FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:

GLI ANTIBIOTICI NELLA PRATICA VETERINARIA

BRESCIA - 30 MAGGIO 1980

4

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:
GLI ANTIBIOTICI NELLA PRATICA VETERINARIA

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1979 - Infezioni Respiratorie del Bovino

1980 - L'oggi e il domani della Sulfamidoterapia Veterinaria

1980 - Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA
Brescia - Via Bianchi, 7

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:
GLI ANTIBIOTICI
NELLA PRATICA VETERINARIA

Brescia: 30 maggio 1980

Edito a cura della

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - Marzo 1981

Stampa: La Nuova Cartografica - Brescia

INDICE

PARTE PRIMA

L. NARDELLI: Introduzione . . . . . pag. 9
S. CASTELLI: Antibiotici: classificazione, natura, origine, spettro d'azione . . . . . » 11
G.C. SCHITO: Metodiche per la determinazione *in vitro* della sensibilità batterica agli antibiotici: significato e limiti . . » 35
F. GIANELLI: La resistenza dei batteri agli antibiotici ed ai chemioterapici . . . . . » 47
S. CARLI: Antibiotici di maggior impiego in medicina veterinaria. Meccanismi d'azione e cenni di farmacocinetica . . » 93
F. MONTI e C. GIRARDI: Tossicità locale e generale degli antibiotici ed effetti collaterali . . . . . » 107
S. MALETTO: Antibiotici negli alimenti di origine animale e salute umana . . . . . » 125
G. BALLARINI: Terapia chemio-antibiotica e protezione della salute umana . . . . . » 137
Discussione . . . . . » 153

PARTE SECONDA

M. VENTUROLI: Principî generali di terapia antibiotica . . » 173
S. PASCUCCI: Indicazioni, modalità di somministrazione e dosaggio degli antibiotici nei volatili . . . . . » 195
L. SIDOLI e G. BARIGAZZI: Indicazioni, modalità di somministrazione e dosaggio degli antibiotici nei suini . . . . » 199
G. C. PRATI: Indicazioni, modalità di somministrazione e dosaggio degli antibiotici nei bovini . . . . . » 213
A. BIGNARDI: Indicazioni, modalità di somministrazione e dosaggio degli antibiotici nella terapia delle mastiti . . . » 219
Discussione . . . . . » 223

RELATORI

Prof. G. Ballarini
Istituto di Clinica Medica Veterinaria. Parma.

Dott. G. Barigazzi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Sezione di Parma.

Dott. A. Bignardi
Medico Veterinario Condotto. Castenaso (BO).

Dott. S. Carli
Istituto di Farmacologia, Tossicologia e Terapia Sperimentale Veterinaria. Milano.

Dott. S. Castelli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Brescia.

Prof. F. Gianelli
Istituto di Microbiologia. Facoltà di Veterinaria. Parma.

Dott. C. Girardi
Istituto di Clinica Medica Veterinaria. Torino.

Prof. S. Maletto
Istituto di Zootecnia. Facoltà di Veterinaria. Torino.

Prof. F. Monti
Istituto di Clinica Medica Veterinaria. Torino.

Prof. S. Pascucci
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombradia e dell'Emilia. Sezione di Forlì.

Dott. G. C. Prati
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Sezione di Bologna.

Prof. G. C. Schito
Istituto di Microbiologia. Facoltà di Medicina e Chirurgia. Parma.

Dott. L. Sidoli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Sezione di Parma.

Prof. M. Venturoli
Istituto di Patologia Speciale e Clinica Medica Veterinaria. Bologna.

L. NARDELLI

INTRODUZIONE

L'importanza degli antibiotici, per il trattamento delle malattie degli animali, in questi ultimi tempi non è più così indiscussa come lo era anni or sono.

Questa sensazione sta creando un certo disorientamento fra i colleghi pratici anche se ancor'oggi il consumo di antibiotici nella pratica veterinaria è sempre notevole.

Si è ritenuto opportuno organizzare questa giornata di studio al fine di mettere a fuoco le varie problematiche che possono essere all'origine della presunta diminuzione di efficacia degli antibiotici. Si vuole fare un'attenta disamina sia per escludere eventuali errori nell'applicazione, spesso indiscriminata e irrazionale, e nello stesso tempo chiarire con l'obiettività eventuali zone d'ombra d'altri fenomeni capaci di influenzare negativamente sul successo della terapia antibiotica delle malattie degli animali causate da batteri, leptospire, micoplasmi, clamidie, toxoplasmi, miceti.

Prima di invitare i Relatori a prendere la parola vorrei ricordare sinteticamente che i concetti guida, seguiti nella organizzazione delle giornate di studio della Scuola, sono i seguenti:

1. - i Relatori presentano una sintesi per il settore di competenza che vuole essere non una trattazione completa ma che vuole sottolineare soprattutto i problemi di maggiore attualità al fine di dare lo spunto ad una discussione generale successiva.

   Al fine di permettere questa i Relatori sono pregati di presentare la loro sintesi strettamente nei tempi assegnati.

2. - tutti gli invitati sono cordialmente ed insistentemente invitati a

prendere la parola nella discussione. Si vuole ottenere una discussione, la più ampia possibile, da parte di tutti i presenti. Questo è il motivo della partecipazione su invito.

3. - i Relatori e tutti coloro che presenteranno interventi sono pregati di lasciare i testi, delle rispettive relazioni ed interventi, con il nome, qualifica, indirizzo, al coordinatore.

Ringrazio fin d'ora per la collaborazione che tutti vorranno dare.

S. CASTELLI

ANTIBIOTICI: CLASSIFICAZIONE, NATURA, ORIGINE E SPETTRO D'AZIONE

Premessa

Dal punto di vista etimologico il termine « antibiosi », coniato verso la fine del secolo scorso, ha un significato molto ampio e sta ad indicare il fenomeno per cui un essere vivente arreca danno ad altri esseri viventi, di specie diversa, nell'ambito della lotta per l'esistenza.

Opportunamnte limitato, rispetto al suo significato originario, il termine è stato riesumato ed oggi per antibiotico intendiamo « le sostanze che, prodotte da microrganismi, hanno la capacità, spesso a concentrazioni estremamente basse, di inibire la crescita o anche di distruggere batteri o altri microrganismi » (Waksman).

Questa definizione, generalmente accettata, evidenzia anche la differenza fra antibiotici e chemioterapici, ottenuti da microrganismi i primi, per sintesi chimica i secondi, attivi i primi a concentrazioni dell'ordine di microgrammi per millilitro, i secondi a concentrazioni anche mille volte superiori.

Nella classificazione degli antibiotici si possono seguire diversi criteri più o meno congeniali a chi parla o scrive in rapporto alla sua specifica competenza. Così, secondo il microbiologo, essi andrebbero suddivisi in base alla loro provenienza cioè alla sistematica dei microrganismi che li producono; secondo il clinico in base allo spettro d'azione e quindi alle caratteristiche farmaco-terapeutiche; secondo il chimico infine in base alla loro struttura.

In questa breve trattazione, in cui si è dato notevole rilievo ai caratteri chimico-fisici, si seguirà quest'ultimo criterio.

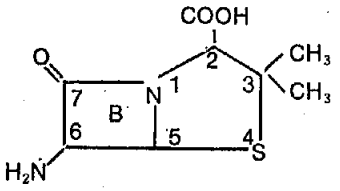
Gli antibiotici che hanno avuto maggiore utilizzazione nella pratica veterinaria verranno pertanto suddivisi nei seguenti gruppi:

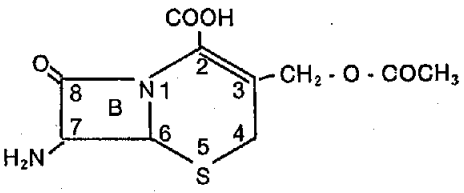
1) antibiotici β-lattamici

2) gruppo delle tetracicline
3) antibiotici aminoglicosidici
4) antibiotici polipeptidici
5) antibiotici macrolidici
6) antibiotici vari.

1 - *ANTIBIOTICI β-LATTAMICI*

Questi antibiotici si possono considerare derivati dagli acidi 6-aminopenicillanico e 7-amino cefalosporanico.





ac. 6-aminopenicillanico
B = anello β-lattamico

ac. 7-amino cefalosporanico

Entrambi questi acidi contengono nella loro molecola un anello β-lattamico legato ad un nucleo tiazolidinico nell'acido penicillanico e ad un nucleo diidrotiazinico nell'acido cefalosporanico.

Dall'acido 6-aminopenicillanico derivano le penicilline, dall'acido 7-amino cefalosporanico le cefalosporine.

1 - A - *PENICILLINE*

Si distinguono in *penicilline originarie o naturali, penicilline biosintetiche* e *penicilline semisintetiche.*

Le prime sono i prodotti non modificati del metabolismo di alcuni miceti, in modo particolare di *Penicillum notatum* e *P. chrysogenum.*

Le seconde sono i prodotti di una sintesi biologica operata dal microrganismo in seguito all'aggiunta di particolari sostanze chimiche, dette precursori, al brodo nutritivo. Le terze traggono origine da una

sintesi effettuata in laboratorio partendo dal nucleo fondamentale di tutte le penicilline e cioè dall'acido 6-amino penicillanico ottenuto per via biologica.

Penicillina G o benzilpenicillina

È la principale penicillina naturale detta benzilpenicillina perché al gruppo aminico in posizione 6 è legato un gruppo benzilico.

Come tutte le penicilline ha carattere acido e come tale è insolubile in acqua ed estremamente labile. In pratica si usano i suoi sali di sodio o di potassio, ben solubili in acqua e dotati di buona stabilità allo stato secco (oltre 5 anni) e discreta in soluzione. Soluzioni acquose tamponate a pH compresi fra 4,5 e 7 e alla temperatura di 4°, in 20 giorni hanno un calo in titolo di circa il 5%, a pH acidi o alcalini si ha rapida inattivazione.

Alcuni microrganismi, in modo particolare gli stafilococchi e gli enterococchi, producono un enzima (penicillinasi) in grado di aprire l'anello lattamico trasformando la penicillina in acido penicilloico inattivo.

Somministrata per via parenterale la penicillina G ha una azione estremamente fugace: concentrazioni terapeuticamente efficaci persistono al massimo per 2-3 ore.

Livelli ematici più persistenti si possono ottenere utilizzando alcuni sali della penicillina G quali la *penicillina procaina* e la *benzatin-penicillina.* Si tratta di sostanze scarsamente solubili in acqua e notevolmente stabili sia allo stato secco che in sospensione.

L'attività delle penicilline si esprime in Unità Internazionali (U.I.). La penicillina G sodica, la penicillina G potassica, la penicillina procaina e la benzatin-penicillina hanno rispettivamente i seguenti titoli espressi in U.I./mg: 1670 - 1595 - 1000 e 1050.

Penicilline acido stabili

Hanno il notevole vantaggio di poter essere somministrate per via orale. Comprendono la fenossimetil penicillina o penicillina V, la fenossietil penicillina, la fenossibenzil penicillina. Non trovano, per quanto mi risulta, vasta applicazione in campo veterinario, salvo nella clinica dei piccoli animali.

Penicilline resistenti alla penicillinasi

Sono penicilline semisintetiche in cui l'introduzione di opportuni radicali ha stabilizzato l'anello β-lattamico, forse per impedimento sterico. Sono la meticillina e le tre isoxazolilpenicilline: oxacillina, cloxacillina, dicloxacillina. Salvo la meticillina, queste penicilline sono anche acido stabili. Sono ben solubili in acqua, ma scarsamente stabili in soluzione.

Le penicilline sono antibiotici a spettro di azione ristretto, ma dotate di azione molto intensa sui germi sensibili. Esse agiscono da batteriostatiche sui microrganismi in fase di moltiplicazione e per concentrazioni 3 - 10 volte superiori a quella inibente manifestano azione battericida. Rappresentano gli antibiotici di elezione nelle infezioni sostenute da microrganismi Gram positivi.

Particolarmente sensibili sono streptococchi, stafilococchi, corinebatteri, clostridi, *E. rhusiopathiae, B. anthracis, B. subtilis, Actinomyces bovis*: Concentrazione Minima Inibente (C.M.I.) 0,005 - 0,1-1 mcg/ml.

Meno sensibili sono gli streptococchi fecali (C.M.I. 0,3 - 12,5 mcg/ml) e il *Corynebacterium equi* (C.M.I. 8 - 10 mcg/ml).

Fra i Gram negativi buona sensibilità dimostrano gli emofili e le neisserie. Le pasteurelle hanno un comportamento variabile: alcune rispondono a concentrazioni di 0,1 mcg/ml, altre richiedono concentrazioni anche superiori a 100 mcg/ml.

Le leptospire sono ben sensibili *in vitro, in vivo* si ottengono soddisfacenti risultati solo se il trattamento è precoce; comportamento analogo hanno *Sphaerophorus necrophorus e S. nodosus*. Le clamidie dell'aborto enzootico ovino e dell'encefalomielite bovina, sensibili *in vitro,* danno scarsi e dubbi risultati *in vivo.*

Penicilline a spettro di azione modificato

L'introduzione di particolari raggruppamenti chimici nella molecola delle penicilline naturali ha condotto, come abbiamo visto, alla produzione di penicilline biosintetiche o semisintetiche dotate di più favorevoli caratteristiche chimiche e farmacologiche. Alcune modifiche della struttura molecolare hanno indotto una variazione nello spettro di azione.

Il primo antibiotico di questo gruppo è l'*ampicillina* la cui attività si estende anche a diversi Gram negativi fra cui:

Haemophilus influenzae con C.M.I. variante fra 0,2 e 0,4 mcg/ml;

Proteus vulgaris, il 30-50% dei ceppi risultano sensibili, C.M.I. 0,8-5 mcg/ml;

Proteus mirabilis, il 60-85% dei ceppi risultano sensibili, C.M.I. 0,8-5 mcg/ml;

Salmonella, C.M.I. 2-4 mcg/ml circa;

E. coli, il 50-90% dei ceppi risultano sensibili, C.M.I. 2,5-6,2 mcg/ml;

meno sensibili sono i coli enteritogeni e i coliformi.

Risultano resistenti *Proteus morganii* e *Proteus rettgeri.*

L'attività sui Gram positivi è analoga a quella della penicillina G, ma meno intensa se escludiamo gli streptococchi fecali che dimostrano buona sensibilità.

L'ampicillina ha una buona acido-stabilità (possibilità di somministrazione orale), ma non resiste alla penicillinasi. Comportamento del tutto analogo all'ampicillina presenta l'*etacillina.* La *carbenicillina* ha una attività sovrapponibile a quella dell'ampicillina sui Gram positivi, ma meno intensa specie sugli streptococchi fecali. Sui Gram negativi agisce bene anche dove l'ampicillina fallisce e cioè su *Pseudomonas aeruginosa, Proteus morganii* e *Proteus rettgeri.*

È un antibiotico scarsamente resistente in ambiente acido, viene rapidamente inattivato dalla penicillinasi stafilococcica, mentre è più resistente dell'ampicillina rispetto alle β-lattamasi da *Pseudomonas* e *Proteus.* Il suo uso in medicina veterinaria è però ostacolato dal prezzo elevato.

L'amoxicillina è di questa più stabile in ambiente acido e, somministrata per via orale, consente di raggiungere livelli ematici notevolmente più elevati.

1 - B - *CEFALOSPORINE*

Sono sostanze chimicamente molto simili alle penicilline, caratterizzate dalla presenza di un anello β-lattamico-diidrotiazinico. Vengono ottenute mediante processi di semisintesi partendo dall'acido 7-

amino-cefalosporanico prodotto per via biologica da ceppi di *Cefalosporium.*

Di fronte alle numerose cefalosporine usate in medicina umana, solo la *cefalotina,* la *cefaloridina* e la *cefazolina* hanno avuto qualche applicazione in medicina veterinaria, nella clinica dei piccoli animali.

Si tratta di sostanze ben solubili in acqua, ma scarsamente stabili in soluzione acquosa. Presentano uno spettro di azione simile a quello dell'ampicillina cioè esteso a numerosi Gram negativi. Buona è l'attività su streptococchi, stafilococchi, clostridi, corinebatteri, *B. anthracis,* neisserie, coli e salmonelle. Mediocremente sensibili risultano streptococchi fecali, emofili, protei e klebsielle. Resistenti sono *Aerobacter aerogenes,* molti ceppi di *Proteus, Pasteurella* e *Pseudomonas.* Resistono alle β-lattamasi stafilococciche; sono però inattivate dalle β-lattamasi elaborate da Gram negativi. Sono dotate di azione batteriostatica, ma già a concentrazione doppia o tripla di quelle terapeuticamente utili manifestano azione battericida.

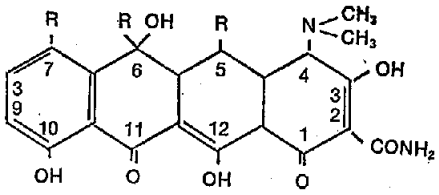
2 - *GRUPPO DELLE TETRACICLINE*

Col termine tetracicline si designa un gruppo di antibiotici caratterizzati dalla presenza del nucleo tetraciclico del naftacene.

In campo veterinario vengono largamente utilizzati solo tre antibiotici del gruppo e precisamente la *clorotetraciclina,* la *ossitetraciclina* e la *tetraciclina.* Impiego più limitato hanno trovato *rolitetraciclina, metaciclina* (nel trattamento della malattia respiratoria cronica) e *demetilclorotetraciclina.*

La clorotetraciclina e la demetilclorotetraciclina sono state isolate da colture di *Streptomyces aureofaciens,* la ossitetraciclina da colture di *Streptomyces rimosus,* la tetraciclina può essere ottenuta per via chimica dalla clorotetraciclina o isolata da colture di *Streptomyces viridifaciens.* La rolitetraciclina e la metaciclina sono prodotti di semisintesi.

La struttura chimica di base che risulta dalla formula, è la stessa per i diversi antibiotici. La clorotetraciclina porta in posizione 7 un atomo di Cl, la ossitetraciclina in posizione 5 un ossidrile, nella rolitetraciclina un atomo di idrogeno del gruppo carboamidico è sostituito da un raggruppamento metil-pirrolidinico, nella demetilclorotetraci-



Struttura base delle tetracicline

clina manca il metile in posizione 6, nella metaciclina al posto del metile e dell'ossidrile in 6 vi è un gruppo metilenico e un ossidrile in 5.

Le tetracicline sono sostanze di colore giallo a carattere anfotero, formano cioè sali sia con le basi che con gli acidi. In campo farmaceutico si utilizza frequentemente il cloridrato che è discretamente solubile in acqua.

Allo stato secco la stabilità è molto buona, in soluzione dipende dal pH. La maggiore stabilità si riscontra a pH acido, ma è comunque sempre limitata.

Esiste in commercio una soluzione di ossitetraciclina stabilizzata a pH alcalino in presenza di sali di magnesio che può essere conservata a temperatura ambiente per oltre due anni.

La solubilità in acqua delle basi libere è molto limitata (da 0,5 a 1,5 mg/ml) più solubili sono i cloroidrati (da 6 a 10 mg/ml). Molto solubile è la rolitetraciclina.

Per quanto le tetracicline vengano prevalentemente impiegate nelle infezioni da batteri Gram negativi, lo spettro di azione è molto ampio.

Alle concentrazioni raggiungibili *in vivo* esplicano azione batteriostatica sui microrganismi in fase di attiva moltiplicazione, sia extra che intracellulari. Quest'ultima possibilità è stata dimostrata clinicamente in infezioni da brucelle, rickettsie e clamidie.

A concentrazioni inferiori a 1 mcg/ml sono sensibili la maggior parte dei ceppi di stafilococco aureo, streptococchi, brucelle, *B. subtilis, B. anthracis,* clostridi, emofili; a concentrazioni comprese tra 1 e 10 mcg/ml pasteurelle, salmonelle, escherichie, corinebatteri, actinomiceti. Concentrazioni fra 10 e 100 mcg/ml sono a volte in grado di

inibire lo sviluppo di alcuni ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris*. Lo spettro di azione comprende inoltre *Actinobacillus equuli*, leptospire, micoplasmi, rickettsie e clamidie.

Il pH ottimale è lievemente acido (6,1-6,6), a pH di 7,3-7,5 l'attività si riduce in modo apprezzabile.

Le caratteristiche farmacologiche delle diverse tetracicline sono praticamente sovrapponibili salvo qualche lieve differenza di ordine farmacocinetico.

Il vastissimo impiego di questi antibiotici in medicina veterinaria, a scopo terapeutico e zootecnico, ha determinato lo sviluppo di una estesa resistenza in microrganismi originariamente sensibili per cui, prima di iniziare un trattamento terapeutico, è consigliabile un controllo della sensibilità mediante antibiogramma.

L'attività delle tetracicline viene espressa in unità di peso cioè in mcg/mg. Gli standards internazionali hanno la seguente potenza:

clorotetraciclina cloridrato	1000	mcg/mg
tetraciclina cloridrato	982	»
ossitetraciclina base biidrata	880	»
rolitetraciclina	996	»
demetilclorotetraciclina	1000	»
metaciclina	924	»

I prodotti F.U. non devono avere un'attività inferiore al 95% del teorico.

È infine utile tener presente che le tetracicline in presenza d'umidità o in soluzione possono formare prodotti di degradazione inattivi e notevolmente tossici.

3 - *ANTIBIOTICI AMINOGLICOSIDICI (A.G.)*

Il nome di questo gruppo di antibiotici deriva dal fatto che nella loro molecola sono presenti uno o più aminozuccheri, legati a un nucleo deossistreptaminico.

Oltre ad analogie di tipo chimico-strutturale altre caratteristiche comuni sono: simile spettro di azione, fenomeni di resistenza crociata, non indifferente oto e nefrotossicità.

In medicina veterinaria hanno trovato impiego, più o meno vasto: *streptomicina, diidrostreptomicina, neomicina, kanamicina, paromomicina, gentamicina* e *spectinomicina.*

Questo gruppo di antibiotici si è arricchito, in epoca recente, di nuovi composti che, in seguito ad opportune « manipolazioni molecolari », dovrebbero presentare minore tossicità, più intensa attività e maggior resistenza all'azione degli enzimi batterici capaci di inattivarli.

Queste modifiche strutturali mirano infatti ad aumentare l'*uptake* dell'antibiotico da parte della cellula batterica, ridurre l'affinità degli A.G. per i mucopolisaccaridi acidi presenti nelle strutture renali e nell'orecchio interno (nefro e ototossicità) ed infine eliminare quei raggruppamenti chimici che costituiscono il substrato su cui agiscono gli enzimi inattivanti (fosfotransferasi, nucleotidiltransferasi, acetiltransferasi).

Dato l'attuale scarso o nullo utilizzo di questi nuovi composti in medicina veterinaria ci si limiterà, a scopo informativo, a citare qualche nome: *Amikacina, Tobramicina, Dibekacina* del gruppo della Kanamicina; *Sisomicina, Netilmicina, Sagamicina* del gruppo della Gentamicina; *Lividomicina, Rinostamicina, Butirosina* del gruppo della Neomicina.

Streptomicina

Isolata nel 1943 da colture di *Streptomyces griseus.* Si tratta di una sostanza di natura basica utilizzata quasi esclusivamente sotto forma di solfato. Questo sale si presenta come una polvere bianca, cristallina, inodore, di sapore leggermente amaro.

È molto solubile in acqua, praticamente insolubile nei solventi organici. La potenza teorica di 1 mg di solfato corrisponde a 780 mcg di attività. Allo stato secco è molto stabile: almeno due anni senza perdita di attività, in soluzione tamponata a pH compreso tra 6 e 8 e a temperatura ambiente è conservabile per circa 1 mese.

Numerose sono le incompatibilità di tipo chimico dovute ad agenti ossidanti e riducenti, nitrati, lattati, fosfati, citrati, magnesio, calcio ecc., di cui si deve tener conto nella formulazione di preparazioni farmaceutiche.

Lo spettro di azione comprende i Gram negativi e numerosi Gram

positivi. Fra i primi si dimostrano particolarmente sensibili brucelle, emofili, klebsielle, pasteurelle, la maggior parte delle salmonelle e una buona percentuale di coli e neisserie (C.M.I. da 1 a 10 mcg/ml). Scarsamente sensibili sono protei e pseudomonas. Fra i Gram positivi rispondono bene corinebatteri, listerie, micobatteri tubercolari, *B. anthracis* (C.M.I. da 1 a 10 mcg/ml). Fra i Gram positivi esiste tuttavia una notevole percentuale di forme coccacee resistenti, in modo particolare fra gli streptococchi fecali. Sempre a concentrazioni varianti da 1 a 10 mcg/ml risultano inibiti anche actinomiceti e *Nocardia asteroides*. I clostridi sono resistenti. Il pH ottimale di attività è compreso fra 7,5 e 8. Alle concentrazioni che si possono raggiungere *in vivo* esplica azione batteriostatica, più intensa su microrganismi in fase di attiva proliferazione e solo in sede extracellulare.

Non viene riassorbita dalla parete del tubo digerente per cui la somministrazione per via orale può manifestare solo azione locale.

Diidrostreptomicina

Prodotto di riduzione catalitica della streptomicina (una funzione aldeidica viene ridotta ad alcolica) presenta le stesse caratteristiche della streptomicina, uniche differenze riguardano la stabilità e la tossicità. La diidrostreptomicina risulta lievemente più stabile: in soluzione acquosa a pH compreso tra 4 e 7 ed a temperatura ambiente può essere conservata per circa due mesi, è più tossica per la branca vestibolare. La potenza teorica di 1 mg di diidrostreptomicina solfato corrisponde a 760 mcg di attività.

Neomicina B (sinonimo : framicetina)

Nel 1949 da colture di *Streptomyces fradiae* sono state isolate tre sostanze di natura basica, denominate neomicina A, B e C. Il prodotto del commercio è costituito quasi totalmente dalla neomicina B sotto forma di solfato. 1 mg di neomicina solfato corrisponde a circa 650 mcg di attività. Si tratta di una polvere biancastra, igroscopica e fotosensibile, ben solubile in acqua, scarsamente solubile o insolubile nei solventi organici. Sia allo stato secco che in soluzione acquosa presenta un'ottima stabilità.

Come per la streptomicina, esistono numerose sostanze con cui

è incompatibile e che ne riducono in modo apprezzabile l'attività. Fra queste ricordiamo la cisteina, il glucosio, i cloruri, i fosfati, i peptoni, il ferro, l'alluminio e il magnesio.

Lo spettro di azione comprende cocchi e batteri Gram negativi esclusi *Pseudomonas* e *Proteus* in gran parte resistenti, fra i cocchi Gram positivi risultano sensibili, per concentrazioni comprese fra 0,5 e 10 mcg/ml, gli stafilococchi. Sono resistenti la maggior parte degli streptococchi, specie i fecali. I micobatteri tubercolari rispondono a concentrazioni varianti da 2 a 10 mcg/ml.

L'attività è più intensa a pH moderatamente alcalino (optimum 7,8), è prevalentemente batteriostatica, ma per piccoli aumenti di concentrazione diviene battericida e si manifesta anche su microrganismi allo stato di riposo.

Kanamicina

Nel 1955 da colture di *Steptomyces kanamyceticus,* sono stati isolati tre composti indicati con le lettere A, B e C. Il composto B è particolarmente tossico. Il prodotto commercializzato è costituito per il 98% dal componente A, in genere sotto forma di solfato.

Questo sale ha un colore variante dal bianco al giallo pallido, è ben solubile in acqua e praticamente insolubile nei solventi organici. 1 mg di kanamicina solfato corrisponde a 800 mcg di attività. È dotata di ottima stabilità sia allo stato secco che in soluzione acquosa, specie a pH variante tra 6 e 8.

Lo spettro di azione include cocchi e batteri Gram negativi, compresi diversi ceppi di *Proteus vulgaris,* pseudomonas esclusi; fra i cocchi Gram positivi rispondono bene gli stafilococchi (C.M.I. da 0,5 a 15 mcg/ml), sono resistenti gli streptococchi. Buona la sensibilità dei micobatteri. L'azione è batteriostatica, più intensa su microrganismi in fase di moltiplicazione e solo in sede extracellulare, diviene battericida per moderati aumenti di concentrazione (2 - 4 - 6 volte) raggiungibili anche *in vivo.*

Il pH ottimale di attività si ha a 7,6 - 8, già a pH 7,2 occorrono, per la stessa risposta, concentrazioni doppie e a pH 6,7 concentrazioni quadruple.

Paromomicina (sinonimi: Aminosidina - Catenulina)

Isolata nel 1959 da colture di *Streptomyces rimosus paromomycinus*.

