lancet, 254: 641 (1948).
- (29) HAIGHT T. H. e FINLAND M. - Proc. Exp. Biol. Med., 81: 175 (1952).
- (30) HAIGHT T. H. e FINLAND M. - Proc. Exp. Biol. Med., 81: 183 (1952).
- (31) HAIGHT T. H. e FINLAND M. - Proc. Exp. Biol. Med., 81: 188 (1952).
- (32) ROUNTREE P. M. e THOMPSON E. F. - Lancet, 263: 262 (1952).
- (33) FUSILLO M. H. e coll. - Antib. Chemother., 3: 581 (1953).
- (34) SCURO L. A. e ORTONA L. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 29: 1739 (1953).
- (35) ORTONA L. - Policlinico Sez. Prat., 60: 1265 (1953).
- (36) SZYBALSKI W. e BRYSON V. - J. Bact., 64: 489 (1952).
- (37) CURATOLA G. e DEL CAMPO A. - Nuovi Ann. Ig. Micr., 5: 424 (1954).
- (38) CURATOLA G. e DEL CAMPO A. - Nuovi Ann. Ig. Micr., 5: 432 (1954).
- (39) MACCACARO G. A. e DORDI F. - Boll. Ist. Sierot. Mil., 33: 379 (1954).
- (40) CAVALLI SFORZA L. L. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 16/Sp. Nr.: 232 (1953).
- (41) LEVADITI C. e HENRY-EVENO J. - Rev. Immunol., 17: 1 (1953).
- (42) MONNIER J. - Antibiot. Malad. Enfance, 201 (1952).
- (43) WRIGHT S. S. e coll. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85: 128 (1954).
- (44) DE CARLI L. - Boll. Ist. Sierot. Mil., 34: 225 (1955).
- (45) SCURO L. A. e ORTONA L. - Boll. Ist. Sierot. Mil., 33: 209 (1954).
- (46) VON LORCH L., NEGRI R. - Rend. Ist. Sup. San., (in corso di stampa).
- (47) SELLA F. - Boll. Ist. Sierot. Mil., 33: 421 (1954).
- (48) CHINI V. e DI RAIMONDO F. - La Ricerca Sc. 23: 215 (1953).
- (49) DI RAIMONDO F. e coll. - Int. Zschf. Vitaminforsch., 24: 276 (1952).
- (50) DI RAIMONDO F. e coll. - Rev. Intern. Vitamin., 25: 407 (1953).
- (51) DI RAIMONDO F. e ANGARANO D. - Int. Zschf. Vitaminforsch., 24: 302 (1955).
- (52) DI RAIMONDO F. e coll. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 27: 1608 (1955).
- (53) DI RAIMONDO F. e coll. - Int. Zschf. Vitaminforsch., 24: 294 (1952).
- (54) FIDANZA A. e coll. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 30: 979 (1954).
- (55) LEPPER M. H. e coll. - AMA Arch. Int. Med., 88: 271 (1951).
- (56) LEPPER M. H. e coll. - AMA Arch. Int. Med., 88: 284 (1951).
- (57) LUCHERINI T. e SCHIAVETTI C. - Policlinico Sez. Prat., 54: 65 (1948).
- (58) MALAGUZZI VALERI C. - Rec. Prog. Med., 9: 37 (1951).
- (59) PAOLANTONIO U. e SULLI G. - Fisiol. Med., 16: 219 (1948).
- (60) PAOLANTONIO U. e SULLI G. - Fisiol. Med., 16: 215 (1948).
- (61) SARETT P. - J. Nutr., 47: 275 (1952).
- (62) SBOROV V. M. e coll. - J. Lab. Clin. Med., 37: 52 (1951).
- (63) TENTORI L. e VIVALDI G. - Proc. Int. Soc. Hematology, 170: 49 (1950).
- (64) NEGRI R. e PRINCIVALLE M. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 19: 168 (1956).