Si tratta di una sostanza di natura basica ben solubile in acqua e scarsamente solubile nei solventi organici. Viene commercializzata sotto forma di solfato. 1 mg di solfato corrisponde a circa 750 mcg di base. Lo spettro di attività è molto simile a quello della Neomicina e della Kanamicina. Per i cocchi e i batteri Gram negativi la C.M.I. oscilla da 1 a 25 mcg/ml, fra i cocchi Gram positivi sono sensibili gli stafilococchi (C.M.I. fra 0,8 e 10 mcg/ml). Alcuni protozoi risultano abbastanza sensibili alla paromomicina (*Entamoeba histolytica, Trichomonas vaginalis* e *T. foetus*). Dimostra azione batteriostatica che diviene battericida per aumenti di concentrazione di 1-15 volte. Somministrata per via parenterale è notevolmente oto e nefrotossica.

Gentamicina

Isolata nel 1963 da colture di *Micromonospora purpurae* e *M. echinospora*. Si tratta di un complesso basico costituito da numerosi componenti di cui i principali sono indicati con le lettere A-B-C_1-C_2-D.

Il prodotto del commercio è costituito quasi integralmente dalle frazioni C_1 e C_2 sotto forma di solfato. Il titolo di questo sale varia in modo abbastanza sensibile, non deve essere comunque inferiore a 590 mcg/mg. La solubilità è buona in acqua, in formamide e in glicole etilenico, scarsa o nulla in altri solventi organici.

Elevata è la stabilità sia allo stato secco che in soluzione che può venire riscaldata a 100° senza perdere di titolo.

Si tratta di un antibiotico a largo spettro, attivo su microrganismi Gram positivi e Gram negativi. L'azione sui Gram negativi è più intensa: *E. coli,* brucelle, pasteurelle, emofili, *Aerobacter aerogenes,* salmonelle, klebsielle, *P. aeruginosa, Proteus morganii* e *P. rettgeri* sono per l'80-90% già sensibili a concentrazioni inferiori a 4 mcg/ml. Meno sensibili sono *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*. Fra i Gram positivi rispondono bene la maggior parte degli stafilococchi, streptococchi (eccetto fecali), corinebatteri, listerie, micobatteri tubercolari, *B. anthracis, E. rhusiopathiae* e anche qualche clostridio.

L'azione è batteriostatica, ma diviene battericida per moderati au-

menti di concentrazione e si esplica anche su microrganismi in fase di riposo.

Il pH ottimale di attività è compreso fra 7,5 e 8, a pH 6,6 la concentrazione inibente è 2-4 volte superiore, a pH 5,5 30 volte superiore.

Spectinomicina

Isolata nel 1961 da colture di *Streptomyces spectabilis* e *S. flavopersicus*. Come gli antibiotici di questo gruppo è una sostanza basica che viene commercializzata prevalentemente sotto forma di solfato con diverse molecole di acqua di cristallizzazione. Per la valutazione del titolo bisogna tener conto del numero di queste molecole. Il solfato è ben solubile in acqua, solubile in metanolo, meno solubile in etanolo e acetone.

Lo spettro di azione comprende microrganismi Gram positivi e Gram negativi con maggiore intensità su questi ultimi. Nel pollo è stata utilizzata nelle infezioni da micoplasmi e salmonelle. L'azione è batteriostatica, diviene battericida solo per concentrazioni trenta volte superiori. Il pH ottimale di attività è compreso fra 7,5 e 8, a pH 6,5 si ha parità di risposta per concentrazioni circa 20 volte superiori.

Scarsamente riassorbita se somministrata per via orale sotto forma di polvere o tavolette, si presta per trattamenti locali del tubo gastro-enterico. Nei volatili, la somministrazione dell'antibiotico sciolto nell'acqua da bere, consente un apprezzabile riassorbimento.

4 - *ANTIBIOTICI POLIPEPTIDICI*

Quantunque di costituzione chimica assai simile, gli antibiotici di questo gruppo che hanno trovato applicazione in medicina veterinaria e cioè Bacitrina, Polimixine e Tirotricina, differiscono notevolmente nelle proprietà farmacologiche, specie tossicità e spettro di azione.

La Bacitracina risulta nefrotossica, neuro- e nefrotossiche le polimixine, dotata di azione emolitica la tirotricina.

Bacitracina e Tirotricina sono attive sui Gram positivi, le Polimixine sui Gram negativi.

Bacitracina

Isolata nel 1943 da coltura di *Bacillus licheniformis*. Si tratta di un complesso polipeptidico risultante di diversi componenti (A-B-C-D-E-F_1-F_2-F_3). Il componente principale dei prodotti in commercio è la Bacitracina A (circa il 70%) costituita da 9 diversi aminoacidi. Si presenta come una sostanza di colore bianco o giallo pallido, igroscopica, amara, ben solubile in acqua ed alcool etilico.

Allo stato secco è stabile, in soluzione acquosa a pH 4-5 ha una buona stabilità, mentre viene rapidamente inattivata a pH alcalino.

Con lo zinco e il manganese forma sali stabili e praticamente insapori.

L'attività della bacitracina viene espressa in U.I. Il preparato standard internazionale contiene 74 U.I./mg il che significa che 1 U.I. corrisponde a 13,51 mcg. I preparati del commercio contengono, in genere, 42 U.I./mg (1 U.I. = 23,8 mcg). Lo spettro di attività comprende batteri e cocchi Gram positivi, sporigeni compresi. Già a concentrazioni varianti fra 0,1-2 U/ml esplica azione battericida. Per la maggior parte degli stafilococchi, streptococchi (fecali compresi), *B. anthracis,* clostridi e corinebatteri la C.M.I. varia fra 0,005 e 2,0 U.I./ml.

Data la notevole nefrotossicità non viene usata per via parenterale. Si somministra per os, nel mangime o nell'acqua da bere, o in pomate per applicazioni locali anche nella terapia delle mastiti.

Polimixine

Delle 5 polimixine isolate, due hanno trovato applicazione in campo veterinario e cioè la Polimixina B e la Polimixina E più nota col nome di Colistina. Isolate nel 1957 da colture di *Bacillus polymixa,* vengono commercializzate sotto forma di solfato o metansulfonato.

L'attività di questi antibiotici viene valutata in unità. Per i prodotti del commercio si hanno i seguenti valori:
1 mg di Polimixina B = 6500 - 6800 U.I.

1 mg di Colistina solfato = 18000 - 20000 U.I.
1 mg di Colistina metansulfonato = 12500 U.I.

Allo stato secco hanno una buona stabilità, in soluzione acquosa ed a pH compreso tra 3 e 6, sono stabili per circa un mese a 4°.

Lo spettro di azione, sostanzialmente uguale per i due antibiotici, include essenzialmente i batteri Gram negativi (*Pseudomonas, Escherichia coli,* salmonelle, klebsielle, pasteurelle, *Aerobacter aerogenes,* emofili). Sulle brucelle l'attività è buona solo *in vitro*. *Proteus* spp sono resistenti. Agiscono sui microrganismi sia in fase di moltiplicazione che allo stato di riposo, ma solo in sede extracellulare.

Dal punto di vista quantitativo la polimixina si dimostra in genere più attiva. L'azione è batteriostatica e/o battericida. Per il 50% circa dei microrganismi la concentrazione batteriostatica coincide con quella battericida, per il 30% la concentrazione battericida è circa doppia di quella batteriostatica per il rimanente 20% la concentrazione battericida è 3-5 volte superiore. pH ottimale d'azione 6,2 - 7,5. A pH alcalino l'azione risulta sensibilmente ridotta.

Tirotricina

Complesso antibiotico isolato nel 1939 da colture di *Bacillus brevis*. Risulta costituito da componenti basici (tirocidine) e neutri (gramicidine). Scarsamente solubile in acqua, solubile in alcool o glicole propilenico.

Notevolmente stabile sia allo stato secco che in soluzione se a pH compreso fra 3 e 8.

Spettro di azione: batteri e cocchi Gram positivi.

Notevolmente tossico per via parenterale (emolisi) si usa solo per applicazioni locali.

5 - *ANTIBIOTICI MACROLIDICI*

Chimicamente sono caratterizzati dalla presenza di un macrociclo lattonico al quale si uniscono, con legame glicosidico, zuccheri o aminozuccheri.

Gli antibiotici di questo gruppo che hanno trovato impiego in medicina veterinaria, *eritromicina, oleandomicina, spiramicina, tilosina* e *carbomicina,* presentano caratteristiche farmacologiche molto simili.

Si tratta di sostanze basiche scarsamente solubili in acqua e solubili nei solventi organici. Esistono in commercio numerosi derivati di buona solubilità in acqua quali, per esempio, la eritromicina glucoeptonato e lattobionato, l'oleandomicina fosfato, la spiramicina solfato, la tilosina solfato, tartrato, gluconato, lattato e la carbomicina solfato.

La stabilità di queste sostanze è buona allo stato secco, in soluzione dipende dal pH e dalla temperatura. A pH acido vengono rapidamente inattivate. A pH moderatamente alcalino (7,5 - 8) e a temperatura di frigorifero si possono conservare per uno o due mesi.

Più stabile è la tilosina che a pH compresi tra 5,5 e 7,5 e a temperatura ambiente dimostra, in circa tre mesi, perdite in titolo del tutto trascurabili. L'eritromicina, l'oleandomicina, la spiramicina, la tilosina e la carbomicina sono ottenute per fermentazione rispettivamente da colture di *Streptomyces: erythraeus, antibioticus, ambofaciens, fradiae* e *halstedii.*

Lo spettro di azione, molto simile dal punto di vista qualitativo, comprende essenzialmente batteri e cocchi Gram positivi, qualche cocco e batterio Gram negativo e micoplasmi. In sintesi si può dire che i macrolidi rappresentano gli antibiotici alternativi per i Gram positivi resistenti alle penicilline o per il trattamento di soggetti ad esse sensibili, mentre costituiscono gli antibiotici di elezione nelle infezioni da micoplasmi.

Dal punto di vista quantitativo esistono sostanziali differenze: fatta uguale a 100 l'attività della eritromicina, quella della oleandomicina oscilla fra 12 e 25, quella della spiramicina e della carbomicina fra 2 e 25.

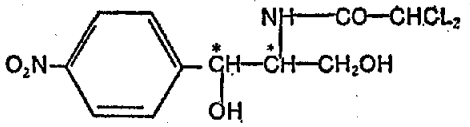
L'azione *in vivo* è batteriostatica e si esplica su microrganismi in fase di attiva moltiplicazione, solo la tilosina si dimostra nettamente battericida.

La resistenza si stabilisce con notevole rapidità specie per eritromicina e oleandomicina ed è, almeno parzialmente, crociata fra gli antibiotici del gruppo.

6 - *ANTIBIOTICI VARI*

Cloramfenicolo (CAF)

Isolato nel 1947 da colture di *Streptomyces venezuelae;* nel 1949 ne fu stabilita la formula di struttura e dal 1950 viene prodotto per sintesi.



Cloramfenicolo

Chimicamente è: D-(-)-treo-p.nitrofenil-2-dicloro acetil amino-propan 1-3 diolo.

Data la presenza dei due atomi di C asimmetrici esiste la possibilità di 4 stereoisomeri, ma solo la forma levogira ha buona attività antibatterica. Si presenta sotto forma di aghi o scagliette bianche, estremamente amare. Scarsamente solubile in acqua (2,5 mg/ml) è ben solubile in alcool, acetone, propilenglicole, dimetilacetammide.

In pratica si usano spesso i seguenti esteri:

CAF monosuccinato sodico, ben solubile in acqua, titolo in CAF 72,6%,

CAF palmitato, scarsamente solubile in acqua, titolo in CAF 57,6%,

CAF stearoil-glicolato, insolubile in acqua, titolo in CAF 49,99%.

Gli esteri tal quali *in vitro* non sono attivi, *in vivo* vengono rapidamente attivati da esterasi.

Il CAF allo stato secco è molto stabile, in soluzione acquosa, se conservato a 5°, ha una validità di circa due anni, a temperatura ambiente si può conservare circa un mese. A pH alcalino viene rapidamente inattivato.

Lo spettro di azione è molto ampio comprende infatti batteri e cocchi Gram positivi e Gram negativi, actinomiceti, spirochete, leptospire, rickettsie, micoplasmi e clamidie. A concentrazioni comprese tra 0,5 e 15 mcg/ml risultano sensibili la maggior parte degli streptococchi compresi i fecali, stafilococchi, brucelle, emofili, klebsielle, pa-

steurelle, salmonelle, shigelle, actinomiceti, *B. anthracis* e clostridi.

Una non trascurabile percentuale di stipiti di *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes* risultano resistenti. *Proteus* in prevalenza non è sensibile. Resistenti sono *Pseudomonas,* protozoi e miceti.

Si comporta essenzialmente da batteriostatico e agisce sui microrganismi in fase di moltiplicazione sia extra che endocellulare. L'attività non è influenzata dal pH entro valori compresi fra 2 e 9.

Tiamfenicolo

È il metil-sulfonil derivato del cloramfenicolo: il gruppo NO_2 in para è sostituito da un CH_3 - SO_2. Risulta meno attivo, dà con maggior frequenza fenomeni tossici per cui non ha trovato impieghi clinici.

Virginiamicina (sinonimo: Stafilomicina)

Isolata nel 1954 da colture di *Streptomyces virginiae.*

Chimicamente appartiene al gruppo degli antibiotici peptolidi costituiti da peptidi ciclici (di cui fanno parte anche le pristinamicine). Risulta costituito da due componenti indicati con le sigle M_1 ed S che dimostrano netta azione sinergica. Si presenta sotto forma di cristalli di colore giallastro. La solubilità in acqua è molto scarsa, buona invece nei solventi organici. La stabilità in soluzione acquosa è molto limitata.

Lo spettro di azione comprende cocchi e batteri Gram positivi, emofili, neisserie, leptospire e micoplasmi. La C.M.I. è compresa fra 0,2 e 1 mcg/ml per stafilococchi, streptococchi, leptospire, corinebatteri. Pasteurelle, micoplasmi ed emofili richiedono concentrazioni fino a 3 - 3,5 mcg/ml.

Fra gli streptococchi la specie *agalactiae* è meno sensibile: la C.M.I. si aggira sui 7 mcg/ml. Sono resistenti la maggior parte dei Gram negativi, miceti e protozoi. pH ottimale di attività 6.

I due componenti separati dimostrano solo attività batteriostatica, se associati l'attività risulta circa 100 volte superiore e diviene battericida.

Lincomicina

Isolata da colture di *Streptomyces lincolnensis* nel 1962.

Per la struttura chimica non si avvicina ad altri gruppi di antibiotici, ma ha caratteristiche farmacologiche simili a quelle dei macrolidi. Si presenta come una sostanza cristallina bianca, inodore. Ben solubili in acqua sono sia la base libera che il cloridrato. Allo stato secco è stabile e buona stabilità presentano anche le soluzioni acquose, conservabili per un mese a temperatura ambiente.

Lo spettro di azione comprende Gram positivi e micoplasmi. Rispondono a concentrazioni varianti fra 0,02 e 3 mcg/ml stafilococchi, streptococchi (*S. equi* e *S. fecalis* sono meno sensibili), *Erysipelothrix rhusiopathiae, B. anthracis*. La C.M.I. per *Streptococcus equi* è di 5 mcg/ml, per gli streptococchi fecali oscilla fra 0,125 e 5 mcg/ml.

L'azione è prevalentemente batteriostatica e si esplica su microrganismi in fase di moltiplicazione solo in sede extracellulare. La resistenza compare abbastanza rapidamente e spesso si ha resistenza crociata con gli antibiotici macrolidici. *In vitro,* per alcuni microrganismi, esiste antagonismo fra lincomicina ed eritromicina.

Clindamicina

È un derivato della lincomicina e precisamente la 7-cloro-7-desossilincomicina. I vantaggi che questo derivato presenta si possono compendiare in:

a) maggiore riassorbimento dopo somministrazione orale;
b) più elevati livelli ematici.

Novobiocina

Isolata nel 1955 da colture di *Streptomyces spheroides* e *Streptomyces niveus*.

Si presenta come una sostanza cristallina di colore giallino, fotosensibile. Ha carattere acido, viene commercializzata spesso sotto forma di sale di sodio o di potassio. In acqua il sale di sodio è ben solubile, l'acido libero è solubile solo a pH alcalino, scarsamente solubile è invece il sale di potassio. La soluzione acquosa del sale sodico a pH

7,5 è stabile, a temperatura ambiente, per 24 ore. Dopo 30 giorni, la stessa soluzione perde circa il 50% di attività.

Lo spettro di azione è rivolto essenzialmente contro i microrganismi Gram positivi, specie stafilococchi. Fra gli streptococchi sono sensibili le specie *agalactiae* e *pyogenes* (C.M.I. 0,02 - 1,5 mcg/ml). Gli streptococchi fecali hanno sensibilità variabile, come pasteurelle, protei ed *E. rhusiopathiae* (C.M.I. da 1 a 100 mcg/ml). Resistenti sono coli, salmonelle, pasteurelle, pseudomonas, clostridi, miceti e protozoi. Alle concentrazioni raggiungibili *in vitro* dimostra azione batteriostatica solo su microrganismi in fase di moltiplicazione ed a sede extracellulare. La resistenza si instaura con notevole rapidità.

Rifamicine

Isolate in Italia nel 1957 da colture di *Streptomyces mediterranei.*

Delle diverse frazioni isolate soltanto la B ha suscitato un notevole interesse. Da essa sono stati ricavati alcuni antibiotici semi-sintetici fra cui soltanto rifamicina SV e rifampicina hanno trovato limitato impiego in medicina veterinaria.

La *rifamicina SV* si presenta come una sostanza cristallina di colore giallo-arancio. Ha natura acida e, come sale sodico, è ben solubile in glicole. Dimostra spiccata attività contro batteri e cocchi Gram positivi e micobatteri tubercolari (C.M.I. da 0,02 a 0,5 mcg/ml). Resistente è *E. rhusiopathiae.* Si comporta da batteriostatico, ma per moderati aumenti di concentrazione (2-3 volte) esplica netta azione battericida su microrganismi in fase di moltiplicazione. Il pH ottimale di attività è compreso fra 5,5 e 6.

Esiste un sinergismo positivo fra rifamicina SV ed eritromicina, cloramfenicolo, bacitracina, novobiocina e tetracicline. Con penicilline e cefalosporine si ha invece un chiaro antagonismo.

In medicina veterinaria è stata utilizzata nelle infiammazioni mammarie sia di origine streptococcica che stafilococcica. La resistenza si stabilisce con notevole rapidità.

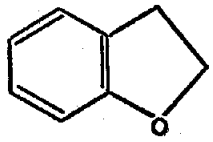
La *rifampicina* ha le stesse caratteristiche della rifamicina SV, ma uno spettro di azione più ampio comprendente anche Gram negativi fra cui neisserie, emofili, brucelle, *Campylobacter fetus, Pasteurella multocida* risultano molto sensibili (C.M.I. variante da 0,02 a 0,1 mcg/ml).

A differenza della rifamicina SV, viene assorbita bene dopo somministrazione orale.

Griseofulvina

Isolata da colture di *Penicillum griseofulvum* nel 1938, fu inizialmente utilizzata in fitoiatria e introdotta come antimicotico in clinica umana solo nel 1958.

Chimicamente è un derivato del benzofurano.



Benzofurano

Si presenta sotto forma di polvere incolore, praticamente insolubile in acqua, poco solubile in metanolo, più solubile in acetone e dimetilformamide. È molto stabile allo stato secco e discretamente stabile anche in soluzione purché a pH compreso fra 3 e 8,8.

Viene somministrata per via orale e l'optimum di assorbimento dipende fondamentalmente da due fattori:

a) dimensioni delle particelle. Particelle con un diametro di 0,8-2,7 micron consentono un riassorbimento doppio o triplo rispetto a particelle con diametro di 10-12 micron.
b) modalità di somministrazione. I migliori risultati si ottengono frazionando la dose giornaliera in quattro aliquote.

Lo spettro di azione comprende i generi *Trichophyton, Microsporum* ed *Epidermophyton.*

La concentrazione inibente varia da 0,2 a 15 od oltre mcg/ml. Non esiste un rapporto netto fra inibizione *in vitro* ed attività *in vivo;* spesso miceti scarsamente sensibili *in vitro* si sono dimostrati molto sensibili *in vivo.* L'attività è fungistatica.

Nistatina

Come l'anfotericina B appartiene al gruppo degli antifungini polienici. Isolata nel 1950 da colture di *Streptomyces noursei.*

Si presenta sotto forma di polvere giallastra, praticamente insolubile in acqua, scarsamente negli alcoli, ben solubile in dimetilformamide. La sostanza tal quale, protetta dalla luce e dall'umidità ed a temperatura fino a +4°, è stabile per circa un anno. In sospensione acquosa è scarsamente stabile: a pH 6 ed a 4° perde in 2-3 giorni il 15-20% di attività.

Il titolo viene espresso in U.I. 1 mg di sostanza pura corrisponde a 3500 U.I. I prodotti del commercio hanno titoli oscillanti fra le 2000 e le 2500 U.I./mg.

Lo spettro di azione è notevolmente vasto. A concentrazioni comprese fra 1 e 10 mcg/ml esplica azione fungistatica e fungicida sui seguenti principali microrganismi:

tricofiti, blastomiceti, criptococchi, coccidioidi, epidermofiti, candida, fusari, microspori, saccaromiceti e istoplasmi, a concentrazioni fra 10 e 100 mcg/ml agisce anche su penicilli e cefalospori.

Il pH ottimale di attività è compreso fra 4,5 e 6,5.

Anfotericina B

L'anfotericina B, assieme all'anfotericina A, è stata isolata da colture di *Streptomyces nodosus*. L'anfotericina A ha uno spettro di azione più ampio della B, ma è notevolmente meno attiva, per cui nella pratica terapeutica si è affermata solo la B.

La sostanza si presenta come polvere giallastra, scarsamente solubile in acqua e poco anche nei comuni solventi organici. In dimetilformamide la solubilità è discreta (60-80 mg/ml). In pratica si preparano delle soluzioni colloidali con desossicolato di sodio opportunamente tamponate.

Dato lo scarso riassorbimento, l'anfotericina viene somministrata solo per via endovenosa. Lo spettro di azione è molto simile a quello della nistatina, ma a differenza di questa. è solo fungistatica. L'antibiotico è dotato di rilevante tossicità, deve essere somministrato per

lunghi periodi di tempo, richiede frequenti controlli della crasi ematica, della funzionalità epatica e renale, per cui ha trovato scarsa applicazione in medcina veterinaria e solo nelle infezioni a localizzazione profonda.

Monensin

Questa sostanza, isolata da colture di *Streptomyces cinnamonensis,* appartiene a un nuovo gruppo di antibiotici caratterizzati dalla presenza di una singola funzione carbossilica e da un elevato numero di eteri ciclici.

Il monensin, sia come acido libero che come sale di sodio, è praticamente insolubile in acqua, mentre è ben solubile nei solventi organici quali idrocarburi clorurati, chetoni, alcoli e benzene. È dotato di buona stabilità sia allo stato secco sia in soluzione acetonica che può venir conservata a temperatura ambiente per oltre un anno senza apprezzabili variazioni di titolo.

Pur essendo dotato di azione inibente nei riguardi di microrganismi Gram positivi, micobatteri e funghi, ha trovato utile applicazione pratica solo come anticoccidico. Nel pollo esso è attivo nelle infezioni sostenute dalle diverse specie di coccidi e cioè *Eimeria tenella, E. necatrix, E. brunetti, E. acervulina, E. maxima, E. hagani* ed *E. praecox.*

Esplica la sua azione nei primi due giorni del ciclo di sviluppo del parassita e cioè nello stadio di trofozoite e probabilmente nelle prime generazioni di schizonti.

Consente lo stabilirsi di uno stato immunitario per le diverse specie di *Eimeria* eccetto che per *necatrix.*

Può venire utilizzato per il controllo della coccidiosi anche in tacchini, ovini, bovini e conigli.

BIBLIOGRAFIA

AIAZZI MANCINI, DONATELLI: Trattato di Farmacologia, 2ª Ed. 1969, Ed. Vallardi, Milano.

WALTER, HEILMEYER: Antibiotika Fibel, 3 Auflage 1969, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Farmacopea Ufficiale Italiana, 8ª Ed. 1972, Istituto Poligrafico dello Stato, Roma.
E.H. FLYNN, Cephalosporins and Penicillins, Academic Press 1972, New York - London.
L.M. JONES, N.H. BOOTH, L.E. Mc DONALD: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 4ª Ed., The Jowa State University Press, Jowa.
R. FAUSTINI: Marmacologia Veterinaria, 1ª Ed. 1976, Organizzazione Editoriale Medico-Farmaceutica, Milano.
S. GLASBY: Encyclopaedia of Antibiotics 1976, John Wiley & Sons, London - New York - Sydney - Toronto.
Drugs of Today, Vol. XII, n. 5, 1976, 171-210.
Y. RUCKEBUSCH: Physiologie Pharmacologie Therapeutique animales, 1977, Maloine S.A. Editeur, Paris.
A. BUXTON, G. FRASER: Animal Microbiology, 1977, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
Q. MINGOIA: X Congresso Internazionale di Chemioterapia, Cronache Farmaceutiche, *6,* 1977, 219-224.
M.J. WEINSTEIN, G.H. WAGMAN: Antibiotics, isolation, separation and purification, 1978, Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam-Oxford-New York.
BLASI, DONATELLI, ZANUSSI: Rifampicina, 1978, Ed. Minerva Medica, Milano.
R. VANBRENSEGHEN, C. DE VROEY, M. TAKASHIO: Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire, 1978, 2ª Ed. Masson, Paris.
H. BLODEL, T. SCHIESSER: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren Band 1°, 1979, Gustav Fischer Verlag-Stuttgart-New York.
A. DEL FAVERO, F. MENICHETTI: I nuovi antibiotici aminoglicosidici, Farmaci, *4,* 1980, 15-25.

G.C. SCHITO

METODICHE PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO DELLA SENSIBILITÀ BATTERICA AGLI ANTIBIOTICI: SIGNIFICATO E LIMITI

Il ruolo di guida del laboratorio di microbiologia nell'indirizzare la terapia antibiotica, è ormai ben stabilito. L'intervento si realizza principalmente tramite la formulazione di una precisa diagnosi eziologica corredata dal test di sensibilità ogni qualvolta il patogeno isolato abbia uno spettro di resistenza variabile o imprevedibile (1).

In concreto tuttavia gran parte della prescrizione di antibiotici, soprattutto per i pazienti ambulatoriali, avviene senza una indicazione mirata. Anche in caso di ricovero per cause infettive, quindi più gravi, il ricorso da parte del curante ai dati microbiologici è talora limitato. In uno studio del 1972 solo il 13% dei pazienti era trattato con antibiotici « razionalmente »; il 22% delle terapie era di dubbia utilità ed il 65% era giudicato inutile o dannoso (2). In Inghilterra un'analisi recente ha permesso di valutare che il 60% di tutti i ricoverati era sottoposto ad antibiotico-terapia mentre il 70% non manifestava sintomi che ne giustificassero l'impiego (3). Anche in Italia la situazione non è migliore: a Parma nel 1978 il 30% di tutti i ricoverati ha ricevuto chemio-antibiotico terapia e di questi solo il 21% aveva informazioni batteriologiche adeguate e solo il 30% dei soggetti mostrava segni clinici di infezione (4-5).

Queste statistiche rendono chiara la difficoltà con la quale il microbiologo riesce a guidare la scelta terapeutica soprattutto dei casi banali di infezione. I motivi di tale situazione possono essere ricercati in molte direzioni e senza dubbio comprendono una scarsa diffusione periferica dei laboratori di microbiologia, il ritardo con il quale sovente perviene la diagnosi microbiologica corredata dall'antibiogramma, l'abitudine ad uno empirico della terapia antibiotica, la scarsa importanza attribuita dal curante ai problemi inerenti la resistenza batterica e la tossicità dei farmaci impiegati.

Uno dei fattori che maggiormente delude il clinico e che coinvolge direttamente le responsabilità del microbiologo è l'incerto esito di una terapia basata sui risultati dell'antibiogramma, non potendosi da essi prevedere con certezza un andamento positivo della terapia.

In realtà, fatti salvi grossolani errori di esecuzione, si tratta di discrepanze di tipo interpretativo che dipendono dalla natura stessa dell'antibiogramma (6).

Valutazione critica dei metodi per la determinazione della sensibilità batterica agli antibiotici.

Un metodo ideale di valutazione della sensibilità *in vitro* dovrebbe essere applicabile a tutti i germi e ad ogni farmaco: essere rapido, semplice, economico; standardizzabile e perfettamente riproducibile, nonché di facile lettura. Il suo allestimento inoltre non dovrebbe dipendere da variabili tecniche. I tests di sensibilità, come vengono attualmente eseguiti, impiegando cioè tecniche che vanno dalla diffusione in agar alla diluizione in liquido e loro modifiche, sono ben lontani dal dimostrare queste caratteristiche.

Le difficoltà di standardizzazione, anche quando superate, permettono solo una corretta valutazione *in vitro* della sensibilità o della resistenza di un germe ad un certo farmaco su un terreno ben definito ed in condizioni sperimentali fisse. I parametri scelti nell'esecuzione dei tests di sensibilità, secondo le più note e standardizzate metodiche (7-9), sono stati convenzionalmente stabiliti per essere paragonabili a quelli che si riscontrano nel siero del paziente. In altri termini viene considerato con queste tecniche « sensibile » un germe che sia inibito od ucciso *in vitro* da una quantità di farmaco che può essere raggiunta e mantenuta terapeuticamente nel sangue del paziente a lungo, senza rischi tossici e che sia di almeno 4-8 volte maggiore della Concentrazione Minima Inibente (CMI) il batterio.

Questo tipo di approccio non tiene ad esempio in alcun conto il continuo variare delle condizioni *in vivo* nelle sedi di infezione dove il farmaco ed il germe devono interagire e che sono diverse non solo in rapporto all'evento morboso, ma anche per ragioni fisiologiche individuali.

Il fenomeno risulta in tutta la sua evidenza quando, considerando per esempio gli antibiogrammi sui germi di provenienza urinaria, si

confrontino i parametri sperimentali *in vitro,* con le stesse variabili *in vivo.* I terreni impiegati per il test di diffusione in agar (ad esempio: Mueller-Hinton Agar addizionato o non di sangue lisato di cavallo) sono assai ricchi e di consistenza semisolida, mentre la urina è un materiale relativamente povero e liquido (10, 11).

La carica microbica presente nelle urine infette è, per definizione, di almeno 10^5 germi/ml e supera spesso questa cifra anche di qualche logaritmo, mentre l'inoculo massimo, per ottenere tests di sensibilità tecnicamente validi, è di 10^4 germi/ml (10-12). Anche il pH che è artificialmente reso stabile intorno al valore neutro nei terreni a contenuto noto in sali ed in ioni, è estremamente variabile *in vivo,* oscillando da 4 ad 11 ed oltre in funzione dalla dieta, dalla situazione metabolica del paziente e dalle sintesi batteriche (es. fermentazione del glucosio, idrolisi dell'urea, produzione di gas). Il tempo di contatto del germe con l'antibiotico, 18 ore, e la temperatura di incubazione, 37°, sono costanti *in vitro,* mentre nell'urina dipendono rispettivamente dalla frequenza della minzione e dalla presenza o meno di febbre. La quantità di farmaco, costante nel test *in vitro,* è regolata *in vivo* da fattori farmacocinetici ed in particolare dal livello di assorbimento e dalla velocità di eliminazione. Il controllo dell'osmolarità, del contenuto in urea e dell'atmosfera di incubazione, facilmente ottenibile *in vitro,* è del tutto improbabile nelle urine (6, 11, 12).

La non corrispondenza alla fisiologia delle condizioni di valutazione *in vitro* della sensibilità o resistenza dei germi agli antibiotici rende ragione delle difficoltà che si hanno ogniqualvolta si vogliano extrapolare alla clinica i risultati di questi tests.

Benchè il metodo dell'agar diffusione sia quello adottato dalla maggior parte dei laboratori non mancano voci a favore dell'introduzione nella pratica dei tests quantitativi (C.M.I.), a conferma delle perplessità dei microbiólogi nei confronti dei risultati dell'antibiogramma e della loro validità (11, 13). Anche l'introduzione di strumenti automatici idonei alla valutazione della C.M.I. con rapidità e riproducibilità ha contribuito ad aumentare il dibattito sulla metodica più opportuna da adottare a scopi clinici (12).

Tra le più importanti ragioni che suggerirebbero l'uso di tests quantitaitivi per diluizione vi ` la possibilità di stabilire con precisione il livello di antibiotico attivo nei confronti di un determinato germe. Mentre il metodo per diffusione consente solo di distinguere

gli stipiti in « sensibili » e « resistenti », dai risultati delle C.M.I. è possibile valutare il « grado » di resistenza di un batterio. Ciò introduce la possibilità di giostrare con la posologia di un antibiotico in relazione alle sue caratteristiche farmacocinetiche.

Aumentando la dose di un farmaco poco tossico è possibile superare il basso livello di resistenza di un germe e ciò a maggior ragione se, ad esempio, la sede dell'infezione, cistifellea o vescica, è adatta al raggiungimento di alti livelli del chemioterapico.

Altro caso nel quale è possibile superare la posologia normale di un farmaco è l'applicazione topica, nella quale si riesce agevolmente ad avere ragione di germi con C.M.I. anche molto elevate.

I metodi di diluizione sono gli unici possibili quando si debba valutare la sensibilità di microorgansimi a lenta crescita o degli anaerobi, poiché, per definizione, gli antibiogrammi per diffusione non sono praticabili su tali germi.

La C.M.I. in terreno liquido consente anche la valutazione della Concentrazione Minima Battericida (C.M.B.) del farmaco. È questo un dato essenziale nel monitoraggio della terapia di alcune infezioni gravi, quali endocarditi e setticemie, nonché nella valutazione di certi insuccessi terapeutici, in quadri recidivanti, causati da germi con particolari alterazioni genetiche (14-16).

L'impiego dei metodi di diluizione non è però scevro di critiche. Le metodiche di esecuzione non sono, ad esempio, assolutamente standardizzate. È lasciata ampia scelta del terreno di coltura e anche se gran parte di coloro che eseguono la C.M.I. in brodo utilizza Brain Heart Infusion Broth il contenuto in proteine così come quello in ioni varia moltissimo a seconda delle metodiche di preparazione del terreno e dalla Ditta che lo fornisce. L'arricchimento con siero, talora di feto di vitello, talora di cavallo, o umano, altera il contenuto in proteine e quindi la possibilità di legare o meno l'antibiotico variandone l'efficacia. Gli stessi fattori di disomogeneità si ritrovano quando il procedimento venga eseguito su piastra.

Nessun altro test inoltre risente come la diluizione in liquido della grandezza dell'inoculo (11, 17). Per ottenere buoni risultati esso non deve eccedere 10^4 germi/ml, concentrazione batterica questa che si discosta spesso da quella che si riscontra *in vivo,* realizzando così condizioni molto diverse di interazione farmaco-germe. Anche il pH del terreno, che viene inevitabilmente modificato dal metabolismo bat-

terico, influisce considerevolmente sui risultati (6, 13). Bisogna ancora rilevare che l'effetto degli antibiotici sui germi non è del tipo del tutto o nulla, ma che la crescita dei batteri è fortemente influenzata dalla presenza di questi inibitori, anche in quantità inferiore alla C.M.I., con notevoli riflessi sulla valutazione corretta dei risultati. Una prolungata incubazione del test, qualora ci si trovi di fronte ad una popolazione batterica con eterogenea sensibilità ad un farmaco, può selezionare mutanti resistenti che mascherano la sensibilità all'antibiotico della maggior parte dei germi, evidenziando una situazione la cui importanza ai fini clinici non è a tutt'oggi ben chiara (18). Pertanto la lettura dei risultati della C.M.I., risentendo di tutte queste cause di errore, diventa troppo soggettiva.

Esistono altri importanti fattori che influiscono sulla interpretazione clinica sia dell'antibiogramma per diffusione che per diluizione. Essi dipendono talora dalla natura del germe in causa: è ad esempio noto come la *S. typhi* sia *in vitro* sensibile a quasi tutti gli antibiotici saggiati, mentre il tifo è guaribile solo con l'uso di alcuni di essi. Lo stesso dicasi per altri batteri che vengono valutati in modo diverso a seconda dell'infezione che causano: un gonococco con C.M.I. alla benzil-penicillina compresa tra 0,125 e 1 μg/ml è considerato resistente, in quanto una singola iniezione del farmaco non è in grado di eradicare l'infezione. Tuttavia, un trattamento prolungato può aver ragione della malattia. Altri batteri con C.M.I. uguali, quali *S. faecalis* o *H. influenzae,* sono invece considerati sensibili in quanto si presume che un'infezione sostenuta da questi germi guarirà dopo un trattamento di almeno una settimana.

A causa dell'obiettiva difficoltà di adattare i metodi classici *in vitro* all'esigenza di ottenere con essi una previsione valida per quello che avviene *in vivo* non sono mancati tentativi da parte di alcuni studiosi di simulare in laboratorio condizioni di saggio dell'attività antibatterica dei farmaci il più vicino possibile alle condzioni fisio-patologiche che si riscontrano nell'uomo. Greenwood e O'Grady (19), ad esempio, hanno recentemente valutato un modello sperimentale di vescica urinaria *in vitro,* nel quale con l'ausilio di un sistema di pompe ed iniettori era possibile modificare la concentrazione dei germi e di antibiotico in relazione al flusso minzionale. I risultati riportati evidenziano come questa tecnica abbia permesso di meglio valutare l'efficacia di alcuni antibiotici. I sulfamidici, ad esempio, paiono risentire

meno in vescica dell'effetto-inoculo che è molto marcato invece nei tests *in vitro.*

Sulla stessa scia si colloca lo studio di Bryant (17) che valuta l'efficacia di alcuni antibiotici nei confronti di *S. aureus* utilizzando coaguli di fibrina e pus, nel tentativo di simulare *in vitro* le lesioni endocarditiche ed in particolare le vegetazioni valvolari. I risultati riportati hanno evidenziato come la presenza di leucociti e di materiale organico in genere possa influenzare l'attività di alcuni antibiotici quali rifampicina e vancomicina riducendone *in vivo* l'indiscussa efficacia *in vitro* su *S. aureus.*

Il tipo di approccio, rappresentato da questi due esempi, ad un un test di sensibilità agli antibiotici più aderente alle condizioni cliniche non è ovviamente, oggi, applicabile all'uso quotidiano presentando ostacoli tecnici non facilmente superabili. D'altra parte questa tendenza è apprezzabile in quanto suggerisce una ricerca più attenta alle peculiari situazioni nei vari quadri morbosi. Questo ovviamente tiene conto delle differenze anatomo-patologiche e farmaco-cinetiche, in contrasto con l'altra tendenza, fino ad oggi prevalente, dalla standardizzazione e dall'automazione che, persistendo nella non facile estrapolabilità alla clinica dei dati *in vitro,* tende semplicemente a migliorare le discrepanze dovute ad errori soggettivi manuali.

Interpretazione dei tests « in vitro ».

I risultati dei tests di sensibilità in uso corrente richiedono una valutazione critica da parte di chi è chiamato ad applicarli nella pratica terapeutica quotidiana. I referti di laboratorio riportano di solito due categorie di germi nei confronti di un farmaco: « resistenti » e « sensibili (9) e talora compare una terza classe di sensibilità « intermedia » (7).

La definizione di « resistente » può essere considerata attendibile in quanto il farmaco è messo *in vitro* nelle condizioni migliori per agire sul microrganismo, aggirando tutti gli ostacoli dovuti alla variabilità farmacocinetiche che dipendono *in vivo* dalla sede dell'infezione e dalle condizioni individuali del paziente (3). Solo quando, come già ricordato, il farmaco in causa è a bassa tossicità e consente di modificare la posologia oppure ha tendenza a concentrarsi nella sede voluta, è possibile prendere in considerazione un suo impiego terapeutico,

a patto che il germe abbia una resistenza di livello modesto valutato con la determinazione della C.M.I. (sensibilità intermedia) (3).

Il concetto di completa « sensibilità » *in vitro* al contrario non ha sempre una reale rispondenza *in vivo*. È questo il caso in cui la scelta terapeutica consigliata dal laboratorio ha solo valore indicativo e non predittivo dell'eventuale successo terapeutico, in quanto presuppone che il farmaco inibisca o uccida il germe in causa, ma solo nelle condizioni farmacocinetiche più favorevoli. Una via di somministrazione incongrua, uno scarso assorbimento, l'uso di un antibiotico che venga inattivato metabolicamente prima di raggiungere la sede dell'infezione, sono tutti fattori che rendono impossibile pronosticare il successo della terapia sulla base della sola sensibilità *in vitro*.

Monitoraggio della terapia antibiotica.

Se i margini fiduciali di errore insiti nell'interpretazione di tests di sensibilità risultano nella maggior parte dei casi accettabili purché venga congruamente adeguata la posologia o cambiata la molecola impiegata, così non è in molte situazioni patologiche gravi, « a rischio » della vita del paziente, nelle quali è indispensabile avere la certezza dell'efficacia del trattamento.

È necessario, pertanto, monitorare in questi soggetti la terapia affinché alle attese corrisponda un reale effetto curativo.

Tale monitoraggio può essere eseguito utilizzando speciali tests che includono il dosaggio dei livelli di antibiotico raggiunto nel siero e nei fluidi del paziente e la quantizzazione della capacità del siero e di altri liquidi di uccidere il germe che causa l'infezione.

Si tratta cioè non più di standardizzare, come nel caso dell'antibiogramma, bensì di personalizzare il trattamento antibiotico al fine di raggiungere i migliori risultati nelle infezioni più gravi, solitamente nosocomiali (20).

Per ciò che riguarda la scelta del tipo di monitoraggio di solito essa dipende sia dalle condizioni generali del paziente che dal tipo di farmaco usato, o dalla gravità del quadro clinico.

I dosaggi dei livelli ematici dei chemioantibiotici vengono attuati ogni qualvolta vi siano problemi farmacocinetici quali l'incerto assorbimento o la scarsa eliminazione a causa di danni epatici o renali ed a

maggior ragione quando i farmaci impiegati siano poco maneggevoli (a basso indice terapeutico) (21).

La battericidia del siero e degli altri fluidi viene invece utilizzata nelle malattie a prognosi più grave ed in cui occorre uccidere al più presto l'agente infettante. Storicamente l'endocardite batterica è la malattia per la quale si usa questo test da più tempo (22), ma attualmente se ne ravvisa l'utilità anche in altri quadri quali le osteomieliti, le artriti settiche, gli empiemi e le infezioni nei pazienti immunodepressi e neoplastici (23).

Dosaggio dei livelli ematici di antibiotici.

Lo scopo dei dosaggi di antibiotico è quello di accertare la quantità di farmaco presente in due particolari momenti della terapia. Il primo è quello di massima concentrazione del farmaco (da 15 minuti ad 1 ora dopo la somministrazione a seconda della via scelta). Esso serve a verificare che la sostanza raggiunga valori terapeutici nel siero del paziente od in altri fluidi quali urine o liquor (21). Il secondo è quello di minima concentrazione che coincide con l'istante immediatamente precedente la successiva somministrazione di farmaco (pre-livello). Questa valutazione è estremamente importante quando si vogliano prevenire indesiderati effetti tossici collaterali dovuti ad accumulo a causa di una troppo lenta eliminazione.

Numerose sono le tecniche disponibili per la valutazione dei livelli, ma le più usate attualmente sono il dosaggio microbiologico, quello radioimmunologico e quello immunoenzimatico.

Un dosaggio sierico di antibiotico per essere clinicamente utile deve essere rapido, fornire risultati in giornata o meglio in 5 o 6 ore per consentire tempestive modifiche della terapia ed avere ovviamente una buona precisione. I metodi citati assolvono a queste esigenze, ma hanno alcune rilevanti differenze tra loro.

Il metodo microbiologico (24, 25) è il più semplice ed il meno costoso in quanto non richiede alcun tipo di attrezzatura: ha però la necessità di essere eseguito da personale esperto. Due condizioni creano tuttavia problemi nell'interpretazione del risultato. La prima si verifica quando il siero del paziente contiene due o più antibiotici. In questo caso occorre eliminare l'effetto di uno dei due farmaci con una inattivazione enzimatica o impiegando un germe sensibile a un far-

maco e resistente all'altro. La seconda quando da poco è stata interrotta una precedente terapia e non si possa valutare quale sia l'effetto dell'eventuale residuo di attività antibatterica.

Bisogna inoltre tener presente, quando vi sia una terapia poliantibiotica, l'antagonismo chimico delle due sostanze che non può essere evitato dall'uso di germi resistenti, come nel caso di carbenicillina-aminoglicosidici o il potenziamento come nel caso dell'uso di due β-lattamine (26).

Il metodo radioimmunologico (27) è utilizzabile quasi esclusivamente per il dosaggio degli aminoglicosidici, che peraltro rappresentano più del 90% di tutte le indicazioni. Il test, è molto specifico, ha per caratteristiche negative quelle di sovrastimare la quantità di antibiotico in quanto gli anticorpi possono legarsi anche a molecole parzialmente degradate e l'impiego di radioisotopi, che necessitano di locali ed attrezzature adeguate alle rigorose norme di legge.

Il metodo immunoenzimatico (28), da poco introdotto in commercio, ha quasi le stesse caratteristiche di quello radioisotopico, ma è di uso più semplice, meno rischioso e soprattutto richiede attrezzature molto diffuse nei laboratori.

Battericidia del siero.

La valutazione della capacità battericida del siero serve a determinare se effettivamente il contenuto in farmaco di questo liquido è in grado di controllare l'evoluzione della malattia garantendo l'uccisione dell'agente causale.

Il quantizzare *in vitro* l'attività battericida del siero di un paziente permette al clinico di scegliere, in collaborazione col microbiologo, il trattamento più adeguato in queste difficili infezioni.

Anche la prognosi di altre gravi manifestazioni morbose diviene migliore in rapporto al controllo regolare della capacità battericida del siero. Tra queste vanno principalmente annoverate le osteomieliti, le artriti settiche, le setticemie e comunque tutte le infezioni che avvengono in sedi dove l'intervento del sistema immunitario del paziente non possa essere considerato attivo oppure in quei pazienti nei quali l'immunopoiesi non sia valida, come nei neoplastici, o sia farmacologicamente inibita.

Interpretazione ed applicazione dei tests di battericidia.

Dal punto di vista dell'esecuzione del test apparentemente non vi sono soverchie difficoltà: si tratta di diluire scalarmente a fattore due il siero e di verificare l'azione nei confronti del germe isolato dal paziente. Non essendo stato concordato un procedimento standard numerose variabili influiscono sui risultati ed in particolare: l'inoculo che non deve superare 10^4 germi/ml; il tipo di siero o di brodo usato per la diluizione. Il volume finale non deve essere superiore, nel macrometodo, a 3 ml ed il tempo di incubazione deve corrispondere al tempo di contatto *in vivo* del germe con il farmaco e pertanto non superare le 18-24 ore.

L'interpretazione dei titoli di battericidia è a tutt'oggi dibattuta. Si ritiene comunque che un titolo di 1:8 ottenuto da siero prelevato al momento della massima concentrazione di antibiotico possa essere soddisfacente anche se non esistono al momento dati sperimentali circostanziati che lo provino.

CONCLUSIONI

In vivo le interazioni tra germe ed antibiotico avvengono in ogni sede ed in ogni liquido organico ed obbediscono a leggi farmacodinamiche estremamente complesse. L'uso di metodi di valutazione *in vitro* della resistenza e della sensibilità dei germi ai farmaci risulta pertanto di interpretazione problematica in quanto non è possibile ricostruire le condizioni nelle quali effettivamente deve avvenire l'azione antibatterica. Forse solo il risultato che indica una resistenza è valido ed ha il merito di evitare l'uso di terapie spesso inefficaci. La sensibilità *in vivo* di certi germi ad alcuni farmaci è solo presunta e permette unicamente di fornire al clinico la lista delle molecole che egli può impiegare con possibile successo. Se questo quadro è sufficiente in molti processi infettivi l'incertezza che ne deriva non è tollerabile nell'aggredire le infezioni più gravi che debbono avvalersi di un più preciso monitoraggio da eseguire con l'impiego di analisi più personalizzate.

I tests a disposizione per questi scopi sono qui stati descritti e commentati. Le tecniche di esecuzione sono relativamente poco com-

plesse e benché non siano standardizzate, consentono di monitorare al meglio la terapia nei casi gravi migliorandone certamente la prognosi.

Nonostante ciò attualmente in Italia l'impiego di questo tipo di indagini non pare abbastanza diffuso soprattutto nell'ambiente ospedaliero dove vi è ovviamente la più alta concentrazione di pazienti ad alto rischio.

Ci pare di poter affermare che sarebbe compito del microbiologo estendere la conoscenza e l'impiego di queste metodiche tanto utili quanto semplici offrendo al clinico ed ai pazienti un sostegno determinante per il trattamento delle infezioni batteriche a prognosi più grave.

BIBLIOGRAFIA

1) SCHITO G.C. in G.C. Schito . M.W. Casewell « Introduzione ad una terapia antibiotica razionale » Monduzzi, 1978.
2) ROBERTS A.W. e VISCONTI J.A.: Am. J. Hosp. Pharm. *29,* 828, 1972.
3) PERCIVAL A.: in Brunfitt « New perspectives in Clinical Microbiology » p. 11, Kluwer Medical, London, U.K., 1978.
4) SCHITO G.C.: Quad. Sclavo Diagnostica *15,* 444, 1979.
5) TONI M., ROSATI F., CUOGHI I., ALLEVATO F. e SCHITO G.C.: Atti XIX Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol., Catania 1980.
6) SANDERS W.E. Jr. and SANDERS C.C.: in Lorian V. « Significance of Medical Microbiology in the care of Patients » p. 186, Williams and Wilkins Baltimore, U.S.A. 1977.
7) BAUER A.W., KIRBY W.M.H., SHERRIS J.C. and TURCK M.: Am. J. Clin. Pathol. *45,* 493, 1966.
8) ERICSSON H.M., SHERRIS J.C.: Acta Pathol. Microbiol. Scand.
9) STOKES E.J.: in « Clinical Bacteriology » IV ed. p. 202, Arnold, London, 1975.
Sect. B Suppl. 217, 1971.
10) WASHINGTON J.A. II: J. Infect. Dis. *140,* 261, 1979.
11) SHERRIS J.C.: in Lorian V. « Significance of Medical Microbiology in the Care of Patients » p. 170, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1977.
12) WATERWORTH P.M.: J. Antimicrob. Chemother., *2,* 104, 1976.
13) EMMERSON A.M.: in Schito G.C. e Casewell M.W. « Introduzione

ad una terapia antibiotica razionale » Monduzzi, 1978.
14) HOME D. and TOMASZ A.: Antimicrob. Agents Chemother. *11,* 888, 1977.
15) HOLLOWAY Y., DANKERT J. and HESS J.: Lancet, i, 589, 1980.
16) WATANAKUNAKORN C.: J. Antimicrob. Chemother., *5,* 239, 1979.
17) BRYANT R.E.: in Gilbert D.N. e Sanford J.P. « Infectious Disease » vol. I, p. 165, Grune e Strat-Inc., N.Y. 1979.
18) ZANON V.: J. Antimicrob. Chemother., *3,* 106, 1977.
19) GREENWOOD D. and O'GRADY F.: Antimicrob. Chemother., *4,* 113, 1978.
20) SCHITO G.C. e PHILLIPS I.: « Le Infezioni Nosocomiali » La Commerciale, Fidenza, 1980.
21) REEVES D.S.: in Schito G.C. e Casewell M.W. « Introduzione ad una terapia antibiotica razionale » Monduzzi, 1978.
22) SCHLICHTER J.G., MACLEAN H., MILZER A.: Am. J. Med. Sci. *217,* 600, 1949.
23) KLASTERSKY J., DANEAU D., SWINGS G., WEERTS D.: J. Infect. Dis. *129,* 187, 1974.
24) KOVANGH F.: Analitical Microbiology, Academic Press, N.Y., 1963.
25) NOONE P., PATTISON J.R. and SANSON D.: Lancet ii, 1194, 1972.
26) MURILLO J., STANFORD H.C., SCHIMPFF S.C. and TALEM B. B.A.: JAMA *241,* 2401, 1979.
27) MAHON W.A., EZER J., and WILSON T.W.: Antimicrob. Agents Chemother., *3,* 585, 1973.
28) LANCET (Editoriale): Lancet ii, 406, 1976.

F. GIANELLI

LA RESISTENZA DEI BATTERI AGLI ANTIBIOTICI ED AI CHEMIOTERAPICI

Da quando Moore et al. (1946) segnalarono che minime concentrazioni di streptomicina aggiunte ai mangimi determinavano un rapido aumento in peso dei pulcini, le indagini sulla somministrazione degli antibiotici a fini zootecnici, non solo interessarono centinaia di ricercatori, ma diedero degli straordinari e impensati risultati.

I farmaci antibatterici, infatti, addizionati agli alimenti in dosaggi molto bassi ($\leqslant$ 20 ppm) durante il periodo di sviluppo dei suinetti, dei vitelli, dei pulcini, ecc..., oltre a diminuire il tasso di mortalità, determinavano un incremento in peso superiore ai controlli, miglioravano il tasso di conversione degli alimenti e permettevano che i singoli capi di un allevamento raggiungessero una grande omogeneità nel peso alla fine del ciclo zootecnico.

Di fronte a tanti vantaggi che sul piano pratico si traducevano e si traducono ancor oggi in tante battaglie vinte contro la fame di proteine nel mondo, si contrappongono, tuttavia, preoccupazioni di ordine igienico-sanitario. Vogliamo alludere al problema dei residui di antibiotici e/o di chemioterapici e dei loro metaboliti negli alimenti di origine animale; alla protezione dell'ambiente dall'azione sfavorevole che le sostanze antimicrobiche, eliminate con le feci e le urine, possono esercitare sugli organismi inferiori e superiori, dal regno dei protisti al regno vegetale e animale; allo sviluppo della resistenza batterica conseguente all'uso di farmaci antimicrobici ad uso auxinico, a prescindere dalla insensibilità che può derivare dalla loro utilizzazione nella profilassi e nella terapia delle malattie infettive degli animali domestici allevati.

Il problema della farmaco-resistenza dei batteri è un fenomeno assai complesso nel quale concorrono due tipi di insensibilità: la naturale e l'acquisita (Videau, 1975). Quest'ultima compare fra stipiti

di taxa di norma sensibili ed è conseguente a informazioni codificate da geni di molecole di ADN diverse, cromosomiche ed extracromosomiche. Se nel primo caso si parla di resistenza cromosomica e nel secondo di resistenza extracromosomica, tuttavia, ambedue possono essere trasmesse per trasformazione, trasduzione e coniugazione.

1 - *Resistenza naturale agli antibiotici e/o ai chemioterapici*

La resistenza naturale di un taxon batterico verso alcuni farmaci antibatterici è una falla nello spettro d'azione di un antibiotico e/o di un chemioterapico. Essa è fissata geneticamente a livello dell'ADN delle singole specie.

Possono essere citati come esempi la insensibilità dei cocchi in genere all'ac. nalidixico, delle *Pseudomonas* al furadantin, di *Proteus mirabilis* alle tetracicline, alla colistina e alla polimixina, di *S. faecalis* ai sulfamidici.

La causa, se può esser tale, va ricercata in difficoltà di penetrazione delle sostanze antimicrobiche attraverso le membrane del batterio, in bersagli molecolari modificati rispetto ad altre specie sensibili, in assenza di sistemi attivi di trasporto attraverso la membrana citoplasmatica, ecc.

Se la capsula può contribuire alla farmaco-resistenza in quanto costituisce, grazie alla fitta rete costituita da molecole anioniche di zuccheri legati fra loro in lunghi polimeri (stipiti mucosi), un ostacolo alla penetrazione, altrettanto può dirsi per la parete (membrana esterna) dei batteri gram negativi che rappresenta una efficace barriera capace di escludere puromicina, benzilpenicillina, actinomicina, eritromicina, bacitracina, kanamicina e cloxacillina. D'altro canto anche i LPS possono limitare la penetrazione dei farmaci come lo dimostra l'osservazione che gli stipiti in fase R sono più sensibili dei ceppi in fase S all'azione degli antibatterici; così pure dicasi per lo strato di peptidoglicani, che funziona da filtro anionico molecolare e per gli spazi periplasmici che possono contenere enzimi che degradano specificamente alcuni antibiotici (Costerton 1977).

La membrana interna è l'ultimo ostacolo che i farmaci antibatterici incontrano e che attraversano o per intercalazione fra le molecole idrofobe dei fosfolipidi o per mezzo di sistemi attivi di trasporto. È la struttura che permette a *P. aeruginosa* di essere resistente alla strep-

tomicina, alla actinomicina e alle tetracicline e a *E. coli* all'actinomicina (Tseng e Bryan, 1974; Costerton et al., 1974).

2 - *Acquisizione della resistenza cromosomica agli antibiotici e/o ai chemioterapici per mutazione*

In una popolazione di batteri sensibili ad un farmaco antibatterico esiste sempre un certo numero di cellule mutanti spontaneamente resistenti.

La mutazione è un evento che si verifica con una frequenza assai limitata durante la duplicazione del nucleo tanto che la probabilità di ottenere un mutante resistente durante la moltiplicazione di batteri sensibili è di $1x10^{-7}$-10^{-10} per generazione; in altre parole, quando 10^{7}-10^{10} cellule si dividono una della progenie sarà, di media, un mutante (Falkow, 1975).

Un grado elevato di antibiotico-resistenza può essere raggiunto immediatamente o progressivamente per una sequenza di mutazioni: one step o multistep mutation. Il primo meccanismo è frequente, ad esempio, con streptomicina, macrolidi e rifampicina, il secondo con eritromicina. Secondo Garrod (1976) allorché la resistenza aumenta lentamente durante un lungo periodo di anni una spiegazione più plausibile sarebbe quella di ipotizzare una forma di adattamento piuttosto che di attribuirla ad una lunga serie di piccole modificazioni genetiche come si è verificato nell'uso della penicillina nel trattamento della gonorrea. Dopo dieci anni la sensibilità media degli stipiti di gonococco passò, infatti, da 0,2U/ml nel 1955 a 1,6U/ml nel 1974 (Thayer et al., 1964).

La mutazione è stata ritenuta per lungo periodo di tempo il solo meccanismo atto a spiegare la comparsa di insensibilità ad antibiotici e/o chemioterapici in stipiti di batteri. Non può certamente però interpretare la resistenza multipla verso farmaci antibatterici a struttura chimica diversa come nel caso classico degli stipiti di *Shigella dysenteriae* isolati in Giappone (v. oltre) che erano contemporaneamente insensibili a quattro diversi composti che agiscono con meccanismi d'azione diversi. La probabilità, infatti, di ottenere quattro mutazioni in uno stipite di batterio nello stesso tempo è di un mutante su 10^{28}-10^{40} cellule; ovverossia ,qualora si consideri il peso medio di un batterio pari a 10^{-12} g, di un mutante su 10^{16}-10^{28} g.

Il che è assolutamente improbabile essendo il peso della terra pari a $5{,}98.10^{27}$ g.

3 - *Acquisizione della resistenza agli antibiotici e/o chemioterapici per trasformazione*

La trasformazione è un processo di trasferimento di geni nel corso del quale un frammento di ADN di un batterio donatore, dopo essersi fissato alla superficie di una cellula in corrispondenza di particolari ricettori, vi penetra integrandosi col cromosoma. Se la scoperta del fenomeno, come è noto, si deve a Griffith (1928) col classico esperimento condotto per chiarire la natura della variazione R-S nel pneumococco, si deve ad Avery, MacLeod e MacCarty (1944) la dimostrazione che la vera natura del principio trasformante è l'acido desossiribonucleico.

Solo un numero limitato di specie possono essere trasformate (*Streptococcus pneumoniae, Bacillus subtilis, B. licheniformis, Neisseria catharralis, Haemophilus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., ecc.). Dovendo sussistere un grado elevato di omologia tra l'ADN donatore e quello della cellula accettrice la trasformazione interspecifica è limitata a specie molto vicine da un punto di vista tassonomico (*B. subtilis - B. licheniformis, H. influenzae - H. parainfluenzae*) e comporta una frequenza di trasferimento genetico molto bassa comparativamente all'intraspecifica.

Sperimentalmente è stato dimostrato che il fattore limitante nella realizzazione della trasformazione è lo stato di competenza delle cellule accettrici, un particolare stato transitorio fisiologico durante il quale le strutture superficiali cellulari vengono modificate in maniera tale da permettere la fissazione dell'ADN trasformante.

Le sequenze del processo di trasformazione in *Streptococcus pneumoniae* possono essere sintetizzate in alcune tappe (Lacks, 1977) in cui la prima è l'attivazione delle cellule incompetenti ad acquisire lo stato di competenza.

I pneumococchi diventano competenti in alto numero verso la fine della fase logaritmica allorché la densità delle cellule raggiunge alti valori ($\sim 10^7$xml) e la elaborazione e la concentrazione nel terreno dell'attivatore della competenza, una proteina basica (Tomasz e Mosser, 1966; Leonard e Cole, 1972) di modesto peso molecolare (5.000 -

10.000daltons), è sufficientemente elevata da attivare le cellule incompetenti fissandosi a ricettori particolari. Affinché i pneumococchi resi competenti acquisiscano la capacità di legare l'ADN trasformante, appare necessaria la sintesi (o lo smascheramento) di una nuova proteina che non solo partecipi direttamente alla reazione di fissazione della molecola donatrice di geni, ma che rompa un filamento della doppia catena dell'ADN e si attacchi alla sua estremità 5' (Lacks, 1977).

L'entrata dell'ADN è preceduta dalla sua conversione a un singolo filamento che penetra all'interno della cellula, forse assieme alla proteina citata di nuova sintesi, mentre quello complementare viene degradato da una endonucleasi parietale a nucleotidi che si disperdono nel terreno. Il passaggio a un solo filamento dell'ADN trasformante spiegherebbe il fenomeno dell'« eclissi », l'incapacità momentanea cioè della molecola che è stata trasferita a codificare nuovi enzimi.

Al fenomeno dell'eclissi segue l'integrazione col genoma batterico: il frammento di ADN donatore si appaia col cromosoma in corrispondenza di una regione omologa e vi si inserisce sostituendolo con un processo di ricombinazione per rottura e riunione.

La grandezza dell'ADN trasformante è di norma molto piccola ($2x10^3$-$2x10^4$ paia di basi), conseguentemente minimo sarà il numero di geni che potranno essere codificati. Se si considera che la lunghezza media di un gene viene stimata attorno a 1.000 paia di basi e quello dell'ADN integrato in alcune migliaia, ben si può comprendere come la trasformazione non può che trasferire uno o al massimo due caratteri di resistenza agli antibiotici e/o ai chemioterapici.

D'altro canto non bisogna dimenticare che anche i plasmidi R coniugativi o meno, possono essere trasferiti mediante trasformazione senza ricombinazione genetica, non solo a cellule batteriche della stessa specie da cui gli elementi genetici citati sono stati isolati, *E. coli, P. aeruginosa, P. putida,* (Cohen et al., 1972; Chakrabarty et al., 1975; Haque, 1979; Brown et al., 1979; Weston et al., 1979; Mottes et al., 1979; Srogl et al., 1977) ma anche di specie diversa.

Recentemente Ehrlich (1977) è riuscito a trasferire, per trasformazione, cinque plasmidi di *Staphylococcus aureus,* uno codificante per la resistenza alla tetraciclina e gli altri quattro per il cloramfenicolo, a *Bacillus subtilis* dove non solo si sono replicati ma hanno espresso la loro informazione genetica nel nuovo ospite. Così pure Kono et al. (1979) sono riusciti nell'intento di introdurre per trasfor-

mazione un plasmide stafilococcico, resistente a penicillina e tetraciclina, in *B. subtilis*.

D'altro canto Chakrabarty et al. (1977) hanno riportato la trasformazione di *Vibrio cholerae* e di *S. typhi* con plasmidi R di *E. coli* e di *S. typhimurium;* parimenti Dastider et al. (1978) quella di varie specie di *Salmonella* e di *Shigella, di E. coli* e di *V. cholerae* con elementi genetici di resistenza di *E. coli* e di *V. cholerae.*

La trasformazione può essere considerata, allorché si consideri che l'ADN cromosomico o plasmidico può essere liberato nel substrato per autolisi delle cellule, un meccanismo naturale di scambio di geni. Ciò nonostante si è propensi a credere che tale processo di trasferimento di informazioni poiché necessita di condizioni ottimali di sviluppo per la sua realizzazione (temperatura, pH, concentrazione di cationi bivalenti Mg^{++} e Ca^{++} e monovalenti K^{+}, sostanze nutritive, densità cellulare, ecc...) si realizzi, in condizioni naturali, con una frequenza minore di quella osservata sperimentalmente.

4 - *Acquisizione della resistenza agli antibiotici e/o ai chemioterapici per trasduzione*

La trasduzione è un meccanismo di trasferimento di materiale genetico da una cellula batterica all'altra tramite l'aiuto di batteriofagi che fungono da veicolo delle informazioni contenute in frammenti di ADN batterico.

Due sono i meccanismi molecolari di trasduzione: generalizzato e specializzato, meccanismi ai quali corrispondono due modalità diverse d'infezione delle cellule batteriche da parte dei batteriofagi, il ciclo litico e il ciclo lisogeno.

Ciclo litico

In una popolazione di batteriofagi si possono riscontrare due tipi di particelle virali: quelle che contengono solo ADN fagico (fagi infettivi); quelle che contengono solo ADN batterico, circa l'1% (fagi trasduttori), e che richiedono per la loro formazione la rottura del cromosoma dell'ospite in tanti frammenti della lunghezza di un genoma fagico. Ciascun fago trasduttore racchiude nel proprio capside un frammento diverso di ADN batterico per cui i geni vengono trasferiti

a caso; in altre parole è in grado di trasferire qualunque gene.

È questa la trasduzione generalizzata in cui l'ADN iniettato in una cellula sensibile può andare incontro a diverse evenienze alternative: può integrarsi nel cromosoma batterico e essere trasmesso alla discendenza; può essere degradato dall'endonucleasi di restrizione fagica; può, infine, rimaner libero nel citoplasma senza ricombinarsi e quindi, pur esprimendosi fenotipicamente, diluirsi nella progenie.

La trasduzione intraspecifica generalizzata è stata dimostrata nelle enterobatteriacee in genere, in *Pseudomonas* e *Vibrio* nonché in *Bacillus* e *Staphylococcus.*

È quindi possibile, sulla base di quanto è stato sinteticamente ricordato, che alcuni fagi trasduttori possano eventualmente accogliere nella loro testa un frammento di cromosoma con geni che codifichino resistenza verso farmaci antibatterici; questo frammento potrà essere poi trasmesso, anche se a bassa frequenza, a cellule sensibili che diverranno resistenti allorché si integrerà a livello del loro cromosoma. L'evenienza prospettata potrà riguardare al massimo una o due insensibilità, data la esiguità di ADN batterico che il capside del fago può contenere: l'1-2% del cromosoma.

D'altro canto anche i plasmidi R possono essere trasmessi per trasduzione. Basti pensare ad alcuni esperimenti nei quali lo spettro di resistenza multipla Su-Sm-Tc-Cm poteva non solo essere trasdotto dal fago P1 a cellule sensibili di stipiti di *E. coli* ma a sua volta il plasmide R poteva essere trasferito da questi ceppi ad altri mediante coniugazione (Falkow 1975). A ciò aggiungasi che sono stati isolati diversi ibridi tra plasmidi R e fagi infettivi [P1 Cm (Kondo e Mitsuashi 1964), P1Tc (Mise e Arber, 1976), P1Cm Sm Su (Iida Arber, 1977), P22Tc (Dubnau e Stocker, 1964), P22 Cm (Mise, 1976)], anche se non è da escludere che alcuni siano formati dalla inserzione di trasposoni nel genoma fagico (Mise e Nakaya, 1977).

Ciclo lisogeno

Nel ciclo lisogeno il genoma di un fago temperato si integra col cromosoma batterico, secondo il modello proposto da Campbell da considerarsi tuttora, alla prova dei fatti sperimentali, fondamentalmente valido, e passa allo stato di profago.

Allorché si verifica un'induzione spontanea, alquanto rara, o per

trattamento con agenti mutageni, si determina il preciso distacco del profago dal cromosoma batterico per un fenomeno inverso di *cross over* tra le due regioni omologhe alle estremità del profago stesso e inizia così il ciclo litico. In tale fase di escissione, tuttavia, la rottura e la ricongiunzione del genoma fagico integrato in una cellula su 10^5, non interessano le sue due estremità ma si verificano tra un tratto dell'ADN del profago e un tratto del cromosoma immediatamente adiacente. Ciò porta alla formazione di batteriofagi in cui una parte del loro genoma è stata sostituita con un segmento di cromosoma della cellula ospite e che, essendo di norma privi di alcuni elementi fagici essenziali, sono incapaci di causare il ciclo litico e vengono definiti pertanto difettivi.

È questa la trasduzione specializzata, ristretta o localizzata in quanto le particelle virali che si generano col meccanismo sopra descritto possono solo mobilizzare i geni strettamente contigui al genoma del profago.

Nei batteri lisogeni l'ADN del profago, pur replicandosi con il nucleo, non si esprime fenotipicamente in quanto non vengono di norma trascritti i relativi geni. Pur tuttavia, in alcuni casi, un tratto del genoma del profago può specificare il proprio fenotipo con la comparsa di nuovi caratteri (conversione lisogena) come la produzione della tossina difterica da parte degli stipiti di *Corynebacterium diphteriae* dotati di profago beta.

Da quanto ricordato sulla trasduzione specializzata appare evidente che se l'eventualità di una trasmissione di caratteri di resistenza a cellule sensibili con tale meccanismo è alquanto remota, è tuttavia possibile; pure possibile è la formazione di profagi ibridi derivanti dall'unione dei fagi infettivi, P1 e P22, e plasmidi R con spettri di insensibilità multipla (Ap-Sm-Su-Tc, Cm-Km-Sm-Su, ecc....). Tali profagi che ospitano determinanti di resistenza trasposti nel proprio genoma, qualora vengano sottoposti alla irradiazione con raggi ultravioletti, danno luogo a numerose particelle fagiche che « trasducono » i marcatori di insensibilità ad alta frequenza per conversione lisogena (Mise e Makaya, 1977).

5 - *Acquisizione della resistenza agli antibiotici e/o ai chemioterapici per coniugazione*

Si deve ai ricercatori giapponesi la scoperta della resistenza multipla agli antibiotici e ai chemioterapici allorché, in episodi di dissenteria bacillare, misero in evidenza stipiti di *Shigella dysenteriae* resistenti contemporaneamente a sulfamidici, tetraciclina, streptomicina e cloramfenicolo, farmaci che, come è noto, agiscono con meccanismi d'azione diversi. Era quindi molto improbabile che la contemporanea insensibilità ai quattro antibatterici fosse da imputarsi a fenomeni di mutazione, in quanto, se in laboratorio è possibile selezionare, anche se con grande difficoltà, stipiti batterici resistenti a due o tre antibiotici, questi dimostrano di possedere una crescita molto lenta e stentata.

La comprensione del fenomeno avvenne da una osservazione apparentemente marginale: dalle feci dei pazienti era possibile isolare contemporaneamente sia stipiti di *Shigella* che di *E. coli* con lo stesso spettro di resistenza. Questa coincidenza apparve strana e si pensò che la insensibilità ai quattro farmaci poteva essere trasmessa da *E. coli* multiresistenti a stipiti sensibili di *Shigella.*

La verifica sperimentale dell'ipotesi prospettata fu ottenuta da Akiba (1960) e Ochiai (1959), allorché in colture liquide, riuscirono a trasmettere la insensibilità multipla da stipiti di *E. coli* a ceppi di bacillo di Shiga.

Ricerche successive non solo confermarono la tesi degli autori citati ma, sulla base delle conoscenze acquisite sul fattore F, portarono alla scoperta del fattore R, fattore che si esprime immediatamente senza che sia necessario attendere, come negli incroci dei ceppi mutanti Hfr, un certo numero di scissioni cellulari affinché si verifichi la segregazione dei geni di sensibilità.

Si può pertanto comprendere come i batteri R^+ siano in grado non solo di « infettare » per coniugazione intere popolazioni di batteri sensibili, ma dato che i plasmidi son capaci di replicazione autonoma, lo stato di resistenza ai farmaci antibatterici può essere trasmesso anche alle generazioni successive attraverso i normali processi di moltiplicazione delle cellule. Ecco perché si può parlare di carattere epidemico della resistenza (fig. 1).

Coniugazione: definizione

Secondo Novick et al. (1976) la coniugazione è un processo di scambio genetico tra batteri dipendente da un contatto cellulare, durante il quale materiale genetico viene trasferito da un organismo (il donatore) all'altro (l'accettore). La definizione citata è valida non solo per quanto concerne il fattore F, il cosiddetto fattore di fertilità, la cui presenza o meno a livello di citoplasma cellulare può definire un batterio maschio o femmina, ma a tutto quell'insieme di elementi genetici extracellulari che vanno sotto il nome di plasmidi, in particolare di quelli R.

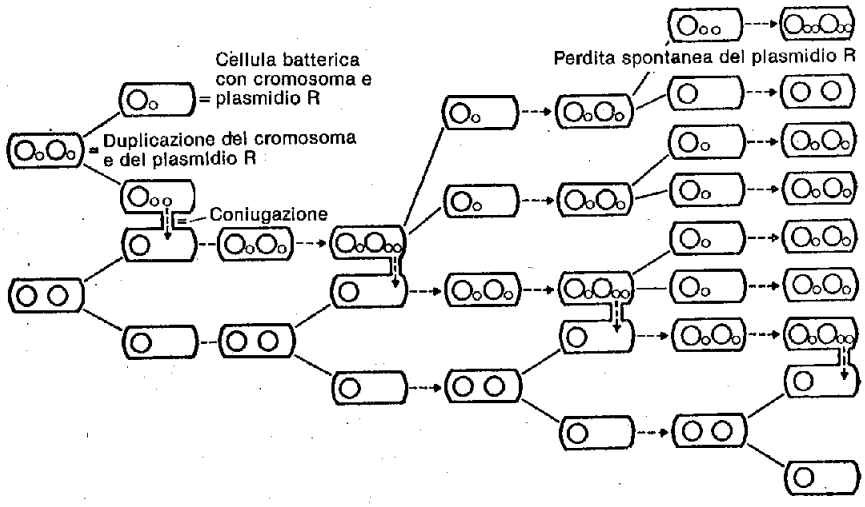


FIG. 1: Schema della diffusione di un plasmidio R in una popolazione di batteri (Drews, 1979).

I plasmidi

I plasmidi sono dei repliconi che vengono facilmente mantenuti, senza selezione specifica, in uno stato extracromosomico; in particolare quelli R portano informazioni genetiche di resistenza (tabella n. 1)

agli antibiotici e/o ai chemioterapici (Novick et al. 1976).

La loro struttura, negli intervalli tra una replicazione e l'altra, consiste in molecole di ADN in forma cosiddetta CCC (molecole circolari covalentemente chiuse); in altre parole trattasi di due filamenti di ADN disposti ad elica uniti da legami covalenti che formano una struttura circolare. Allorché viene isolata extracellularmente la molecola assume la forma di « supercoil » essendo la spirale dell'ADN ritorta su se stessa (Clowes, 1972).

I plasmidi vengono definiti coniugativi se determinano il trasferimento di ADN per coniugazione; in caso contrario non coniugativi (Novick et al. 1976). Sinonimo dei primi sono: plasmidi trasmissibili, trasferoni, coniugani e, per estensione, fattori sessuali e fattori di fertilità.

I plasmidi R coniugativi si riscontrano di norma nei batteri Gram negativi, in particolare in tutte le specie delle enterobatteriacee, ma anche in qualche rara specie Gram positiva. Sono in genere di grandi dimensioni, superiori ai 17 Megadalton (Crosa et al., 1975), di norma tra i 40-70 Mdal (Grindley et al. 1973); ad esempio il peso molecolare dei plasmidi Su di stipiti di *E. coli* e di *Shigella* varia tra $53x10^6$ a $59x10^6$ ds (Davey e Pittard, 1974). La loro replicazione è indipendente da quella del cromosoma ed è attentamente controllata da un meccanismo i cui determinanti sono in parte localizzati nella molecola plasmidica (Taylor e Cohen, 1979; Kollek et al., 1978). Il loro numero è di 1-3 copie per cromosoma di *E. coli*.

I plasmidi R non coniugativi si riscontrano in alto numero nelle stesse specie Gram negative che ospitano i trasferoni e nei batteri Gram positivi, specie negli stafilococchi, in cui non è mai stato osservato il fenomeno della coniugazione. Il loro peso varia da 1 a 10 Mdal e il loro numero di copie può variare da 10 a 20 per cromosoma di *E. coli* (Smith et al., 1974); in questa ultima specie e in *Shigella* il peso molecolare dei plasmidi non coniugativi Su varia tra $3,5x10^6$ - $3,9x10^6$ (Mitsuhashi et al., 1977). Possono essere trasferiti ad altre cellule mediante il processo di mobilizzazione, determinato da plasmidi coniugativi R e Col, e dare inoltre origine ai cosiddetti cointegrati (v. oltre).

La prassi più comune di classificazione dei plasmidi R è quella di ordinarli secondo l'incompatibilità, a seconda, cioè dell'incapacità di due diversi plasmidi di coesistere stabilmente nella stessa cellula che li ospita in assenza di una pressione selettiva persistente (Novick

TABELLA 1: Determinanti di resistenza dei plasmidi R.

Antibiotici o Chemioterapici	Abbreviazione del determinante
Amikacina	Ak
Ampicillina	Ap
Butirosina	Bt
Carbenicillina	Cb
Cefaloxina	Ce
Cloramfenicolo	Cm
Cefalosporina	Cp
Cefaloridina	Cr
Cloxacillina	Cx
3', 4' Dideossikanamicina B	Dm
Eritromicina	Em
Fusidico, acido	Fa
Gentamicina	Gm
Kanamicina	Km
Lividomicina	Lv
Meticillina	Mc
Neomicina	Nm
Oxacillina	Ox
Penicillina	Pc
Paramomicina	Pm
Ribostamicina	Rm
Streptomicina	Sm
Spectinomicina	Sp
Sulfamidici	Su
Tetraciclina	Tc
Tobramicina	Tm
Trimethoprim	Tp

et al., 1976). Sulla base enunciata, fra i trasferoni degli enterobatteri trasmissibili ad *E. coli,* sono stati definiti 16 gruppi di compatibilità (tabella n. 2) in quanto i plasmidi R incompatibili fra loro sono stati classificati nella stessa classe. Ad esempio i fattori F, non potendo coesistere stabilmente nella stessa cellula, sono stati assegnati al gruppo di compatibilità FI (Datta, 1975 a e b; Le Minor et al., 1976).

I plasmidi di *Pseudomonas aeruginosa* possono essere grosso modo suddivisi in due classi: quelli che possono essere trasferiti agli enterobatteri e quelli che sono trasmessi solo tra specie di *Pseudomonas.* Sulla base della incompatibilità possono inoltre essere classificati in otto gruppi dove i plasmidi appartenenti a P-1 possono essere trasmessi ad *E. coli* mentre quelli di P-2 e P-3 non lo sono affatto (Jacoby, 1977).

Il trasferimento dei plasmidi R si verifica ad una frequenza notevolmente inferiore se comparato ai fattori F che di norma vengono trasmessi da tutte le cellule F^+. La spiegazione sta nel fatto che generalmente i primi sono in uno stato represso; in altre parole viene impedita la formazione dei pili sessuali, per cui la frequenza delle cellule piliate è limitata a 10^{-4} - 10^{-5} dell'intera popolazione R.

Una particolarità, infatti, di molti plasmidi R è quella di inibire la funzione di F allorché vengono trasferite a cellule F^+, Hfr, F'; negli stipiti Hfr, ad esempio, nei quali la frequenza di trasferimenti del cromosoma è perfino del 100%, allorché passano a $HfrR^+$, essa viene ridotta a meno dell'1%. A tali plasmidi, che furono designati da Watanabe et al. (1964) Rfi^+ (*fertility inhibition*), si contrappongono gli Rfi^- che, anche se non reprimono la fertilità di F e causano la formazione di pili diversi da quelli codificati dal fattore F, purtuttavia vengono trasmessi con la stessa bassa frequenza dei primi.

Pili sessuali e proteina d

I pili sessuali sono appendici filamentose, di natura proteica, che aggettano dalla parete dei batteri e che, qualunque sia il meccanismo di trasferimento di ADN da una cellula all'altra, appaiono coinvolti nel processo di coniugazione. La lunghezza dei pili F è circa 20 μm, mentre il loro diametro è di circa 85 A° (Falkow, 1975). Sono siti di adsorbimento di batteriofagi maschio-specifici: i fagi ARN sulle superfici laterali, quelli ADN alle estremità. Usando come criterio di classifi-

cazione la specificità dei fagi è stato possibile individuare oltre i due supergruppi F ed I, supergruppi che possono essere distinti fra loro morfologicamente e immunologicamente (Lawn et al., 1967; Lawn e Meynell, 1970), alcuni altri gruppi di compatibilità: E, W e P (Bradley, 1976 e 1974; Achtman e Skurray, 1977).

La ultrastruttura dei pili non è ancora stata accertata in via definitiva: la tubolare ipotizzata da Brintom (1965) e successivamente modificata dallo stesso Autore (1971) in quella dei due bastoncini paralleli, ha reso del tutto improbabile la supposizione che il pilo serva come veicolo di trasferimento dell'ADN. La funzione dei pili, quindi, è ancora in parte ignota.

Secondo alcuni autori servirebbero come organelli di riconoscimento e di ancoraggio delle cellule accettrici e per porre i batteri, nelle premesse della coniugazione, a stretto contatto fra loro, parete contro parete, poiché sarebbero in grado di retrarsi (Curtiss, 1969; Marvin e Hohn, 1969; Ou e Anderson, 1970).

Strettamente correlata alla funzione dei pili sessuali è una particolare proteina della membrana esterna di *E. coli* variamente definita: d (Lugtenberg et al., 1975), G (Chai e Foulds, 1974) 3a (Schnaitman, 1974), del peso molecolare di circa 28.000 daltons (Hindennach e Henning, 1975) e presente in circa 10^5 copie per cellula, che si suppone essere il prodotto di un gene chiamato ompA (Datta et al., 1976). L'interesse attorno a questa proteina deriva dal fatto che i mutanti (Con^-) sono di norma cattivi accettori nella coniugazione con donatori F^+ (Manning et al., 1976); si è pensato pertanto che rappresenti il ricettore sito sulla superficie cellulare che tramite i pili sessuali serva per l'appaiamento e per la aggregazione delle cellule durante la coniugazione.

Hoekstra e Havekes (1979), sulla base delle loro ricerche, sono del parere che le cellule accettrici di *E. coli* K12, al fine di interagire con cellule donatrici di tipo F, abbisognino oltre che della proteina d anche di LPS funzionali. Avvalorano l'ipotesi prospettata la dimostrazione che i mutanti $ConF^-$ difettano della proteina d o di LPS intatti e la costatazione che solo la proteina d e i LPS inibiscono l'attività del donatore. Gli AA. citati hanno inoltre messo in evidenza che i soli liposaccaridi sono importanti nella attività delle cellule accettrici nella coniugazione di tipo I.

TABELLA 2: Classificazione dei plasmidi coniugativi a seconda della compatibilità in Escherichia coli K-12 (Achtman e Skurray 1977).

Compatibilità		Pili sessuali	Rappresentanti
Supergruppo F			
	FI	F	F42, R386, ColV2
	FII	tre gruppi simili ad F	R1, R100, R538-1, R136
	FIII	simili ad F	ColB-K98, MIP240, Hly
Supergruppo I			
	I alpha	I	R64, R144, ColIb-P9
	I2	simile ad I	TP114, MIP241, Hly
Altri gruppi			
	C		R40a, R576-1
	H		R27, R726-1
	J		R391, R391-3b-1
	L		R472, R831
	M		R4466, R930
	N	N	N3, R447b
	O		R7, R724
	P	RP4	RP4, R702
	S		R478, R477-1
	T	E	Rts1, R401
	W	W	S-a, R388

Interazioni cellulari durante la coniugazione

Il trasferimento di ADN durante la coniugazione richiede l'appaiamento o la formazione di aggregati di cellule donatrici e accettrici; conseguentemente è essenziale la presenza dei pili sessuali che vengono codificati dai geni del plasmidio del donatore in numero di 1-8 (Falkow, 1975). Secondo Achtman e Skurray (1977), nella coniugazione dei batteri dei sottogruppi di compatibilità F e I con cellule accettrici sensibili, si osservano più paia che aggregati anche se il numero delle cellule aggregatesi supera quello delle appaiate.

Premessa indispensabile alle interazioni cellulari che si verificano durante la coniugazione è la osservazione che le cellule batteriche, che ospitano dei plasmidi R, sono di norma pessime accettrici nei confronti di donatori che albergano elementi genetici dello stesso gruppo di compatibilità ma non nei confronti di altri repliconi che appartengono ad altri gruppi (Watanabe et al., 1964). Questo fenomeno, definito « entry exclusion » o « surface exclusion », che non permette l'entrata tramite la coniugazione di un plasmidio correlato (Meynell, 1969; Datta e Hedges, 1971; Watanabe et al., 1962a; 1964), è dovuto al fatto che l'elemento genetico di resistenza residente codifica delle modificazioni dei ricettori cellulari di superficie impedendo così il contatto con i pili sessuali della cellula donatrice.

Seguendo l'iter degli eventi che si verificano durante la coniugazione l'interazione iniziale si verificherebbe tra l'estremità dei pili del donatore e i ricettori superficiali (proteina d, LPS) della cellula accettrice, a cui seguirebbe, per contrazione del pilo sessuale, il contatto parete contro parete (Brinton, 1971). Si verificherebbe quindi la tappa di stabilizzazione, tappa necessaria in quanto la proteina d sembrerebbe essenziale per la formazione di aggregati stabili (Achtman e Skurray, 1977).

Il trasferimento del plasmidio inizia allorché una endonucleasi scinde un filamento di ADN in un sito specifico, filamento che si trasferisce mentre quello complementare rimane nel donatore e ripristina la forma cosiddetta a CCC. Il filamento che giunge nella cellula accettrice viene a sua volta convertito in ADN circolare a doppio filamento, che poi viene utilizzato per la trascrizione e la traduzione delle proteine codificate dal plasmidio (*rolling circle model*) (Gilbert e Dressler, 1968).

Fra le proteine elaborate dalla cellula accettrice Achtman e Skurray (1977) suppongono che debba esisterne una che disaggreghi le cellule coniugantisi e la cui sintesi sarebbe contemporanea a quella delle proteine destinate alla formazione dei pili e del fenomeno di esclusione di entrata. Con queste sintesi terminano così tutti i fenomeni legati all'interazione cellulare essendosi ora la cellula accettrice trasformata in un donatore.

Il trasferimento di un plasmidio R è abbastanza rapido. In un esperimento condotto da Falkow (1975), in cui fu usato un mutante derepresso di *E. coli* come donatore e come accettore un ceppo di *E. coli* sensibile, iniziò entro cinque minuti dall'unione delle due popolazioni e fu completato in quindici minuti; la seconda ripresa del trasferimento iniziò quindici minuti dopo la fine del primo.

Nel breve periodo di tempo ricordato è interessante far notare che la cellula accettrice replica l'ADN del plasmidio R, sintetizza il pilo sessuale e presumibilmente altre proteine ed è capace di trasferire rapidamente il fattore genetico di resistenza, come d'altra parte assai rapidamente si manifesta l'espressione fenotipica della insensibilità.

In una indagine, infatti, riportata da Falkow (1975) la resistenza ai sulfamidici, kanamicina e cloramfenicolo, codificata in un plasmidio ospitato da *E. coli,* si completò nelle cellule dello stipite sensibile (*E. coli*) tra il 6° e il 20° minuto dal trasferimento dell'elemento genetico, mentre per la streptomicina il periodo di tempo fu più lungo, tra il 20° e il 60° minuto.

Meccanismi dell'antibiotico-resistenza legata ai plasmidi

Come abbiamo già avuto occasione di ricordare i plasmidi R codificano, in generale, degli enzimi che sono in grado di inattivare gli antibiotici. Ad esempio, come riporta la tabella n. 3, il cloramfenicolo viene acetilato da una acetilasi specifica, l'anello lattamico delle penicilline viene idrolizzato e gli aminoglicosidi subiscono processi di fosforilizzazione, acetilazione e adenilazione. Relativamente alle tetracicline non si comprende la base molecolare della insensibilità per quanto sia noto che i batteri Tc^r accumulino meno antibiotici delle cellule sensibili (Franklin e Godfrey, 1965; Isaki e Arima, 1963). Levy e McMurry (1978) sono del parare che la resistenza plasmidica in *E. coli* alle tetracicline non comporta una loro degradazione o inattiva-

TABELLA 3: Enzimi che inattivano gli antibiotici nella resistezna mediata da plasmidi (da Novick et al., 1976).

Genotipo	Enzimi	Resistenza a:
aacA	aminoglicoside 6'-N-acetiltransferasi	dideossikanamicina, butirossina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, neomicina
aacB	aminoglicoside 2'-N-acetiltransferasi	butirossina, dideossikanamicina B, gentamicina, lividomicina, neomicina, paramomicina
aacC	aminoglicoside 3'-N-acetiltransferasi	dideossikanamicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, paramomicina, ribostamicina
aphA	aminoglicoside 3'-fosfotransferasi	butirossina, kanamicina, lividomicina, neomicina, paramomicina, ribostamicina
aphB	aminoglicoside 5''-fosfotransferasi	ribostamicina
aadA	aminoglicoside 3''-adeniltransferasi	streptomicina, spectinomicina
aadB	aminoglicoside 2''-adeniltransferasi	dideossikanamicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina
bla	β-lattamasi	ampicillina, cefaloridina, cloxacillina, meticillina, carbenicilina, cefaloxina, cefalosporina, oxacillina, penicillina
cat	cloramfenicolo acetiltransferasi	cloramfenicolo
erm	metilasi ARN dei ribosomi	eritromicina
dfr	diidrofolato riduttasi	trimethoprim

zione, ma suppongono che sussista una inibizione interna all'attività del farmaco antibatterico.

Né va sottovalutato, a questo punto, il fenomeno della resistenza crociata verso sostanze antibatteriche dello stesso gruppo. Se è a tutti nota quella codificata dai plasmidi R nei confronti delle tetracicline e delle minocicline e dei sulfamidici in genere, meno nota è l'osservazione che uno stipite di *E. coli* resistente alla streptomicina può esserlo anche verso la spectinomicina dato che il gene aadA codifica lo stesso enzima: l'aminoglicoside 3''-adeniltransferasi. Ciò vale anche per la kanamicina rispetto a gentamicina, neomicina, paranomicina, ribostamicina, tobramicina e 3'-4'-dideossikanamicina B allorché il gene aacC codifica l'enzima: aminoglicoside 3-N-acetiltransferasi (tabella n. 3).

Questa multiresistenza, oltre che dagli antibiotici dello stesso gruppo, viene conferita al batterio che ospita un plasmidio R anche da farmaci che agiscono con meccanismi d'azione diversi (macrolidi, tetracicline, cloramfenicolo, sulfamidici ecc...) tanto che il numero degli antibatterici verso i quali non si conoscono elementi genetici di resistenza sono rari: ac. nalidixico, rifampicina, polimixina.

6 - *Sequenze di traslocamento* (transposable elements)

Le sequenze di traslocamento (*transposable elements*) sono specifici segmenti di ADN che possono ripetutamente inserirsi in alcuni o molti punti di un genoma. Vengono classificate in sequenze di inserzione (IS), in trasposoni e in episomi (Campbell et al., 1979).

Sequenze di inserzione

Le sequenze di inserzione (elementi IS) sono tratti di ADN, generalmente più corti di 2.000 paia di basi (2Kb), che non è noto se contengano geni che siano correlati alle loro funzioni di inserimento (Campbell et al., 1979). Identificate sulla base delle mutazioni polari che causano nel punto in cui si inseriscono a livello del cromosoma, si differenziano sulla base della lunghezza e della sequenza dei nucleotidi (IS1, IS2, IS3, IS4, IS5). Sembrano mediare l'integrazione di un segmento di informazioni genetiche in un altro comportandosi come punti di integrazione nel singolo replicone dei tratti di ADN che traslocano da altre fonti (Shapiro et al., 1977).

Trasposoni

Come precedentemente è stato segnalato è noto che esistono plasmidi R coniugativi, capaci cioè di determinare il trasferimento dal DNA, e plasmidi non coniugativi che, pur non possedendo questa proprietà, possono, non di meno, codificare geni di insensibilità ai farmaci antibatterici. Astraendo da questa netta distinzione una singolare proprietà tuttavia li accomuna: i determinanti di resistenza delle due classi di plasmidi possono essere trasposti, superando anche le severe barriere di specie, in altri repliconi: cromosoma batterico, genoma di un batteriofago temperato, plasmidi A, F, Flac, ecc... (Hedges e Jacob, 1974; Heffron et al., 1975; Kopeko e Cohen, 1975; Berg et al., 1975; Foster et al. 1975).

Tale meccanismo di trasposizione, definito anche di ricombinazione illegittima, è, in *E. coli,* indipendente dai normali meccanismi di coniugazione e non sembra richiedere né omologia di sequenza dei nucleotidi né l'azione di quei geni di ricombinazione che notoriamente funzionano nel « crossing over » di regioni di cromosomi omologhi (Kopeko e Cohen, 1975; Heffron et al., 1975; Kleckner et al., 1975; Berg et al., 1975; Barth et al. 1976).

I trasposoni (Hedges e Jacob, 1974) sono gli elementi genetici la cui lunghezza supera le 2.000 paia di basi, che traslocano intatti da un locus di un genoma ad un altro: da un plasmidio al genoma di un batteriofago, dall'ADN del batteriofago al cromosoma, dal cromosoma ad un plasmidio.

Strutturalmente appaiono costituiti da un segmento di ADN, in cui sono presenti i geni che codificano la resistenza ai farmaci antibatterici, e da sequenze ripetute di nucleotidi di diversa lunghezza (80-1.700 paia di basi) site alle sue estremità e che in alcuni casi sono identificabili con gli elementi IS1, IS2, IS3.

Queste ripetizioni terminali talora sono parallele ma generalmente sono invertite. In quest'ultimo caso gli « heteroduplexes » tra il filamento del replicone e il suo omologo dà origine alla cosiddetta struttura a « lecca-lecca » costituita cioè dalle sequenze invertite in doppio filamento (il bastoncino) e da un'ansa responsabile dei caratteri di resistenza (la caramella) (Shapiro et al., 1977).

La tendenza dei determinanti di resistenza a dissociarsi dai plasmidi e a ricombinarsi con altri elementi genetici è correlata alle sequenze

di inserzione che non solo sembrano promuovere il movimento dei trasposoni da un genoma all'altro ma anche mediare l'integrazione dei plasmidi nel cromosoma dell'ospite e causare la ricombinazione fra gli ADN dei plasmidi stessi e negli stessi elementi genetici (Mitsuhashi et al., 1977).

Le sequenze di trasposizione o trasponi vengono abbreviate in Tn a cui vengono aggiunte le lettere del locus: Ap per ampicillina, Cm per cloramfenicolo, ecc... Altri preferiscono assegnare un numero diverso a ciascun trasposone isolato anche se apparentemente identico ad altri già reperiti facendo seguire, tra parentesi, la funzione del gene; ad esempio: Tc 1 (Ap).

L'inserzione dei trasposoni a livello dei repliconi si verifica, di norma, in vari punti ma non a caso. Il TnAp, ad esempio, è capace di inserirsi in un minimo di 19 punti del genoma del plasmidio RSF 1010; ciò fa pensare che possa riconoscere una specifica ma alquanto comune sequenza di nucleotidi in corrispondenza o in prossimità del punto di inserzione del genoma accettore (Heffron et al., 1977). Così pure l'inserzione del Tn10(Cc) dimostra una definita specificità per particolari siti e preferenze per alcuni rispetto ad altri (Botstein e Kleckner, 1977); anche il Tn7 (Tp-Sm) si integrerebbe in un limitato numero di punti (Barth et al., 1976).

I più noti trasposoni e i plasmidi di origine sono stati riportati nella tabella n. 4.

Da quanto è noto sulle sequenze di trasposizione, le considerazioni di ordine epidemiologico che possono trarsi sono senz'altro interessanti. Secondo Heffron et al. (1977) le sequenze di trasposizione ci aiuterebbero a capire:

— la rapida evoluzione dei plasmidi R grazie alla capacità dei geni di essere trasposti in altre molecole di DNA indipendentemente dai meccanismi normali di ricombinazione legati ai geni rec^+;
— la comunanza di geni di resistenza identici in plasmidi R della più disparata origine evolutiva;
— la improvvisa comparsa dell'antibiotico-resistenza nel corredo di plasmidi di specie batteriche non appartenenti ai batteri intestinali e precedentemente sensibili ai farmaci antibatterici.

TABELLA 4: Trasposoni (Campbell et al., 1979).

Sequenze di traslocamento	Plasmidio: origine	Marcatori di resistenza
Tn1	RP4	Ap
Tn2	RSF1030	Ap
Tn3	R1	Ap
Tn4	R1	Ap, Sm, Su
Tn5	JR67	Km
Tn6	JR72	Km
Tn7	R483	Tp, Sm
Tn9	pSM14	Cm
Tn10	R100	Tc
Tn551	p1258	Em

Secondo Berg et al. (1978) il fenomeno della trasposizione accelererebbe la disseminazione dei geni di resistenza fra le popolazioni batteriche. Nel caso poi del Tn5 (Km) l'assenza di una richiesta di particolari sequenze di nucleotidi per l'inserzione e di omologia tra molecole che vengono donate ed accettate dovrebbe permettere all'elemento genetico di passare liberamente da cromosomi non imparentati a plasmidi ospiti della stessa cellula. Il senso unico delle traslocazioni aumenterebbe poi la frequenza del Tn5 fra le molecole di DNA in assenza di selezione.

La frequenza con la quale il fenomeno della trasposizione delle sequenze si verifica in condizioni naturali è nota solo in parte. Se si pensa, tuttavia, all'uso massiccio dei farmaci antibatterici in medicina umana e veterinaria e alla forte pressione selettiva che essi esercitano si deve supporre che l'evento segnalato non dovrebbe costituire una rara realtà.

Secondo Heffron et al. (1977), infatti, l'ampia distribuzione della resistenza all'ampicillina in molti diversi plasmidi e la rapida comparsa di plasmidi R, Ap^r, subito dopo che le popolazioni batteriche vengono esposte alle penicilline a livelli terapeutici o subterapeutici, posso-

no essere prese come prova dell'efficenza della trasposizione del TnAp in natura.

Il riscontro di sequenze di inserzione (IS1, IS2, IS3) alle estremità di alcuni plasmidi conferirebbe loro, secondo Shapiro et al (1977), un particolare significato evolutivo: gli elementi fornirebbero i punti di integrazione nel replicone degli ADN provenienti da varie fonti.

Qualora si volesse concretizzare tale concetto si potrebbe pensare, secondo gli AA. citati, agli IS come a degli incastri, a dei giunti per la costruzione modulare di genomi. Per mezzo di loro potrebbero così ristrutturarsi nuovi repliconi offrendo così un evidente vantaggio selettivo ai batteri allorché si verificano repentine modificazioni della pressione selettiva ambientale. Non bisogna dimenticare a questo proposito che nei ceppi selvaggi delle enterobatteriacee esistono numerosissimi plasmidi non coniugativi di cui non conosciamo la espressione fenotipica dei geni che li compongono (Møller et al., 1978), come del resto dei noti plasmidi R, che contengono sufficiente ADN per specificare un minimo di cinquanta prodotti di geni (Clowes, 1972), conosciamo, in sostanza, solo quelli che codificano gli enzimi per la inattivazione degli antibiotici.

Cointegrati

Le sequenze di inserzione (IS) oltre ad essere implicate nei processi di trasposizione delle sequenze di traslocamento, partecipano anche al fenomeno di cointegrazione dei plasmidi. Novick et al. (1976) definiscono come cointegrato un elemento genetico costituito da due o più repliconi disposti in continuità lineare covalente e capaci di replicazione fisicamente indipendente.

La definizione accennata, che può applicarsi ai cromosomi con profagi o plasmidi integrati (fattore F), interessa, in particolare i plasmidi compositi, quelli cioè composti di due o più elementi genetici funzionalmente diversi che possono associarsi o dissociarsi in determinate condizioni.

Tipico esempio sono i plasmidi R del gruppo di compatibilità F II (R1, R6, R100) che si comportano, allorché sono ospitati nelle cellule dei vari membri delle Enterobacteriaceae, in modi del tutto diversi. Mentre in *Escherichia coli* si mantengono come repliconi compositi, composti cioè da un RTF-Tc unito a un determinante r che presenta

altri geni di resistenza (Cohen e Miller, 1970; Nisioka et al., 1980; Rownd et al., 1971; Rownd et al., 1975), in *Salmonella typhimurium* il plasmidio si dissocia in elementi separati consistenti in un componente non coniugativo che porta i geni della insensibilità e in un plasmidio coniugativo responsabile del trasferimento (Sheephy et al., 1973). In *Proteus mirabilis* invece i plasmidi R del gruppo FII, allorché le cellule che li ospitano vengono coltivate in terreni senza antibiotici, si comportano come elementi genetici compositi (Perlman e Rownd, 1975; Rownd et al., 1975) consistendo il DNA del plasmidio di un RTF legato ad una singola copia di determinante r.

Tuttavia dopo prolungato periodo di sviluppo in un substrato contenente antibiotici, accanto ad un DNA del plasmidio R costituito da sequenze multiple di determinanti r disposte in fila e unite ad una unica copia di RTF-Tc^r, compaiono anche molecole autonome composte di varie unità di determinanti r (Perlman e Rownd, 1975; Rownd et al., 1975; Rownd et al., 1975).

Nei plasmidi del gruppo di incompatibilità FII un elemento IS1 separa il cosiddetto RTF dal determinante r nei due punti in cui si uniscono; entrambe le inserzioni semplici sono orientate nella stessa direzione (Hu et al., 1975; Ptashne e Cohen, 1975).

L'identificazione degli elementi IS ha permesso l'ideazione da parte di Ptashne e Cohen (1975) di un modello per spiegare il possibile meccanismo della dissociazione e della formazione dei plasmidi R cointegrati, nonché del processo di amplificazione dei geni dell'antibiotico-resistenza, amplificazione che potrebbe derivare dalla ricombinazione di omologhi elementi IS1 di determinanti r e conseguente formazione di un plasmidio R costituito da molte copie degli stessi determinanti r.

Secondo Perlman e Stickgold (1977) l'amplificazione consisterebbe invece nel distacco del determinante r dai plasmidi R, dalla sua replicazione autonoma e conseguente formazione di determinanti r monomeri e polimeri, e dalla eventuale reintegrazione di molte copie di determinanti r disposte linearmente col RTF per formare un nuovo plasmide R.

Il meccanismo di amplificazione dei geni è reversibile (Hashimoto e Rownd, 1975; Rownd e Mickel, 1971; Rownd et al., 1975). Qualora le cellule già allevate in terreni addizionati di antibiotici vengano, in prosecuzione di tempo, coltivate in substrati che sono privi di antibiotici, si verifica la dissociazione dei singoli determinanti r dal pla-

smidio R e la loro diluizione nelle cellule che a mano a mano si sviluppano presumibilmente a causa della loro incapacità di replicarsi (Rownd et al., 1978).

Fattore F

Il fattore F, prototipo di fattore di fertilità, può esistere in due stati: come plasmidio e come episoma. Nel primo caso si comporta come un replicone indipendente e si riscontra libero nel citoplasma. Il batterio che lo ospita viene definito F^+ e considerato maschio in quanto può essere trasferito solo a cellule che, non possedendolo, sono chiamate F^- e reputate femmine. La conversione dei batteri F^- a F^+ è molto alta sfiorando talora il 100%; nell'incrocio $F^+ \times F^-$ si forma, tuttavia, anche una minima percentuale di ricombinanti dovuta al passaggio del fattore F dallo stato autonomo a quello integrato (Hfr).

Allorché il fattore F si comporta da episoma, ovverossia come sequenza di traslocamento, si integra col cromosoma e, dopo che questi si è franto in un sito specifico, riesce a mobilizzarlo e a trasferirlo a batteri F^-. In questo processo di scambio genetico si realizza, ad alta frequenza, il trasferimento orientato di tratti più o meno lunghi di cromosoma e le cellule donatrici e conseguentemente gli stipiti vengono definiti Hfr (mutanti ad alta frequenza di ricombinazione); le cellule riceventi diventano diploidi relativamente al segmento di cromosoma trasferito e dopo che si è verificata la ricombinazione si ha segregazione di cellule figlie aploidi normali.

È intuitivo comprendere come lo stato di Hfr, anche se l'eventualità di un incrocio Hfr x F^- è alquanto remota e solo una cellula su 10^2 - 10^4 è in grado di trasferire DNA cromosomico, rivesta interesse nel campo della resistenza ai farmaci antibatterici allorché si consideri l'eventualità che il segmento di genoma del donatore ospiti geni di insensibilità ad antibiotici e/o ai chemioterapici. Nei processi di ricombinazione i caratteri di resistenza possono essere incorporati nel cromosoma di cellule F^-. Diventa così possibile veder apparire, in stipiti di batteri precedentemente sensibili, fenomeni di resistenza sia fra ceppi della stessa specie che di genere diverso, in particolare fra le enterobatteriacee.

D'altro canto è possibile che l'evenienza sopraccitata si verifichi

anche negli incroci $F^+ \times F^-$ qualora vengano presi in considerazione i trasposoni correlandoli con le indagini di alcuni ricercatori giapponesi che riuscirono ad integrare il determinante Tc^r di un plasmidio R nel cromosoma di uno stipite di *E. coli.* Questi, infettato coi plasmidi F, Flac, R (Cm) e T, diede luogo ai ricombinanti: F - Tc^r, Flac-Tc^r, R (Cm) -Tc^r e T - Tc^r (Harada, 1967; Harada et al., 1967; Harada et al., 1964; Kameda et al., 1969; Mitsuhashi et al., 1969). In ricerche similari, da un ceppo di *E. coli* Cm^r, nel quale il determinante di resistenza era integrato nel cromosoma, furono invece ottenuti i seguenti ricombinanti: F - Cm^r e R (Tc) - Cm^r (Iyobe et al., 1969; Iyobe, 1970).

7 - *Epidemiologia dei plasmidi R*

I plasmidi sono responsabili della resistenza ai farmaci antibatterici nella maggior parte dei batteri patogeni, patogeni occasionali o semplicemente simbionti, specie fra le *Enterobacteriaceae*: *Escherichia, Salmonella, Shigella, Serratia, Proteus, Klebsiella, Providencia.* Altri taxa Gram negativi possono tuttavia ospitarli; fra questi annoveriamo: *Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Bordetella, Haemophilus, Pasteurella, Acinetobacter, Yersinia, Bacteroides, Neisseria, Rhizobium, Agrobacterium* (Cornelis et al., 1973; Terakado et al., 1973; Dang Van et al., 1975; Towner e Vivian, 1977; Mancini e Beheme, 1977; Berman e Hirsh, 1978; Mayer et al., 1974).

Possono pure riscontrarsi in batteri Gram positivi, stafilococchi e streptococchi in genere, ove il trasferimento dell'elemento genetico di resistenza avviene per trasduzione, *S. faecalis* e *S. agalactiae* (gruppo B), in cui la trasmissione dei plasmidi si verifica per un processo di coniugazione (Jacob e Hobbs, 1974; Horodniceanu et al., 1979), *Streptomyces caelicolor* (Vivian, 1971; Kirby et al., 1975; Hopwood e Wright, 1976), *Clostridium perfringens* (Sebald et al., 1975; Sebald e Brefort, 1975).

Il trasferimento intraspecifico per coniugazione di plasmidi R si riscontra soprattutto fra le specie Gram negative, in particolare fra gli enterobatteri, ma interessa specie Gram positive come *S. faecalis, S. agalactiae* e *Cl. perfringens.*

La trasmissione interspecifica si verifica non solo fra i membri dei vari generi che compongono le *Enterobacteriaceae,* ma fra queste e

Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas, Bordetella, ecc., nonché, ad esempio, fra *Bacteroides* ed *E. coli,* per non citare quella fra *S. faecalis* e *S. agalactiae.*

L'ampia rappresentanza di generi batterici alquanto lontani fra loro da un punto di vista tassonomico che ospitano plasmidi R solleva il problema, di grande interesse epidemiologico, sulla loro origine. Una ipotesi accettabile è stata formulata alcuni anni fa (Walker e Walker, 1970; Benveniste e Davies, 1973) allorché fu dimostrato che molti batteri che producono antibiotici (streptomiceti e actinomiceti) contemporaneamente posseggono enzimi che non solo li inattivano ma sono in tutto simili a quelli che caratterizzano l'antibiotico-resistenza dei batteri che albergano fattori R (Argoudelis e Coats, 1971; Dowding e Davies, 1975; Shaw e Hopwood, 1976).

Il trasferimento di informazioni genetiche dai batteri produttori di antibiotici alle specie R^+ che oggigiorno comunemente vengono isolate, oltre ad essersi verificato in un tempo assai remoto, deve essersi attuato in una serie di complicate sequenze che coinvolse specie batteriche appartenenti ai generi più disparati; forse più semplicemente si verificò tra *Streptomyces* e altri batteri del suolo (*Rhyzobium, Agrobacterium*) che possono averli trasmessi, probabilmente per trasformazione, a generi tassonomicamente correlati come gli enterobatteri (Dowding e Davies, 1975; Courvalin et al., 1978).

Tenendo presente l'ipotesi prospettata si deve a priori pensare che la comparsa dei plasmidi R nei batteri simbionti dell'uomo e degli animali domestici non corrisponda con l'inizio dell'era antibiotica.

Essi, infatti, erano già preesistenti come lo confermano delle indagini condotte su enterobatteri di popolazioni umane primitive delle isole Salomone (Gardner et al., 1969) e del Borneo (Davis e Anadan, 1970) nonché di polli della Kabilia, del Senegal e della Costa d'Avorio mai giunti a contatto con antibiotici (Jacquet e Coiffer, 1974).

La attuale ampia diffusione di batteri R^+ è senza alcuna ombra di dubbio da correlarsi alla forte pressione selettiva esercitata dal massiccio uso di farmaci antibatterici in medicina umana e in medicina veterinaria che non solo ha gradatamente messo in evidenza la loro presenza tra popolazioni batteriche sensibili ma ha reso possibile la comparsa di stipiti resistenti contemporaneamente a molti antibiotici e/o a chemioterapici.

TABELLA 5: Evoluzione della resistenza secondo Pohl.

E. coli Su-Sm-Tc-Cm				
1968	Su-Sm-Tc-Cm-Nm Sp Mc Km			
	1969	Su-Sm-Tc-Cm-Nm-Ap Sp Mc Km Cp Pm		
		1970-1971	Su-Sm-Tc-Cm-Nm-Ap-Tm Sp Mc Km Cp Pm	
			1974-1975	
Salmonella dublin	Su-Sm-Tc-Cm Sp		Su-Sm-Tc-Cm-Nm-Ap Sp Km Pm	
	1971		1974	

La causa diretta di tale insensibilità multipla è da ricercarsi nella cosiddetta « evoluzione della resistenza » che, secondo Pohl et al. (1976), sembra seguire due regole generali: la prima, definita del « convoglio ferroviario », stabilisce che la comparsa di una nuova insensibilità si accompagna, quasi sempre, alle precedenti. Così in Belgio, fra gli *E. coli* di origine bovina, lo spettro di resistenza Su-Sm-Tc-Cm sostituì nel 1968 quello formato da Su-Sm-Tc; nel 1969 si « convoglio ferroviario », stabilisce che la comparsa di una nuova in- 1974-75, Su-Sm-Tc-Cm-Nm-Ap-Tm (Tabella n. 5). La seconda regola afferma la predominanza dello spettro più ampio; in altre parole se in una popolazione di batteri compare una gamma di resistenze plasmidiche superiore a quella precedentemente osservata, sarà questo spettro, in prosecuzione di tempo, a predominare sugli altri.

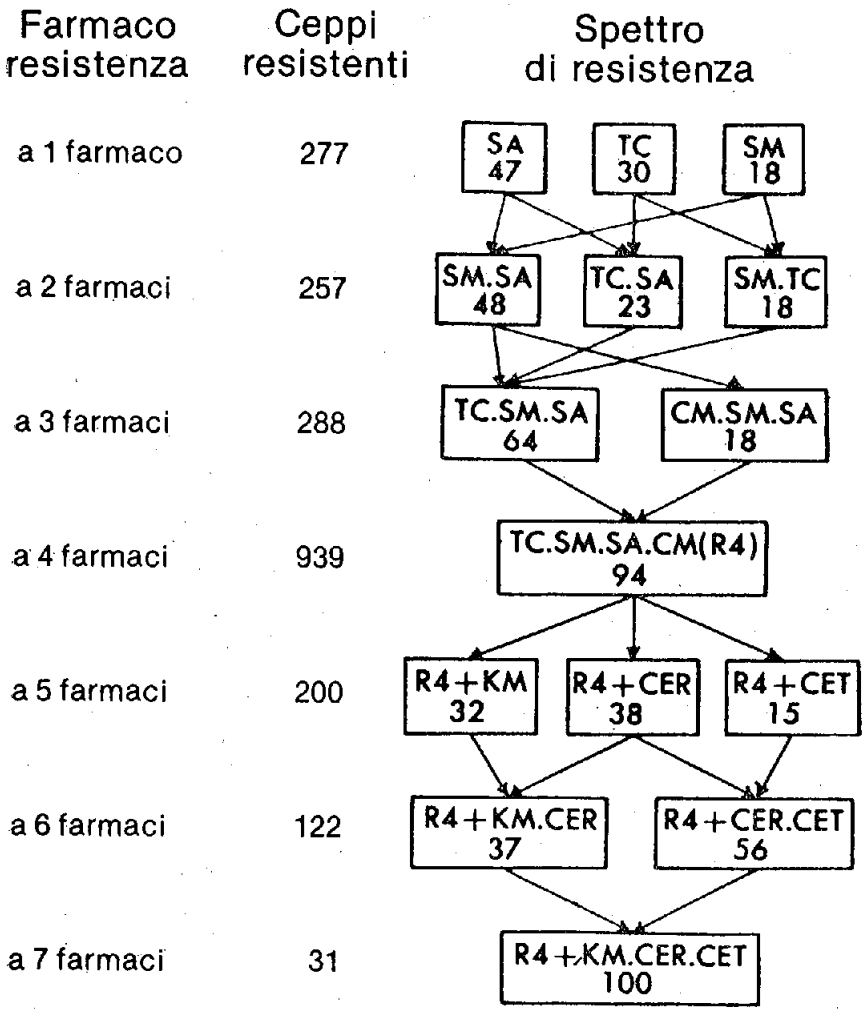


FIG. 2: Modello dei principali processi nello sviluppo della multiresistenza in ceppi di *E. coli*.
I numeri indicano la percentuale dei singoli spettri di resistenza totale degli stipiti insensibili.
Legenda : Sa, sulfametoxazolo; Tc, tetraciclina; Sm, streptomicina; Km, Kanamicina; Cm, cloramfenicolo; Cer, cefaloridina; Cet, cefalotina (Otaya et al., 1975).

Un fenomeno simile è stato osservato anche in medicina umana. Otaya et al. (1975) esaminarono statisticamente, negli anni 1966-1971, gli spettri di insensibilità di 2164 stipiti di *E. coli* isolati da campioni di urina provenienti da circa 300 ospedali del Giappone. Sulla base dei risultati ottenuti proposero un modello di evoluzione della resistenza multipla in *E. coli* (fig. n. 2), modello dal quale appare che gli spettri non comparirono a caso ma si formarono in tappe successive; dapprima si impose Tc-St-Su-Cm, al quale successivamente si aggiunsero Km, Cer e Cet, dapprima singolarmente, poi a due a due (pm-Cer, Cer-Cet), infine tutti insieme. Interessante la constatazione degli AA citati che lo spettro di sviluppo della multiresistenza rispecchiò i momenti della comparsa sul mercato degli antibiotici surriferiti ad eccezione del cloramfenicolo, antibiotico del quale fu reperito un esiguo numero di stipiti resistenti nonostante che in quegli anni la produzione del farmaco fosse altissima.

Interessante da un punto di vista epidemiologico la constatazione che gli stipiti di *E. coli* che ospitano plasmidi R possono anche essere colicinogeni come dimostra la Tabella n. 6 in cui vengono riportati i risultati di una indagine conoscitiva sull'incidenza dei plasmidi R e Col in popolazioni di enterobatteri isolati dalle feci di tacchini (Brindani et al., 1979). Se nella maggior parte dei casi, tuttavia, gli elementi genetici di resistenza sembrano costituire unità indipendenti, in altri, tuttavia, si associano i geni delle colicine e della insensibilità in un singolo replicone (Siccardi, 1966; Romero e Meynell, 1969; Fredericq e Delhalle, 1972) e i plasmidi Col e R vengono trasferiti, durante la coniugazione, sempre assieme.

È quindi ovvio pensare che gli stipiti di *E. coli* che elaborano diversi tipi di colicine e contemporaneamente sono resistenti ad antibiotici e/o a chemioterapici sono, specie nei trattamenti profilattici e terapeutici di massa, particolarmente avvantaggiati sulle altre popolazioni della stessa specie che non posseggono plasmidi R e Col.

Secondo Fredericq e Delhalle (1972) i plasmidi Col sembrano aver giocato un importante ruolo nella comparsa e nella disseminazione dei plasmidi R; non solo, infatti, rappresentano una fonte naturale di fattori di trasferimento per la mobilizzazione e la diffusione di determinanti di resistenza ai farmaci antibatterici, ma dotano anche i ceppi che li ospitano, in particolare gli stipiti in cui i fattori R e Col

TABELLA 6: Incidenza della colicinogenia fra le popolazioni di enterobatteri presenti a livello dei ciechi dei tacchini al momento della macellazione (Brindani et al., 1979).

Allevamento e n. stipiti	Ceppi colicinogeni	Ceppi che elaborano la colicina V	Ceppi che ospitano plasmidi Col e R	Ceppi che ospitano plasmidi Col V e R	Principali spettri di resistenza cui si associano i plasmidi Col
C (50)	14 (28%)	2 (14,0%)	14 (100%)	2 (14,0%)	Cm Sm Tc Sm Tc Su
H (50)	4 (8%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	Cm Sm Tc Su Cm Sm Tc Fu Su
L (50)	4 (8%)	1 (25%)	4 (100%)	1 (25%)	Sm Tc Fu Su Cm Sm Tc Fu Su
N (45)	12 (26,6%)	3 (25%)	12 (100%)	3 (25%)	Cm Sm Tc Su An Cm Sm Tc Fu Su An
A (50)	14 (28%)	8 (57%)	14 (100%)	8 (51,1%)	Cm Sm Tc Fu Su Sm Tc Fu Su
Totale: 245	48 (19,5%)	18 (37,5%)	48 (100%)	18 (100%)	

sono associati sullo stesso ADN, di un vantaggio selettivo che opera anche in assenza di antibiotici.

D'altro canto la presenza sullo stesso replicone di resistenza dei geni di insensibilità e di quelli delle colicine non è certamente l'unico esempio di interesse epidemiologico.

Rivestono, infatti, importanza anche altre associazioni fra determinanti R ed altri caratteri posti sullo stesso ADN e che, in presenza di farmaci antibatterici, possono essere selezionati. Ciò può condurre alla comparsa di batteri con caratteri biochimici diversi che non solo complicano la loro identificazione ma che possono esser causa di errori tassonomici. Ad esempio: i plasmidi che governano simultaneamente la produzione di H_2S e la resistenza alla tetraciclina in *E. coli* (Stoleru et al., 1972); la insensibilità al cloramfenicolo e la fermentazione del lattosio in *S. oraniemburg* (Le Minor et al., 1974); la utilizzazione del citrato da parte di *E. coli* e la resistenza a vari antibiotici (Ishiguro e Sato, 1979).

La esemplificazione può estendersi alla segnalazione del ceppo di stafilococco P258 che porta geni di resistenza alla penicillina, all'eritromicina e al mercurio, al bismuto, all'antimonio e all'arsenico. È così che tale stipite selezionato per la penicillina può essere nello stesso tempo resistente anche agli antisettici mercuriali; d'altro canto selezionato dagli antisettici sarà insensibile a penicillina ed eritromicina (Novick e Bouachaud, 1971). Né vanno dimenticate le indagini di Hendry e Stewart (1979) della contemporanea resistenza alla sulfadiazina e all'argento di stipiti di enterobatteri (*E. coli, E. cloacae, K. pneumoniae, P. mirabilis, C. freundii*) isolati da pazienti colpiti da ustioni di vario grado e trattati con sulfadiazina d'argento, farmaco che sotto forma di crema viene utilizzato nella profilassi delle scottature.

Se indubbiamente quanto sopra citato dà un'idea dell'importanza della pressione selettiva sulla associazione dei determinanti di resistenza e di altri geni inseriti sullo stesso replicone non bisogna dimenticare che esempi più eclatanti possono essere citati.

Gyles et al. (1977) hanno, infatti, recentemente dimostrato, che uno stipite di *E. coli,* isolato da un episodio di diarrea dei suinetti, ospita un plasmide coniugativo (pcG 86) che non solo porta i geni di resistenza per tetraciclina, streptomicina e sulfamidici, ma anche quelli per la produzione della enterotossina stabile e labile. D'altro canto

Pohl et al. (1977), in uno studio su dieci stipiti di *E. coli* K99$^+$ enteropatogeni per il vitello e resistenti a farmaci antibatterici, al mercurio e all'arsenico, hanno riscontrato un plasmide R-K99 che codifica sia la fibrilla che la insensibilità a sulfamidici, tetraciclina e streptomicina.

Da quanto esposto sino ad ora sulla epidemiologia dei plasmidi R ben si comprende come la resistenza agli antibiotici e/o ai chemioterapici sia diventato un problema molto serio e di costante attualità nella terapia delle malattie sostenute da batteri.

Conseguentemente numerose sono le indagini condotte al fine di scoprire e di sviluppare sostanze chimiche atte ad eliminare i plasmidi dai batteri che li ospitano, anche se le cellule portatrici possono spontaneamente dare origine a varianti sensibili agli antibatterici derivanti da segregazione o da errori di replicazione. I più promettenti composti chimici utilizzati a tal fine si son rivelati quelli che si legano all'ADN del plasmidio per intercalazione inibendone la replicazione durante la coniugazione. Fra queste sostanze si annoverano le nitroacridine, le aminoacridine (acriflavina, arancio di acridina) e le fenantitrine come i sali di etidio e di propidio (Hirota e Iijima, 1957; Watanabe e Fukasawa, 1961; Bouachaud et al., 1969). Oltre ai composti eterociclici menzionati sono state segnalate altre sostanze con una struttura ad anello triciclico, la clorpromazina, la prometazina, la devopromazina, ecc., farmaci usati in medicina umana in certi disturbi mentali (Mólnar et al., 1975; 1976; Mándi et al., 1976). Ai composti chimici citati si può aggiungere il dodecil solfato di Na (Tomoeda et al., 1968), l'urea, il giallo-metacromo (Falkow, 1975), la caffeina, ecc., come pure alcuni antibiotici: novobiocina (McHugh e Swartz, 1977), flavomicina (Watanabe et al., 1972), macarbomicina (Iyobe et al. 1971; Mitsuhashi et al., 1974) e i numerosi altri elencati nella Tabella n. 7, esperimentati da Mitsuhashi et al. (1974).

Interessanti, ai fini dell'effetto terapeutico sui batteri alberganti plasmidi, le ricerche comparative tra flavomicina, un auxinico permesso dalla attuale legislazione, ed alcuni antiparassitari che comunemente vengono usati nella pratica veterinaria (Tabella n. 8); in questo esperimento vennero utilizzati dodici substipiti di *E. coli* az^r (R$^-$) ospitanti plasmidi trasdotti. I risultati ottenuti dimostrarono che il thiobendazolo « cura » tre dei plasmidi R, due il tetramisole e la flavomicina, uno il citrato di piperazina, nessuno il Mintic (Pohl et al., 1975).

TABELLA 7: Effetto di antibiotici sullo sviluppo di *E. coli* ospitante plasmidi (Mitsuhashi et al., 1974).

Antibiotici	Colture miste					
	W2241/F-lac.tet$^+$			W2241/R100$^+$		
	g/ml aggiunti	Sviluppo	% cellule sensibili nella popolazione	g/ml aggiunti	Sviluppo	% cellule sensibili nella popolazione
Althiomycin	1,0	+++	48	0,25	+++	40
Azomycin	20,0	++	65	20,0	++	—
Daunomycin	0,5	++	88	0,5	++	—
Diumycin	100,0	++	84	100,0	++	—
Griseolutein A	1,0	+++	30	3,0	+++	90
Iyomycin	5,0	+++	64	5,0	+++	16
Kasugamycin	5,0	++	68	10,0	++	—
Mitomycin C	0,1	+++	34	0,2	+++	80
Neopluramycin	5,0	+++	68	5,0	+++	28
Netropsin	2,0	+++	41	10,0	++	—
Panosialin	200.0	+++	22	400,0	++	—
Phleomycin	0,5	++	—	0,2	+++	22
Streptothricin A-249	10,0	++	98	10,0	++	—
Xanthomycin	5,0	+++	44	10,0	++	—

Legenda: Sviluppo +++ $10^8 \sim 10^9$; ++ $10^7 \sim 10^8$; + $10^6 \sim 10^7$ cellule per ml.

TABELLA 8: Effetto « terapeutico » del mintic, del tetramisole, del tiabendazolo, del citrato di piperazina e della flavomicina (20 p.p.m.) (Pohl, 1972).

Plasmidi	*Mintic*	*Tetramisole*	*Tiabendazolo*	*Piperazina*	*Flavomicina*
F'lac	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	73%
R1 drd 19	n.s.	59%	50%	50%	50%
R 112	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R 124 drd 2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R 144 drd 3	n. s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R 46	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R 113	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
RP 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
RP 4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R 55	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	40%
R 69	n.s.	39%	40%	n.s.	n.s.
R 111	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R 71	n.s.	n.s.	57%	n.s.	n.s.

In ambiente ospitaliero, dove è largo l'impiego di antibiotici e dove pure le norme sul loro uso riservato e restrittivo trovano maggiori garanzie di applicazione, la percentuale degli enterobatteri simbionti e patogeni portatori di plasmidi R è alta, mentre è minima nelle persone non spedalizzate che non assumono sostanze antimicrobiche (Linton, 1977). Si può pertanto ritenere che nell'uomo, come afferma Falkow (1975), la miglior difesa contro i fattori R sia un intestino « sano » e una microflora normale che impedisca la colonizzazione di stipiti di batteri alloctoni.

Fra gli animali allevati in produzione zootecnica le condizioni ambientali ed igienico-sanitarie non sono certamente sovrapponibili, sul piano pratico, a quelle dell'uomo e tanto meno comparabili le esigenze dell'uso dei farmaci antibatterici.

D'altro canto la limitazione a fini auxinici ad alcuni macrolidi (spiramicina, oleandomicina, eritromicina e tilosina), ad un apparentato (lincomicina) e ad una sinergestina (virginiamicina), astraendo dalla bacitracina, flavomicina e avoparcina, al fine di evitare il rischio di selezionare enterobatteri portatori di plasmidi R, non è d'altro canto scevra di preoccupazioni; tali antibiotici, infatti, oltre ad essere utilizzati in terapia, vengono assorbiti a livello della mucosa intestinale, possono produrre resistenza crociata e modificare la flora batterica intestinale in funzione del loro spettro d'azione particolarmente attivo sui Gram positivi.

Raiband e Dickinson (1969) riportarono, infatti, un aumento dei colonbatteri senza variazioni numeriche dei lattobacilli in esperimenti in ratti, condotti al fine di controllare l'influenza della spiramicina e della virginiamicina sulla composizione della microflora intestinale. Ricerche eseguite da Decuypere et al. (1973) sui suinetti con lo stesso scopo propostosi da Raiband e Dickinson e utilizzando gli stessi antibiotici, misero in evidenza ancora una volta un aumento dei coliformi al quale si accompagnava un sensibile calo dei lattobacilli. Parimenti Van Assche (1975) in esperimenti *in vitro,* condotti al fine di osservare l'azione dei due farmaci citati sulla composizione del microbiota indigeno intestinale di suinetti, riscontrarono che il macrolide esercitava una modesta influenza.

La Virginiamicina invece determinava rilevanti modificazioni della flora microbica enterica diminuendo il numero dei lattobacilli e de-

D'altro canto non bisogna dimenticare che molte sostanze che esercitano attività antiplasmidica, astraendo dalla costatazione che alcune di esse sono mutagene, sono a volte tossiche e pertanto non possono trovare pratica applicazione.

I plasmidi degli enterobatteri sono d'altra parte alquanto stabili; logicamente ne deriva che, dopo anni di continuo uso di farmaci antibatterici a fini auxinici, profilattici e terapeutici, tali plasmidi possono essere considerati come componenti normali dell'apparato genetico dei colonbatteri che costituiscono la microflora intestinale degli animali (Smith, 1977).

Ne consegue che l'impiego di un solo antibiotico o chemioterapico (ad esempio: tetraciclina o sulfamidici) fra quelli permessi dalla attuale legislazione, spesso anche in virtù delle resistenze crociate, è in grado di selezionare cellule di *E. coli* o di altri enterobatteri che ospitano plasmidi codificanti i geni di una resistenza multipla.

Un ulteriore svantaggio, negli animali allevati, è la persistenza più prolungata nel tempo degli stipiti di enterobatteri R^+ a livello dell'intestino dopo che la terapia è stata sospesa, persistenza che, a prescindere dallo spettro d'azione dell'antibatterico e della via di somministrazione usata, è in funzione delle molteplicità degli interventi. In una terapia di massa la durata della cura non è relativa, come nell'uomo, alla scomparsa definitiva di ogni sintomo nel singolo soggetto, ma piuttosto alla completa sparizione di una sindrome nella maggioranza dei capi dell'allevamento.

La durata della terapia sarà quindi, a « fortiori », più lunga e la persistenza della resistenza tenderà, ovviamente, a protrarsi nel tempo tanto da superare il breve periodo di vita di alcune delle specie allevate che rigide leggi economico-commerciali limitano, ad esempio, a poche settimane nei polli e ad alcuni mesi nei tacchini.

I presupposti e le conseguenze prospettate trovano corrispondenza, anche se meno manifesta, pure nei trattamenti profilattici di massa, in quanto, per diminuire potenziali perdite economiche, conseguenti a perdita di peso e all'aumento dell'indice di mortalità, si tende a protrarre nel tempo la somministrazione di antibatterici.

È possibile una riduzione negli allevamenti dell'attuale stato di diffusione della resistenza multipla ai farmaci antibatterici che può raggiungere fra gli enterobatteri valori prossimi al 100% dei ceppi esaminati specie fra i volatili, i suinetti ed i vitelli?

gli enterococchi e aumentando quello degli enterobatteri con una netta dominanza delle specie di *Proteus*.

Alle modificazioni della composizione delle popolazioni batteriche indigene intestinali per azione della sinergestina si accompagnavano un'accentuata inibizione nella produzione di ac. lattico, di ac. propionico e una totale inibizione nella produzione di ac. butirrico, valerico e isovalerico (Van Assche et al., 1975b).

Sintetizzando si può fondatamente supporre che la somministrazione degli antibiotici a fini auxinici, permessa dalla attuale legislazione, agendo principalmente sui batteri *Gram* positivi, possa alterare il delicato equilibrio che caratterizza le interazioni fra le popolazioni simbionti dell'intestino modificandone i fattori fisico-chimici. Ciò può essere confermato dal fatto che negli animali « germ free » monocontaminati con stipiti di *E. coli* patogeni si instaura una enterite a decorso mortale che può essere prevenuta dalla somministrazione di lattobacilli e di streptococchi (Pesce, 1976).

D'altro canto in questi ultimi anni è andato aumentando l'isolamento di stipiti di streptococchi del gruppo D resistenti a farmaci antibatterici (Tc, Cm, Em, Sm, Km) e portatori di plasmidi R; tale stato di insensibilità può essere trasmesso per coniugazione anche agli streptococchi del gruppo B (Van Embden et al., 1977) o mobilizzato da plasmidi coniugativi (Clewell et al., 1974; Courvalin et al., 1974; Dunny e Clewell, 1975; Jacob e Hobbs, 1974; Marder e Kayser, 1977). Parimenti, anche la farmaco-resistenza di *Streptococcus agalactiae* (gruppo B) può essere trasmessa, come abbiamo già avuto occasione di ricordare, ad altre cellule sensibili. Sussiste quindi la possibilità che la resistenza agli antibiotici e/o ai chemioterapici degli streptococchi possa diffondersi ad altre specie dello stesso genere come paventano Romero et al. (1979), in particolare a specie riconosciute patogene per l'uomo e per gli animali.

Si potrebbe quindi essere indotti a pensare che gli inconvenienti lamentati e le preoccupazioni denunciate nell'uso di aminoglicosidi e di tetracicline come auxinici, possano nel prossimo futuro essere addebitati agli antibiotici permessi come additivi dalla attuale legislazione della CEE.

BIBLIOGRAFIA

ACHTMAN M. and SKURRAY R. (1977): Microbial Interactions. Edito da J.L. Ruissing. Chapman and Hall, London, pagg. 233-279.

AKIBA T., KOYAMA K., ISHIKI Y., KIMURA S., FUKUSHIMA T. (1966): Japan. J. Microbiol., *4*, 219-227.

ARGOUDELIS A.D. and COATS J.H. (1971): J. Antibiot., *24*, 206-208.

AVERY O.T., McLEOD C.M. and McCARTY M. (1944): J. Exp. Med., *79*, 137.

BARTH P.T., DATTA N., HEDGES R.W. and GRINTER N.J. (1976): J. Bacteriol., *125*, 800-810

BENVENISTE R. and DAVIES J. (1973): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *70*, 2276-2280.

BERG D.E., DAVIES J., ALLET B. and ROCHAIX J. (1975): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *72*, 3628-3632.

BERMAN S.M. and HIRSCH D.C. (1978): Antimicrob. Agents Chemother., *14*, 348-352.

BOTSTEIN D. and KLECKNER N. (1977) in: DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. Edito da Buckari A.I., Shapiro I.S. and Adhya S.L. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pagg. 185-203.

BOUACHAUD D.H., SCAVIZZI M.R. and CHABBERT Y.A. (1968): J. Gen. Microbiol., *54*, 417-425.

BRADLEY D.E. (1974): Biochemfl biophys. Res. Comm., *57*, 893-900.

BRADLEY D.E. (1976): J. gen. Microbiol., *95*, 181-185.

BRINDANI F., CATTABIANI F. e GIANELLI F. (1979): Arch. Vet. It., *30*, 177-183.

BRINTON C.C. Jr. (1971): Critical Rev. Microbiol., 105-160. CRC Press, Cleveland, Ohio.

BRINTON C.S., Jr (1965): Trans. N.Y. Acad. Sci., *277*, 1003-1054.

BROWN M.G.M., WESTON A., SAUNDERS J.R. and HUMPHREYS G.O. (1979): FEMS Microbiol. Letters, *5*, 219-222.

CAMPBELL A., BERG D.E., BOTSTEIN D., LEDERBERG E.M., NOVICK R.P., STARLINGER P. and SZYBALSKI W. (1979): Gene, *5*, 197-206.

CHAI T. and FOULDS J. (1974): J. mol. Biol., *85*, 465-474.

CHAKRABARTY A.N., MYLROIE J.R., FRIELLO D.A., VACCA J.G. (1975): Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., *72*, 3647-3651.

CHAKRABARTHY A.N., CHAUDHURI S., GANGULI M. and DASTIDAR S.G. (1977): Indian J. Med. Res., *1*, 14-22.

CLEWELL D.B., YAGY Y., DUMI G.M. and SCHLUTZ (1974): J. Bact., *117*, 283-289.

CLOWES R.C. (1972): Bacteriol. Rev., *36*, 361-405.

COHEN S.N. and MILLER C.A. (1970): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *67,* 510-516.
COHEN S.N., CHANG A.C.Y. and HSU L. (1972): Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., *70,* 2110-2114.
CORNELIS G., WANTERS G. et BRUYNOGHE G. (1973): Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 124A, 389-409.
COSTERTON J.W. (1977): Microbiology-1977. Edito da D. Schlessinger. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1977, pagg. 151-157.
COURVALIN P.M., CARLIER C., CROISSANT O. and BLAGY D. (1974): Molec. gen. Genet., *132,* 181-192.
COURVALIN P., FIANDT M. and DAVIES J. (1977) in: Microbiology-1977. Edito da D. Schlessinger. American Society Microbiology, Washington D.C., pagg. 262-266.
CROSA J.H., LUTTROP L.K., HEFFRON F., FALKOW S. (1975: Molec. gen. Genet., *140,* 39-50.
DASTIDAR S.G., MITRA S., KUMAR R. and CHAKRABARTY A.N. (1978): Indian J. Exper. Biol., *16,* 660-664.
DATTA N., HEDGES R.W. (1971): Nature, *234,* 222-223.
DATTA N. (1975): Microbiology-1974. Edito da D. Schlessinger, American Society Microbiology, Washington, D.C., pagg. 9-15.
DATTA D.B., KRAMER C. and HENNING V. (1976): J. Bacteriol., *128,* 834-841.
DANG VAN A., GOLDSTEIN F., ACAR J.F. and BOUANCHAUD D. H. (1975): Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 126A, 397-399.
DAVEY R.B. and PITTARD J. (1974): J. Bacteriol., *120,* 1186-1195.
DAVIS C.E., ANANDAN J. (1970): New Engl. J. Med., *282,* 117-122.
DECUYPERE J., HENDERICKX H.K. and VERVAEKE I (1973): Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, *223,* 348-355.
DOWDING J. and DAVIES J. (1975) in: Microbiology-1974. Edito da D. Schlessinger. American Society Microbiology, Washington, D.C., pagg. 179-186.
DREWS J. (1979): Med. Klin., *74,* 935-944.
DUBNAU E. and STOCKER B.A.D. (1964): Nature, *204,* 1112-13.
DUNNY G.M. and CLEWELL B.D. (1975: J. Bacteriol., *124,* 784-790.
EHRLICH S.D. (1977): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *74,* 1680-1682.
FALKOW S. (1975): Infectious multiple drug resistance. Pion Limited, London.
FESCE A. (1976): Microbiologia e Immunologia generale e comparata. UTET Torino.
FOSTER T.J., HOWE T.G.B. and RICHMOND K.M.V. (1975): J. Bacteriol., *124,* 1153-1158.
FRANKLIN T.J. and GODFREY A. (1965): Biochem. J., *105,* 371-378.
FREDERICQ P. and DELHALLE E. (1972) in: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Edito da V. Krčmery, L. Rosival e T. Watanabe.

Avicenum - Czechoslovak Medical Press. Prague, pagg. 203-210.
GARDNER P., SMITH D., BEER H., MOELLERING R.C. Jr. (1969): Lancet, 774-776.
GARROD L.P. (1976): Brit. Med. J., 933-936.
GILBERT W. and DRESSLER D. (1968): Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *33*, 473-484.
GRIFFITH F. (1928): J. Hyg., *27*, 113.
GRINDLEY N.D.F., HUMPHREYS G.O. and ANDERSON E.S. (1973): J. Bacteriol., 115, 387-398.
GYLES C.L., PALCHAUDHURI S. and MAAS W.K. (1977): Science, *198*, 198-199.
HAQUE H. (1979): Molec. gen. Genet., *171*, 107-109.
HARADA K. (1967): Japan J. Microbiol., *11*, 143.
HARADA K., KAMEDA M., SUZUKI M., SHIGEHARA S. and MISUHASHI S. (1967): J. Bacteriol., *93*, 1236-1241.
HEDGES R.W. and JACOB A.E. (1974): Mol. gen. Genet., *132*, 31.
HEFFRON F., RUBENS C. and FALKOW S. (1975): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *72*, 3623-3627.
HEFRON F., RUBENS C. and FALKOW S. (1977) in: DNA Insertiont Elements, Plasmids and Episomes. Edito da Bukhari A.I., Shapiro J.S. and Adhya S.L. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pagg. 151-160.
HENDRY A.T. and STEWART I.O. (1979): Can. J. Microbiol., *25*, 915-921.
HINDENNACH I. and HENNING U. (1975): Eur. J. Biochem., *39*, 27-36.
HIROTA Y. and IIJIMA T. (1957): Nature, *180*, 655.
HOECKSTRA W.P.M. and HAVEKES A.M. (1979): Antonie van Leeuwenhoeck, *45*, 13-18.
HOPWOOD D.A. and WRIGHT H.M. (1976) in: Second International Symposium on the genetics of Industrial Microorganisms. Edito da K.D. MacDonald, Academic Press, New York, pagg. 607-619.
HORODNICEANU T., BOUGUELERET L., EL-SOHL N., BOUANCHAUD D.H., CHABBERT Y.A. (1979): Plasmid, 2, 197-206.
HU S., OHTSUBO E., DAVIDSON N. and SAEDLER H (1975): J. Bacteriol., *122*, 764-775.
IIDA S., ARBER W. (1977): Molec. gen. Genet., *153*, 259-269.
ISHIGURO N. and SATO G. (1979): J. Hyg. Camb., *83*, 331-344.
IOBE S., HASHIMOTO H. and MITSHUASHI S. (1969): Japan. J. Microbiol., *13*, 225-232.
IYOBE S., HASHIMOTO H. and MITSUHASHI S. (1970): Japan J. Microbiol., *14*, 463-471.
IYOBE S., MITSUHASHI S. and UMEZAWA H. (1971): J. Bacteriol., *108*, 946-947.
IZAKI K. and ARIMA K. (1963): Nature, *200*, 384-385.

JACOB A.E. and HOBBS S.J. (1974): J. Bacteriol., *117,* 360-372.
JACOBY G.A. (1977) in: Microbiology-1977: Edito da D. Schlessinger, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pagg. 119-126.
JACQUET J. et COIFFEIER O. (1974): Bull. Acad. Vét., *47,* 317-325.
KAMADA M. (1969). Japan J. Microbiol., *13,* 225.
KIRBY R., WRIGHT L.F. and HOPWOOD D.A. (1975): Nature, *254,* 262-267.
KLECKNER N., CHAN R., TYE B. and BOTSTEIN (1975): J. Mol. Biol., 561-575.
KOLLEK R., OERTEL W., GOEBEL A. (1978): Mol. gen. Gener., *162,* 51-57.
KONO M., SASATSU M., HAMASHINA H. and YAMAKAWA T. (1979): Microbios Letters, *6,* 67-76.
KOPECKO D.J. and COHEN S.N. (1975): Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., *72,* 1373-1377.
LACKS S.A. (1977) in: Microbial Interaction. Edito da J.L. Reissig, Chapman and Hall, London, pagg. 177-232.
LA PLACA M. (1979): Principi di microbiologia medica. 3ª Ed. Società editrice Esculapio, Bologna.
LAWN A.M., MEYNELL E., MEYNELL G.G. and DATTA N. (1967): Nature, *216,* 343-346.
LAWN A.M. and MEYNELL E. (1970): J. Hyg., *68,* 683-694.
LE MINOR L., COYNAULT C., PESSOA G. (1974): Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125A, 261-285.
LE MINOR L., COYNAULT C., CHABBERT Y., GERBAUD G. et LE MINOR S. (1976): Ann. Microbiol., 127B, 31-40.
LEONARD C.G. and COLE R.M. (1972): J. Bacteriol., *110,* 273-280.
LEVY S.B. and McMURRY L. (1978) in: Microbiology-1978. Edito da D. Schlessinger, American Society Microbiology, Washington, D.C., pagg. 177-180.
LINTON A.H. (1977): Vet. Record, 354-360.
LUGTENBERG B., MEIJERS J., PETERS R., HOECK V.D. and ALPHENS V. (1975): FEMS Letters, *58,* 254-258.
MANCINI C. and BEHME R.J. (1977): J. Infect. Dis., *136,* 597-600.
MÁNDI Y., MOLNÁR J., HOLLAND I.B. and BELADI I. (1976): Genet. Res. *26,* 109-111.
MANNING P.A., PUSPURS A. and REEVES P. (1976): J. Bact., *127,* 1080-1084.
MARDER H.P. and KAYSER F.H. (1977): Antimicrob. Agents Chemother., *12,* 261-269.
MARVIN D. e HOHN B. (1969): Bact. Rev., *33,* 172-209.
McHUGH G. and SWARTZ M.N. (1977): Antimicrob. Agents Chemoter., *12* 423-426.
MISE K. (1976): Virology, *71,* 531-545.

MISE K. and ARBER W. (1976): Virology, *69,* 191-205.
MISE K. and NAKAYA R. (1977): Molec. gen. Genet., *157,* 131-138.
MITSUHASHI S., KAMADA M., HARADA K. and SUZUKI M. (1969): J. Bacteriol., *97,* 1520-1521.
MITSUHASHI S., IYOBE S., HASHIMOTO H. and UMEZAWA H. (1970): J. Antibiotics, *23,* 319-323.
MITSUHASHI S., IYOBE S., KUBOTA T., HAMADA M., and UMEZAWA H. (1974): J. Antibiotics, *27,* 682-684.
MITSUHASHI S., HASHIMOTO H., IYOBE S. and IONUÈ M. (1977) in: DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. Edito da Bukari A.I., Shapiro J.S. and Adhya S.L., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pagg. 138-146.
MITSUHASHI S., INOUE K. and INOUE M. (1977): Antimicrob. agents Chemother., *12,* 418-422.
MØLLER J.K., JØRGENSEN N.H.F., CHRISTIANSEN C., CHRISTIANSEN G., BÅK A.L. and STENDERUP A. (1978) in: Microbiology-1978. Edito da D. Schlessinger. American Society Microbiology, Washington D.C., pagg. 257-261.
MOLNÁR J., KIRÁLI J. and MÁNDI Y. (1975): Experientia, *31,* 444-445.
MOLNÁR J., MÁNDI Y. and KIRÁLI J. (1976): Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungar., *23,* 45-54.
MOORE P.R., EVENSON A., LUCKAY T.D., McCOY E., ELVEHEM C.A. and HART E.B. (1946): J. Biol. Chem., *165,* 437-441.
MOTTES M., DRANDI G. and SGARAMELLA V. (1979): Molec. gen. Genet., *174,* 281-286.
NISIOKA T., MITANI M. and CLOWES R.C. (1970) J. Bacteriol., *103,* 166-177.
NOVICK R.P. and BOUANCHAUD D. (1971): Ann. N.Y. Acad. Sci., *182,* 279-284.
NOVICK R.P., CLOWES R.C., COHEN S.N., CURTIS S., DATTA N. and FALKOW S. (1976): Bacteriol. Rev., *40,* 168-189.
OCHIAI K., YAMANAKA T., KIMURA K., SAWADA O. (1959): Nihon Iji Shimpo, 1861, 34.
OTOYA H., MACHIHARA S., YOSHIMURA M. and YAMAMOTO M. (1975) in: Microbial Drug Resistance. Edito da S. Mitsuhashi and H. Hashimoto. University Park Press, Baltimore, pagg. 201-208.
OU J.T. and ANDERSON T.F. (1970 J. Bacteriol., 102, 648-654).
PERLMAN D. and STICKGOLD R. (1977); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *74,* 2518-2522.
PERLMAN D. and ROWND R. (1975): J. Bacteriol., *123,* 1013-1034.
POHL P., LAUB-KUPERSZTEJIN R., THOMAS J. et VAN ROBAYES G. (1975): Ann. Méd. Vét., *119,* 51-57.
POHL P., THOMAS J., VAN MUYLEM K. et VAN ROBAYES G. (1976): Ann. Méd. Vét., *120,* 335-340.

POHL P., THOMAS J. et VAN MUYLEN K. (1977): Ann. Méd. Vét., *121,* 503-505.
PTASHNE K. and COHEN S.N. (1975): J. Bacteriol., *122,* 776-781.
RAIBAUD P. and DICKINSON A.B. (1969): Cah. Méd. Vét., *38,* 175-180.
ROMERO E. and MEYNELL E. (1969): J. Bacteriol., *97,* 780-786.
ROMERO E., PERDUCA M. and. PAGANI L. (1979): Microbiologica, *2,* 421-424.
ROWND R.H., KASAMATSU H. and MICKEL S. (1971): Ann. N.Y. Acad. Sci., *182,* 188-206.
ROWND R.H. and MICKEL S. (1971): Nature, *234,* 40-43.
ROWND R.H., PERLMAN D. and GOTO N. (1975) in: Microbiology-1974. Edito da D. Schlessinger. American Society Microbiology, Washington D.C., pagg. 76-94.
ROWND R.H., MIKI T., APPELBAUM E.R., MILLER J.R., FINKELSTEIN M. and BARTON C.R. (1978) in: Microbiology-1978. Edito da D. Schlessinger. American Society Microbiology, Washington, D.C., pagg. 33-37.
SCHNAITMAN C.A. (1974): J. Bacteriol., *118,* 442-453.
SEBALD M., BOUANCHAUD D. et BIETH G. (1973): C.R. Acad. Sci. Ser. D, *280,* 2401-2404.
SEBALD M. et BREFORT G. (1975): C.R. Acad. Sci. Ser. D, *281,* 317-319.
SHAPIRO J.A., ADHYA S.L. and BUKHARI A.I. (1977): in DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, Edito da Bukhari A.I., Shapiro J.S. and Adhya S.L. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pagg. 3-11.
SHAW W.V. and HOPWOOD D.A. (1976): J. gen. Microbiol., *94,* 159-166.
SHEEHY R.J., PERRY A., ALLISON D.P. and CURTISS III R. (1973): J. Bacteriol., *114,* 1328-1335.
SICCARDI A.G. (1966): Genet. Res., *8,* 219-228.
SMITH H.R., HUMPREYS G.O. and ANDERSON E.S. (1974): Mol. gen. Genet., *129,* 229-242.
SMITH H.W. (1977) in: Antibiotics and Antibiosis in Agricolture. Edito da M. Woodbine. Butterworth, London.
SROGL M., HOCHMANNOVA J., NESVERA J., STOKROVA J. and KLEGER M. (1977): Folia Microbiol., *22,* 353-359.
STOLERN G.H., GERBAUD G.R., BOUANCHAUD D.H. et LE MINOR L. (1972): Ann. Inst. Pasteur, *123,* 743-750.
TAYLOR D.P. and COHEN S.N. (1979): J. Bacteriol., *137,* 92-104.
TERAKADO N., AZECHI H., NINOMIYA K. and SHIMIZU T. (1973): Antimicrob. Agents Chemother., *3,* 555-558.
THAYER J.D., SAMUELS S.B., MARTIN J.E. and LUCAS J.B. (1964): Antimicrobial agents and Chemotherapy. Edito da J.C. Sylvester. Ameri-

can Society for Microbiology, Ann. Arbor, Michigan, pag. 433.
TOMASZ A. and MOSSER J.L. (1966): Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., *55,* 58-66.
TOMOEDA M., INUZUKA U., KUBO N. and NAKAMURA S. (1968): J. Bacteriol., *95,* 1078-1089.
TOWNER K.I. and VIVIAN A. (1977): J. gen. Microbiol., *101,* 167-171.
VAN EMBDEN J.D.A., ENGEL H.W.B. and VAN KLINGERE B. (1977): Antimicrob. agents Chemother., *11,* 925-932.
VAN ASSCHE P.F., DE MEY L.E. and DESCAMPS J.A. (1975): Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, *231,* 153-162.
VAN ASSCHE P.F., DE MEY L.E. and DESCAMPS J.A. (1975): Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, *231,* 163-174.
VIDEAU D. (1975): Microbia, *1,* 3-34.
VIVIAN A. (1971): J. gen. Microbiol., *69,* 353-364.
WALKER M.S. and WALKER J.B. (1970): J. Biol. Chem. *245,* 6683-6689.
WATANABE T. and FUKUSAWA T. (1961): J. Bacteriol., *81,* 679-683.
WATANABE T. and FUKASAWA T. (1962): J. Bacteriol., *83,* 727-735.
WATANABE T., NISHIDA H., OGATA C., ARAI T. and SATO S. (1964): J. Bacteriol., *88,* 716-726.
WATANABE T., OGATA Y., SUGAWARA K. and ODA K. (1972) in: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Edito da V. Krcmery, L. Rosival and T. Watanabe. Avicenum - Czechoslovak Medical Press - Prague, pagg. 105-113.
WESTON A., HUMPHREYS G.O., BROWN M.G.M. and SAUNDERS J.R. (1979): Molec. gen. Genet., *172,* 13-118.

S. CARLI

ANTIBIOTICI DI MAGGIOR IMPIEGO IN MEDICINA VETERINARIA. MECCANISMI D'AZIONE E CENNI DI FARMACOCINETICA

Oltre le consuete classificazioni degli antibiotici sulla base della loro struttura chimica e del loro spettro d'attività antibatterica, di un certo interesse teorico può essere anche una distinzione tra i vari gruppi di antibiotici basata sul loro meccanismo d'azione. Schematicamente possiamo distinguere 3 classi fondamentali:

a) *agenti attivi sulla parete batterica;*
b) *agenti attivi sulla membrana citoplasmatica;*
c) *agenti attivi a livello ribosomiale.*

Agenti attivi sulla parete batterica

Fanno parte di questo gruppo alcuni antibiotici di notevole impiego nella pratica veterinaria come le penicilline, le cefalosporine e la bacitracina.

Prendiamo in considerazione le penicilline. Successivamente al capostipite, la benzilpenicillina o penicillina G, sono stati isolati o, meglio, sintetizzati numerosi altri agenti attivi che possiamo grossolanamente suddividere in *penicilline acidoresistenti* (e quindi somministrabili per os, come la fenossimetilpenicillina e la feneticillina); *penicilline penasiresistenti* (cloxacillina, dicloxacillina, flucloxacillina); *penicilline a largo spettro* (ampicillina, amoxicillina, etacillina); *penicilline ad attività particolare* come la carbenicillina (*Pseudomonas aeruginosa*).

Le penicilline sono dei tipici antibiotici batteriostatici-battericidi in funzione della dose, particolarmente attivi nei confronti dei batteri in rapida moltiplicazione. L'azione di questo tipo di antibiotici non si instaura troppo rapidamente ma permane anche in presenza di pus e di prodotti di origine tessutale e si manifesta per un certo tempo, anche dopo la caduta delle concentrazioni ematiche di antibiotico al

di sotto di livelli terapeuticamente significativi.

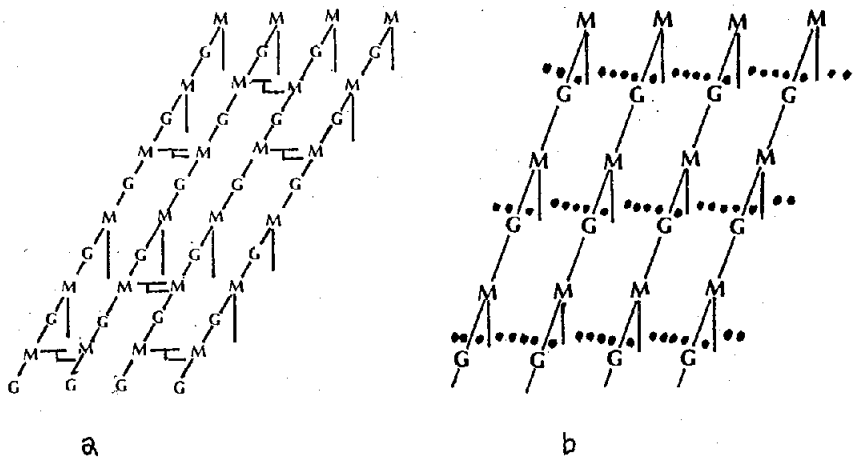
Il meccanismo d'azione delle penicilline appare sufficientemente chiarito; allo stato delle attuali conoscenze le ipotesi più accreditate indicano un'inibizione o perlomeno un'interferenza nella sintesi dei componenti della parete batterica. Il *cell-wall,* o parete batterica, è una struttura complessa che conferisce alla cellula un certo grado di rigidità: nella sua composizione sono coinvolti *lipidi* (fino al 20% nei Gram-negativi, non oltre il 2% nei Gram-positivi), *proteine* ed un particolare aminozucchero, l'*acido acetilmuramico* che concorre alla formazione dei *mucopeptidi,* molecole direttamente responsabili della rigidità della parete (Tab. 1).

TABELLA 1: Componenti polimerici del « cell wall » nei batteri Gram + e Gram —.

Polimero	Gram-positivi	Gram-negativi
Glicoproteine	+ +	+
Acido teicoico e/o		
Acido teicuronico	+	—
Lipopolisaccaridi	—	+
Lipoproteine	—	+
Proteine	±	+
Polisaccaridi	+	+

da FRASCHIN, NICOLIN e SIRTORI, 1978

La frazione mucopeptidica è costituita da acido acetilmuramico, da N-acetilglucosamina e da un pentapeptide formato dalla successione di L-alanina, acido D-glutammico, L-lisina, D-alanina, D-alanina. Più in dettaglio, le molecole di acido muramico agganciano le catene laterali pentapeptidiche (e formano così un complesso muramilpeptidico) ed in seguito si uniscono alla glucosamina. La interposizione di peptidi pentaglicinici, a legare fra loro i vari complessi muramilpeptidici, è l'atto finale di formazione della parete batterica: tale fenomeno, noto come transpeptidazione, richiede l'intervento di un particolare enzima, appunto la transpeptidasi (Graf. 1).



GRAF. 1: Rappresentazione schematica della glicoproteina costituente la parete cellulare di un germe Gram — (a) e di un germe Gram+ (b). (da FRASCHIN, NICOLIN e SIRTORI, 1978).

Le penicilline interferirebbero nella sintesi dei mucopolipeptidi comportandosi da analoghi strutturali del terminale pentapeptidico D-alanina, D-alanina ed impedirebbero alla ranspeptidasi di sovraintendere alla formazione dei legami crociati tra le catene pentapeptidiche.

Risultato finale sarebbe la formazione di un glicopeptide disorganizzato con eccesso di aminoacidi liberi e la comparsa, anche per effetto dell'enzima acetil-muramidasi, di interruzioni nella parete del microrganismo con conseguente lisi della cellula batterica.

La diversa componente mucopeptidica tra Gram positivi (60% dello spessore di parete) e Gram negativi (10%) sembra rendere ragione della diversa sensibilità di tali batteri all'azione penicillinica.

Nei secondi infatti la funzione di parete è attribuita in minima parte ai mucopolisaccaridi, in massima parte invece agli altri costituenti, soprattutto lipopolisaccaridi e lipoproteine che non vengono influenzati dall'antibiotico.

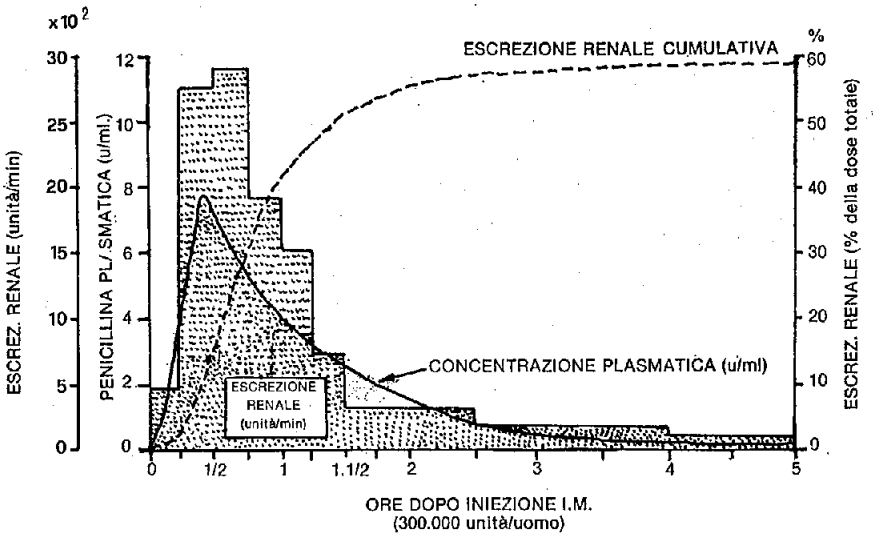
Praticamente sovrapponibili sono i meccanismi d'azione delle cefalosporine e della bacitracina.

Riguardo alla farmacocinetica, in linea di massima si può affermare che le caratteristiche di assorbimento, distribuzione tessutale, metabolismo ed escrezione di tutti gli antibiotici sono strettamente correlate alla via di somministrazione, al tipo di principio attivo impiegato ed alla preparazione farmaceutica.

Un fattore non trascurabile è la specie animale (addirittura il singolo individuo): a parità di dosaggio infatti ci possono essere delle significative differenze circa l'entità dei livelli ematici e la persistenza del farmaco nell'organismo.

Dopo somministrazione parenterale (per la penicillina G è praticamente l'unica via di somministrazione utilizzata, essendo questa quasi completamente inattivata dal pH acido gastrointestinale) i sali sodici e potassici di penicillina vengono rapidamente e completamente assorbiti, determinando il raggiungimento dei livelli ematici picco dopo soli 15-30 minuti.

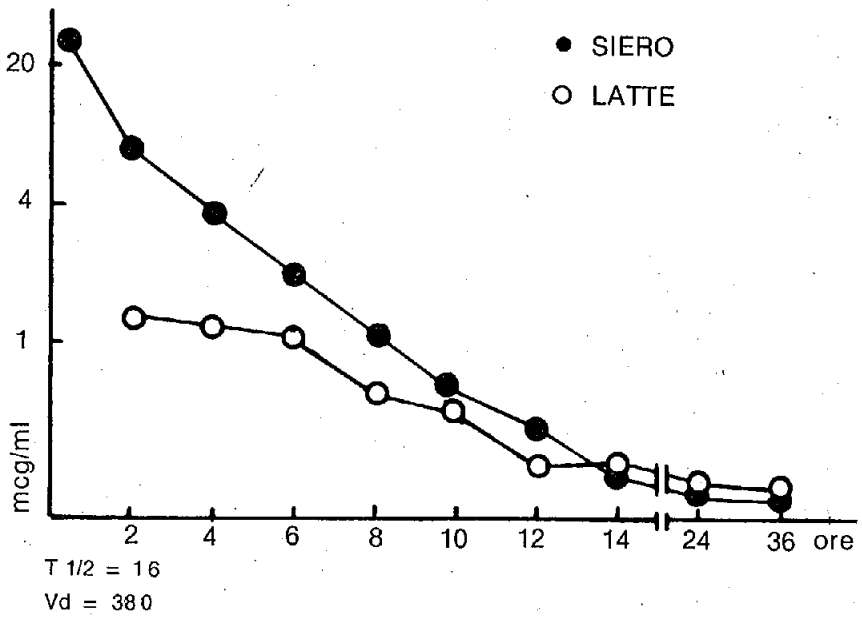
L'eliminazione, in massima parte per escrezione tubulare, avviene altrettanto rapidamente costringendo di conseguenza a somministrazioni molto ravvicinate nel tempo (4-5 ore) (Graf. 2).



GRAF. 2: Livelli plasmatici ed escrezione renale di Penicillina G (da GOODMAN, GILMAN, 1975).

Un simile quadro farmacocinetico, comune del resto a tutte le penicilline, ha sempre comportato dei notevoli problemi nella pratica veterinaria che invece si pone come obbiettivo delle somministrazioni abbastanza distanziate nel tempo, almeno ogni 12-24 ore. L'industria farmaceutica ha recepito queste esigenze preparando prodotti a rallentato assorbimento e quindi a rallentata eliminazione (veicoli oleosi, sali benzatinici, sali procainici: le cosiddette penicilline-deposito che permettono di mantenere livelli ematici terapeuticamente significativi anche per 48 ore).

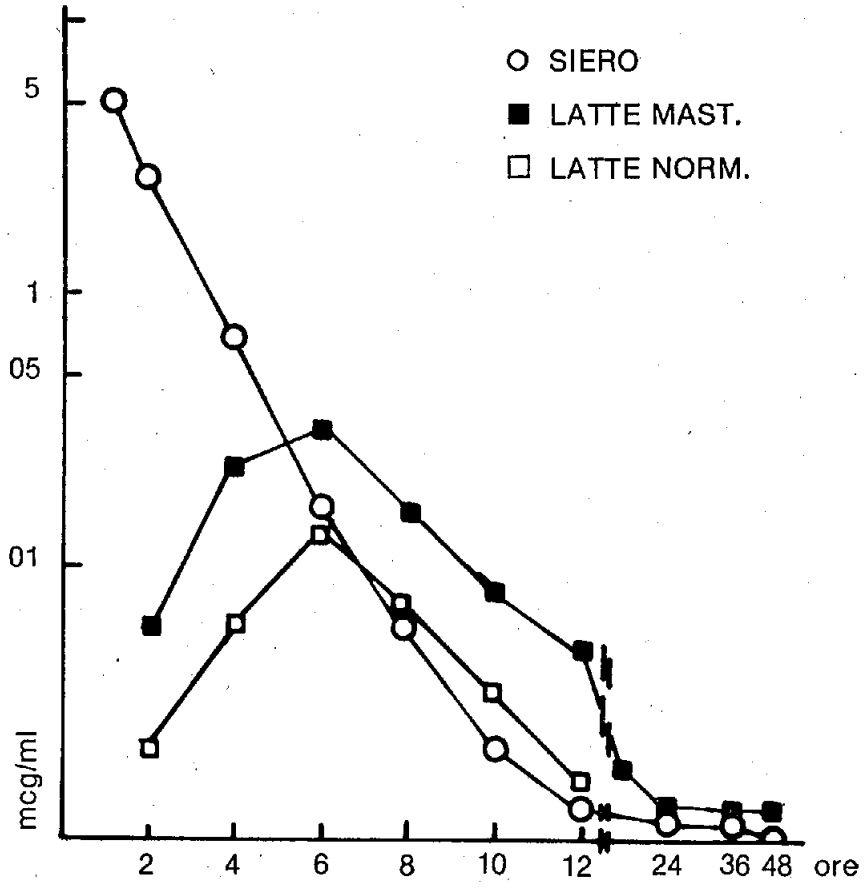
Dopo il passaggio in circolo, la penicillina G è presente per oltre il 90% nel plasma; le percentuali di legame alle sieroalbumine variano notevolmente in rapporto al tipo di penicillina, passando dal 25% dell'ampicillina fino al 95% della cloxacillina e della dicloxacillina.



GRAF. 3a: Cinetica della benzilpenicillina nel siero e nel latte dopo somministrazione e.v. alla dose di 20 mg/kg p.v. (da ZIV G., 1979).

Dal torrente circolatorio la penicillina diffonde in tutto l'organismo a concentrazioni che però variano notevolmente, raggiungendo i valori massimi a livello epatico, biliare e renale.

L'eliminazione, oltre che per via renale, avviene anche, sebbene in misura più ridotta, per via biliare e per via mammaria, comportando nelle bovine da latte anche problemi igienico-sanitari non irrilevanti (Graf. 3a, 3b).



GRAF. 3b: Cinetica della benzilpenicillina nel siero e nel latte dopo somministrazione i.m. alla dose di 20 mg/kg p.v. (da ZIV G., 1979).

Agenti attivi sulla membrana citoplasmatica

Fanno parte di questo gruppo di antibiotici alcuni principi attivi di una certa importanza nella pratica veterinaria come Polimixina e Colimicina (o Polimixina E).

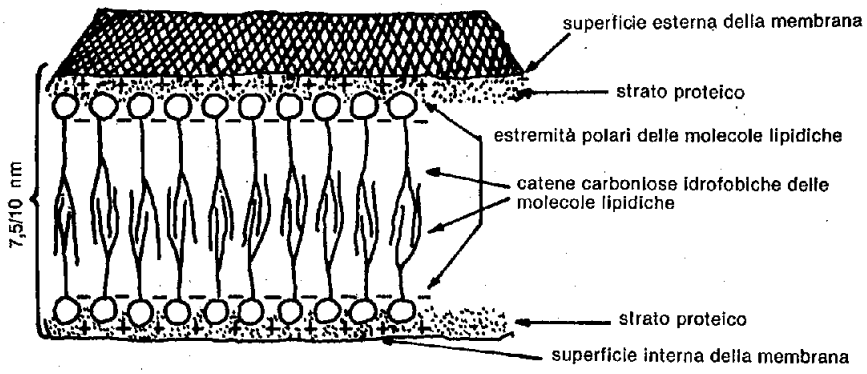
Polimixina e Colimicina sono antibiotici polipeptidici ad attività battericida il cui meccanismo d'azione presenta ancora degli aspetti non del tutto chiariti.

La maggior parte degli Autori attribuisce a questi antibiotici un'azione primaria sulla membrana citoplasmatica dei batteri sovrapponibile a quella esercitata dai detergenti cationici.
(Graf. 4).

Anche qui, come nel caso della parete batterica, è opportuno spendere qualche parola nella descrizione della membrana citoplasmatica

Questa, localizzata subito a ridosso del cell-wall, fornisce al batterio una protezione funzionale attraverso la permeabilità selettiva che esercita nei confronti di tutte le sostanze naturali e/o artificiali con le quali la cellula viene a contatto.

La membrana citoplasmatica presenta una caratteristica struttura laminare con due strati proteici esterni ed uno intermedio di natura fosfolipidica.



GRAF. 4: Ultrastruttura della membrana cellulare secondo lo schema di Danielli-Davson e di Robertson (da FESCE, 1976).

Le catene polipeptidiche degli strati proteici decorrerebbero parallele alla superficie della membrana, mentre le molecole fosfolipidiche sarebbero disposte, perpendicolarmente agli strati proteici, in una tipica struttura a doppia palizzata.

Da un punto di vista chimico, le molecole proteiche sarebbero presenti in una percentuale del 60-75% contro il 25-40% dei lipidi. In definitiva, Polimixina e Colimicina agirebbero disorientando il film lipo-proteico della membrana e provocando di conseguenza, immediatamente dopo il contatto farmaco-celula batterica un'alterazione della permeabilità selettiva di questa.

Entrambi gli antibiotici presentano un assorbimento nullo o comunque scarso dopo somministrazione orale; rapido e massiccio è invece l'assorbimento dopo somministrazione parenterale.

La distribuzione nei tessuti non è molto omogenea: riscontri sperimentali sembrano dimostrare che né la Colimicina né la Polimixina B (che, oltre alla E, è l'unica delle Polimixine ad avere una utilizzazione nella pratica clinica) superano la barriera ematoencefalica.

L'escrezione avviene per via renale, essenzialmente per filtrazione glomerulare; tale eliminazione, naturalmente molto rallentata, può portare in caso di insufficienza funzionale del rene ad un rapido accumulo dei due antibiotici.

Piccole quote dopo trattamento orale, vengono eliminate inalterate con le feci, mentre la maggior parte viene metabolizzata dagli enzimi digestivi.

Agenti attivi a livello ribosomiale

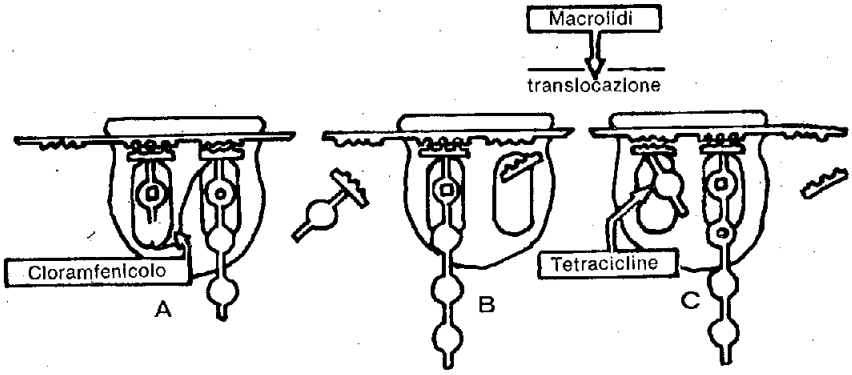
Assai più importanti di quelli del gruppo precedente sono gli antibiotici attivi a livello di sub-unità ribosomiale: le tetracicline, gli amino-glicosidici, il CAF.

Tutti questi antibiotici agiscono inibendo la sintesi proteica. Le tetracicline, come del resto gli amino-glicosidici, si legherebbero in modo specifico alle sub-unità ribosomiali 30S e così facendo impedirebbero il contatto tra aminoacil-RNA ed il complesso ribosoma-mRNA (Graf. 5).

Il legame di questi antibiotici alle subunità ribosomiali sensibili (30S per le tetracicline e gli aminoglicosidici, 50S per il CAF) provoca in genere un'errata lettura dei codici genetici con conseguente,

inevitabile formazione di proteine anomale o comunque non adatte alla moltiplicazione ed al metabolismo batterico.

Non va dimenticato che i ribosomi batterici, più piccoli e leggeri di quelli presenti nelle cellule eucariotiche, hanno costante di sedimen-

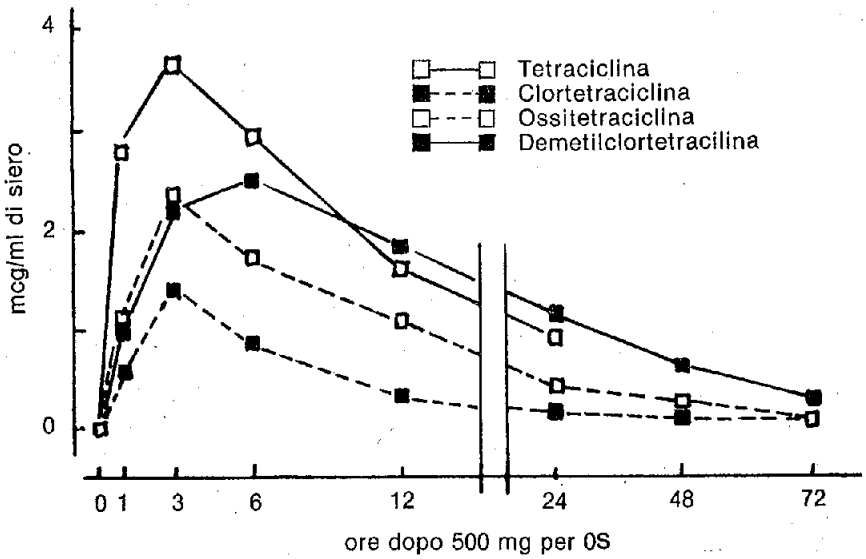


GRAF. 5: Schema del meccanismo d'azione di cloramfenicolo, tetracicline e macrolidi a livello ribosomiale (da FRASCHIN, NICOLIN e SIRTORI, 1978).

tazione 50S e 30S (dove S sta per Svedberg) e questo permette di distinguerli chiaramente dai ribosomi delle cellule degli animali superiori caratterizzati da costanti di sedimentazione 40 e 60. Queste differenze spiegherebbero il motivo per cui tali antibiotici sono tossici per le cellule batteriche e non per l'uomo o per gli animali, è il cosiddetto fenomeno della *tossicità selettiva.*

Mentre però il meccanismo d'azione antimicrobica è relativamente simile in gruppi di antibiotici così lontani fra di loro, degli aspetti del tutto diversi presentano le loro farmacocinetiche. Le tetracicline, dopo somministrazione orale, sono assorbite dal tratto gastrointestinale in modo massiccio se pure incompleto (Graf. 6).

Livelli ematici terapeuticamente significativi sono mantenuti per circa 6 ore dopo l'ingestione (un maggior grado di assorbimento può essere ottenuto utilizzando tetracicline di più recente acquisizione co-



GRAF. 6: Cinetica plasmatica delle tre tetracicline naturali e della demetilclortetraciclina dopo la somministrazione di una dose orale di 500 mg in soggetti volontari (da FRASCHIN, NICOLIN e SIRTORI, 1978).

me la demetilclortetraciclina e la doxiciclina).

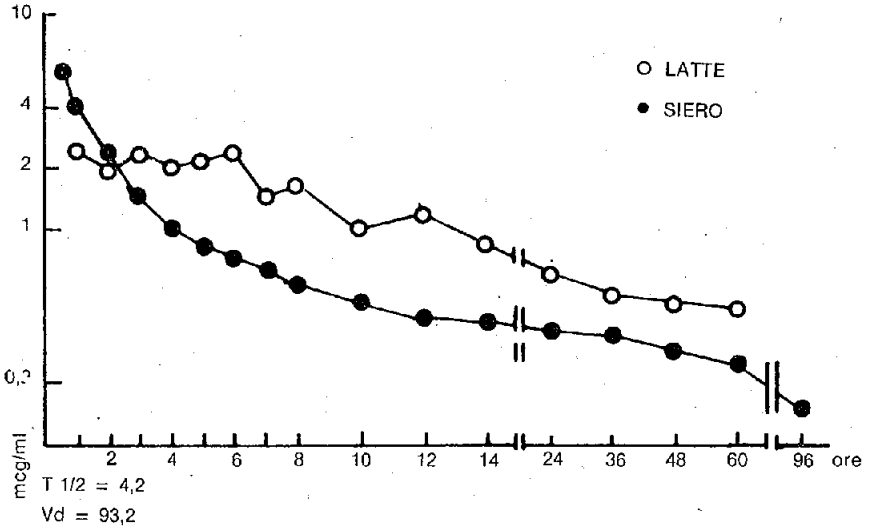
Abbastanza sfruttata è anche la via di somministrazione parenterale (l'istoirritabilità, conseguente all'iniezione e dovuta al pH acido delle soluzioni, è ridotta dall'aggiunta ai preparati commerciali di anestetici locali). I livelli ematici di antibiotico e la loro persistenza nel tempo risultano significativamente maggiori di quanto osservato dopo somministrazione orale (intervalli di somministrazione di 8-12 ore contro le 6-8 ore della via orale - Graf. 7a, 7b). Le concentrazioni tessutali più significative sono reperibili a livello epatico, polmonare, splenico e renale. Una particolare affinità le tetracicline dimostrano nei confronti dei sali di calcio e di magnesio: in misura massiccia infatti si depositano a livello di ossa, denti, pelo, ecc.

Le principali vie di eliminazione sono quella renale e quella biliare; significativa l'escrezione mammaria negli animali in lattazione.

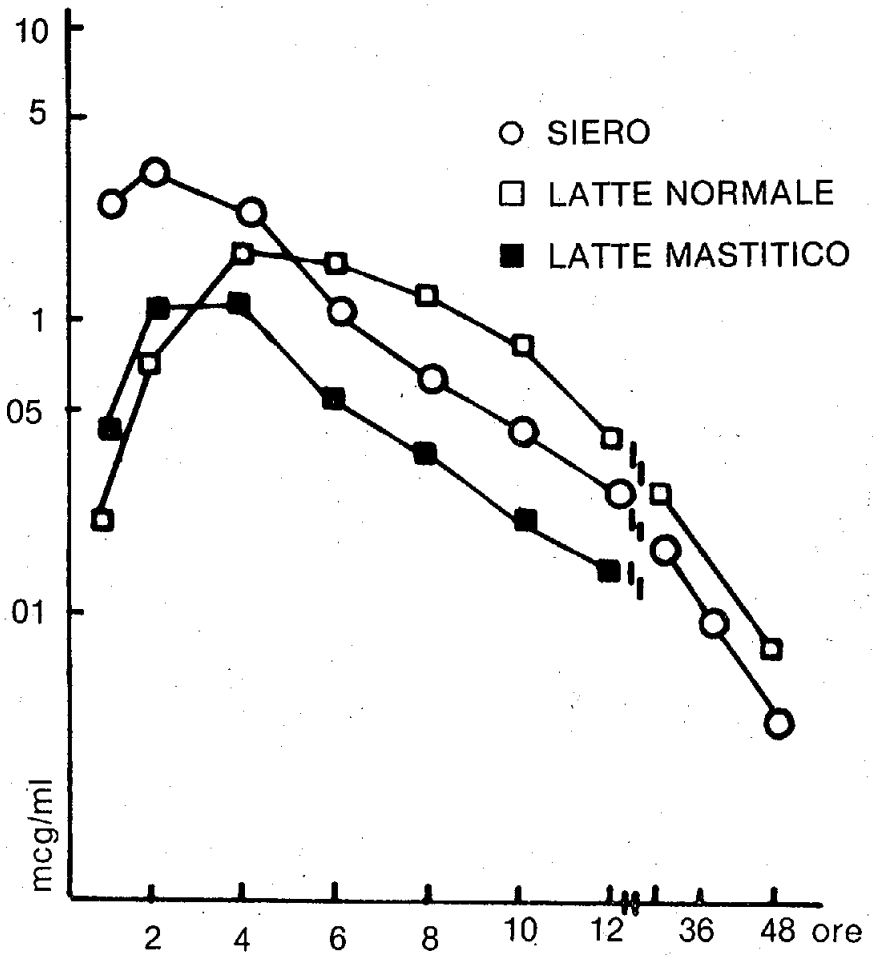
Sensibili differenze possono essere colte esaminando il quadro farmacocinetico offerto dagli *antibiotici aminoglicosidici* (Graf. 8). Questi infatti vengono rapidamente e completamente assorbiti dopo somministrazione parenterale (l'iniezione non comporta alcun problema di istolesività), mentre molto ostacolato è l'assorbimento per os. Si diffondono in modo uniforme nei tessuti, raggiungendo concentrazioni terapeuticamente significative anche nei liquidi ascitico e pleurico. L'eliminazione avviene, in minima parte, per via biliare ed in massima parte (e in forma attiva) per via renale, proponendo reali rischi di tossicità e di accumulo nei soggetti nefropatici.

Anche nel caso di questi antibiotici massiccio è il passaggio del filtro mammario, passaggio che ripropone il problema dei residui di antibiotico e la responsabilità del veterinario nell'accertamento di queste presenze nel latte destinato al consumo diretto od indiretto.

Il cloramfenicolo (CAF), invece, è rapidamente assorbito sia dopo trattamento orale che intramuscolare, provocando il raggiungimento

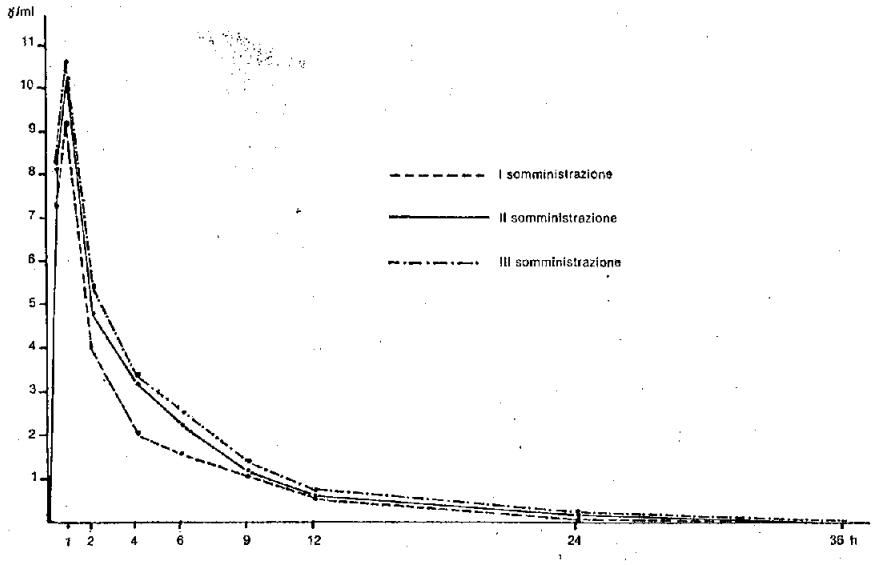


GRAF. 7a: Cinetica della tetraciclina nel siero e nel latte dopo somministrazione e.v. alla dose di 20 mg/kg p.v. (da Ziv G., 1979).



GRAF. 7b: Cinetica della tetraciclina nel siero e nel latte dopo somministrazione i.m. alla dose di 20 mg/kg p.v. (da ZIV G., 1979).

di livelli ematici terapeuticamente significativi rispettivamente dopo 3 ore e dopo 45 minuti. La distribuzione tessutale è rapida e completa: il CAF supera la barriera ematoencefalica e placentare ed il filtro mammario. La metabolizzazione è, per oltre il 50% della dose, a livello epatico; l'eliminazione è prevalentemente renale, per escrezione tubulare, sia in forma attiva che metabolizzato.



GRAF. 8: Livelli ematici di gentamicina somministrata nel vitello alla dose di 3 mg/Kg p.v. per 3 volte consecutive a distanza di 24 ore l'una dall'altra (da CARLI, dati non pubblicati).

* * *

Poche parole, a scopo conclusivo, è doveroso dedicare ad un altro aspetto di fondamentale importanza nel determinismo della farmacocinetica degli antibiotici. Vogliamo parlare cioè del veicolo farmaceutico, ossia di quella o quelle sostanze che vengono impiegate come « supporto » di un determinato farmaco influenzandone tanto direttamente quanto indirettamente tutte le caratteristiche di efficacia e di assorbimento ed eliminazione che abbiamo analizzato sopra.

In modo riassuntivo possiamo citare le preparazioni estemporanee, le soluzioni acquose (a rapido assorbimento ed a rapida escrezione) oppure le sospensioni oleose ed i sali-deposito (preparati questi a lento o semilento assorbimento ed a persistenza nell'organismo protratta nel tempo).

Le interazioni tra farmaci e le reazioni individuali ai trattamenti

sono ormai delle realtà cliniche con le quali ci si deve misurare quotidianamente: è ormai indispensabile quindi sviluppare in modo sempre più approfondito una razionale farmacologia clinica veterinaria che permetta di sottrarre questo settore della terapia animale a quell'empirismo ancora troppo spesso affiorante.

BIBLIOGRAFIA

1) AIAZZI MANCINI M., DONATELLI L.: Trattato di Farmacologia, Vallardi Ed., Milano, 1969.
2) BRANDER G.C., PUGH D.M.: Veterinary applied Pharmacology and Therapeutics, Bailliere Tindall Ed., London, 1977.
3) DAYKIN P.W.: Veterinary applied Pharmacology and Therapeutics, Bailliere Tindall 7d., London, 1960.
4) FAUSTINI R.: Farmacologia Veterinaria, Org. Edit. Medico-Farmaceutica, Milano, 1976.
5) FESCE A.: Microbiologia ed Immunologia Generale e Comparata, U.T.E.T., Torino, 1976.
6) FRASCHINI F., NICOLIN A., SIRTORI C.R.: Manuale di chemioterapia, C.E.A., Milano, 1978.
7) GLASBY J.S.: Encyclopaedia of Antibiotics, J. Wyley and Sons Ed., London, 1976.
8) GOODMAN L.S., GILMAN A.: The Pharmacological Basis of Therapeutics, McMillan Co., Ed., N.Y., 1976.
9) JONES M.L., BOOTH N.H., MC DONALD L.E.: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Iowa Univ. Press, Ames, 1977.
10) KORZYBSKI T., KOWSZYK Z., GIUDIFER KURYLOWICZ W.: Antibiotics. Origin, Nature and Properties, Pergamon Press, London, 1967.
11) SPINELLI J.S., ENOS L.R.: Drugs in Veterinary Practice, The C.V. Mosby Company, S. Louis, 1978.
12) WADE A.: Martindale. The Extra Pharmacopoeia, Pharmaceutical Press, London, 1977.
13) WILSON A., SCHILD H.: Farmacologia Applicata, Piccin Ed., Padova, 1972.
14) ZIV G.: Practical Pharmacokinetics Aspects of Mastitis Therapy, Bovine Mastitis, Regional Seminar, Beecham Laboratories, 1979.

F. MONTI e C. GIRARDI

TOSSICITÀ LOCALE E GENERALE DEGLI ANTIBIOTICI ED EFFETTI COLLATERALI

INTRODUZIONE

I fenomeni collaterali di ordine locale e generale consecutivi all'uso degli antibiotici sono tutt'altro che infrequenti nel settore veterinario.

Anche se non è facile reperire dati attendibili in proposito, tuttavia l'esperienza pratica e gli elementi desunti dalla letteratura consentono di sostenere che buona parte degli effetti collaterali riscontrati in veterinaria sono imputabili ad antibiotici.

L'indagine condotta in merito nel 1977 (24) presso la Clinica Veterinaria dell'Università della California (39,451 casi clinici esaminati) evidenzia che più del 30% dei fenomeni collaterali sicuramente accertati erano imputabili a farmaci antiinfettivi.

Questo riscontro trova conferma nel resoconto pubblicato annualmente dalla FDA sugli effetti collaterali riscontrati nel settore veterinario (vengono raccolte segnalazioni di veterinari pratici, cliniche veterinarie, istituti di ricerca, ecc.).

Nel 1977 infatti (15), su 3.004 casi riportati, più del 26% sono riferibili all'impiego di antibiotici e chemioterapici.

Le manifestazioni di intolleranza ricollegabili alla somministrazione di antibiotici possono essere suddivise schematicamente in tre gruppi (23):

— fenomeni tossici diretti;
— fenomeni dipendenti dall'attività antibatterica;
— fenomeni allergici.

Per fenomeni tossici diretti si intendono i fenomeni collaterali legati all'azione diretta del farmaco.

Sono imputabili alla dose di antibiotico presente nell'organismo; la loro intensità e durata dipendono pertanto dall'entità della dose somministrata e dalla durata della terapia.

Sono prevedibili, riproducibili e spesso, anche se non sempre, reversibili con la sospensione del trattamento.

Non tutti gli antibiotici sono dotati di ugual grado di tossicità; in linea di massima si può affermare che la tollerabilità è direttamente proporzionale al grado di tossicità selettiva.

Le penicilline ed in generale tutte le β-lattamine possiedono un elevato coefficiente terapeutico, strettamente correlato all'elevato grado di tossicità selettiva.

Questi antibiotici infatti, agiscono selettivamente a livello della parete cellulare dei batteri, di cui sono sprovviste le cellule degli organismi superiori, sulle quali pertanto le β-lattamine non svolgono azione tossica.

Gli altri antibiotici, invece, sono forniti di minor tossicità selettiva poiché esplicano la propria azione a livello di strutture presenti non solo nei batteri ma anche nelle cellule degli organismi superiori (ad esempio i polipeptidi che agiscono a livello della membrana cellulare).

È anche possibile riscontrare effetti tossici imputabili non all'antibiotico come tale ma alle sostanze con esso salificate.

Ad esempio, nel corso della somministrazione di penicilline a forti dosaggi, si introducono nell'organismo elevate quantità di sodio o di potassio (Tabella n. 1), tali da risultare nocive specialmente in soggetti cardiopatici o nefropatici.

TABELLA 1: Apporto di elettroliti.

Antibiotici	Elettroliti
1 milione U penicillina G sodica	1,7 mEq di Na
1 milione U penicillina G potassica	1,65 mEq di K
1 grammo ampicillina sodica	3,4 mEq di Na

Se la somministrazione viene eseguita per via endovenosa troppo rapidamente, anche dosaggi poco elevati possono risultare pericolosi.

Ndiritu e coll. (24) riportano due casi di arresto cardiaco, uno in un puledro ed uno in un gatto, consecutivi all'inoculazione di penicillina potassica per via endovenosa alla dose di 10.000 UI/Kg.

Purtroppo non sempre è facile trovare precisi riferimenti bibliografici sui vari fenomeni collaterali riscontrabili nelle diverse specie animali. I dati riportati in letteratura riguardano prevalentemente i piccoli animali (cani, gatti, animali di laboratorio).

I fenomeni descritti in questi animali possono, in linea di massima, comparire anche nei grossi animali, soprattutto se vengono praticate terapie protratte e utilizzati dosaggi molto elevati (eventualità tutt'altro che rara) o se vengono trattati soggetti in particolari condizioni patologiche e para-fisiologiche.

Pertanto, una corretta utilizzazione degli antibiotici non deve mai prescindere dall'attenta considerazione, caso per caso, della potenziale tossicità, a livello dei vari apparati, delle sostanze che si intendono somministrare.

È infatti possibile suddividere gli effetti tossici in base agli apparati ed agli organi interessati (23,26).

1) *Effetti tossici locali*

Insorgono localmente nel punto di contatto dell'antibiotico con i tessuti (tessuto muscolare, sottocutaneo, mucosa gastrica, cute). Da un punto di vista clinico sono caratterizzati da fenomeni infiammatori nel punto di inoculazione; talora da ascessualizzazione nel caso di somministrazione parenterale, da esofagiti, gastriti, ruminiti, nel caso di somministrazione orale.

Spesso la scarsa tollerabilità locale dipende dal pH del farmaco, troppo lontano dalla neutralità. Ad esempio i sali di detraciclina (cloridrati che danno luogo a soluzioni a pH acido) sono scarsamente tollerati a causa del pH e della tendenza a precipitare nel punto di inoculazione. Anche la somministrazione orale può creare problemi; infatti i sali di tetraciclina, a contatto con il pH acido dello stomaco o basico dell'intestino, si idrolizzano liberando basi insolubili che precipitano e determinano fenomeni irritativi (19).

Nei suini alti dosaggi di tartrato di tilosina possono determinare

l'insorgenza di eritema perineale ed edema della mucosa rettale (31, 14).

Altre volte i fenomeni irritativi sono legati al punto di applicazione del farmaco; ad esempio la penicillina, generalmente ben tollerata per via intramuscolare o sottocutanea, può determinare l'insorgenza di tromboflebiti in seguito ad inoculazione per via endovenosa in soluzione concentrata (31).

Così come l'inoculazione di penicillina, in concentrazione elevata, nel liquido cefalo-rachidiano, può determinare l'insorgenza di convulsioni epilettiformi (31).

In altri casi infine, l'effetto irritativo è condizionato da particolari situazioni patologiche; ad esempio l'instillazione di aminoglucosidi per via endoauricolare può determinare seri danni a livello vestibolare e cocleare, se sono presenti lesioni alla membrana del timpano. Osservazioni condotte su gatti (8), utilizzando soluzioni di gentamicina al 10 e 6% inoculate nell'orecchio medio, hanno consentito di evidenziare manifestazioni di atassia rispettivamente dopo 4 e 12 giorni.

2) *Effetti tossici epatici*

Gli antibiotici potenzialmente in grado di determinare fenomeni di epatotossicità sono le tetracicline, la clorotetraciclina in particolare, gli esteri dei macrolidi (eritromicina, oleandomicina), e la rifamicina.

Soltanto dosaggi molto elevati, ad esempio 300 mg di novobiocina/pg di p.c. nel cane (31), sono in grado di provocare la comparsa di manifestazioni cliniche conclamate (ittero).

È più probabile che il decorso sia subclinico; l'esecuzione di esami della funzionalità epatica (transaminasi, bilirubina, ecc.) potrebbe tuttavia evidenziare alterazioni apprezzabili. Nel cane la somministrazione di doxiciclina per trenta giorni alla dose di 250 mg/Kg determina proliferazione dei dotti biliari ed alterazione dei test di funzionalità epatica (31).

In soggetti che presentino deficit della funzionalità epatica, tali alterazioni possono comparire anche a posologie inferiori.

3) *Effetti tossici renali*

Le manifestazioni di intolleranza possono essere limitate alla comparsa di modica albuminuria e cilindruria, oppure comportare sintomi di maggior gravità quali ematuria, oliguria, anuria, aumento dell'azotemia, espressioni di rilevanti danni tubulari.

Per quanto riguarda gli antibiotici che ne sono responsabili, alcuni sono fortemente nefrotossici (aminoglucosidi, polipeptidi).

La neomicina ad esempio, alla dose di 24 mg/kg/die per via intramuscolare, per un mese, è in grado di determinare lesioni tubulari nel cane (31); la dose di 33 mg/Kg, sempre nel cane, determina seri danni tubulari già dopo 7 giorni; gli altri aminoglucosidi sono dotati di minore tossicità.

Le polimixine alla dose di 1,67 mg/Kg/die per via sottocutanea determinano nel cane la comparsa di proteinuria (31); la p. A determina lesioni renali più gravi rispetto alla p. B ed alla p. E.

Sia gli aminoglucosidi che i polipeptidi, grazie allo scarso assorbimento intestinale, non presentano generalmente pericoli di tossicità quando sono somministrati per via orale.

Altri antibiotici (26) sono debolmente nefrotossici e soltanto posologie molto elevate e protratte nel tempo possono determinare l'insorgenza di manifestazioni di intolleranza (cefalosporine - tetracicline scadute).

Anche in questo caso i soggetti sofferenti di un deficit della funzionalità renale possono più facilmente manifestare fenomeni di intolleranza.

4) *Effetti tossici ematologici*

Il cloramfenicolo è il principale responsabile di depressione midollare.

È possibile riscontrare due tipi di alterazioni: *un'anemia aplastica irreversibile* non strettamente collegata alla dose somministrata ed una *anemia reversibile* in dipendenza dalla dose somministrata.

Il primo tipo di anemia è descritta nell'uomo, ma non è riportata negli animali.

L'anemia reversibile, dipendente dalla dose somministrata, è in-

vece riscontrabile sia nell'uomo che nel cane, nel gatto ed in altri animali.

Il grado di depressione del midollo osseo è in relazione alla dose somministrata ed al tempo di esposizione al farmaco (anche se nel cane e nel gatto possono essere evidenziati segni di depressione midollare già dopo 5-6 giorni di somministrazione, perché compaiano alterazioni ematiche sono richiesti trattamenti di almeno 1-2 settimane).

Per via orale nel cane sono descritte manifestazioni di intolleranza in seguito alla somministrazione di 250 mg/Kg/die; nel gatto di 50 mg/pg/die (9,31).

Oltre alle manifestazioni a carico del midollo osseo, compaiono spiccata anoressia e fenomeni depressivi; normalmente questi sintomi precedono gli effetti sul sistema emopoietico.

Anche per quanto riguarda la tossicità ematica, soggetti in particolari situazioni, come ad esempio animali giovani oppure sottoposti a stress, possono risultare maggiormente sensibili.

Da segnalare inoltre che nel coniglio è stato dimostrato che il cloramfenicolo ad alte dosi è in grado di svolgere un'azione immunosoppressiva, inibendo la sintesi anticorpale (9).

Le dosi terapeutiche sembrano però svolgere una modesta attività immunosoppressiva.

Tuttavia nell'uomo è stato osservato che dosi terapeutiche sono in grado di inibire la risposta immunitaria nel caso di vaccinazione di richiamo con anatossina tetanica (9).

5) *Effetti tossici nervosi*

Il sistema nervoso può essere interessato a vari livelli: encefalo, nervi, placche neuro-muscolari.

— *Encefalo:* le encefalopatie acute con disturbi del comportamento, agitazione e depressione sono rare; possono comparire in seguito ad uso prolungato di streptomicina ed eventualmente di polimixine e bacitracina.

— *Nervi*: tutti gli aminoglucosidi, se somministrati a dosi elevate per lunghi periodi di tempo, sono in grado di svolgere azione tossica sull'ottavo paio di nervi cranici, sia a livello vestibolare che acustico; i gatti e gli animali neonati sono particolarmente sensibili. La strepto-

micina è più tossica a livello vestibolare, la diidrostreptomicina a livello acustico.

Le lesioni vestibolari si traducono in alterazioni dell'equilibrio e dell'andatura; atassia e nistagmo.

La guarigione richiede periodi molto lunghi (più di 18 mesi) e può non essere completa (31).

Per quanto concerne i dosaggi in grado di produrre tali sintomi, sperimentazioni condotte sui piccoli animali hanno evidenziato che la streptomicina è in grado di svolgere azione tossica a livello vestibolare se iniettata alla dose di 200 mg/Kg per 17 giorni nel cane e di 50 mg/Kg per 25 giorni nel gatto; sempre nel gatto la neomicina alla dose di 50 mg/Kg determina lesioni vestibolari già dopo soli 5 giorni (8).

Le alterazioni acustiche comportano una diminuzione dell'udito; gli studi su questo argomento sono limitati nel settore veterinario dalle difficoltà che si riscontrano nel determinare il grado della diminuzione delle capacità uditive degli animali. Tuttavia numerose sono le segnalazioni riguardanti il cane ed il gatto.

Ad esempio un cane di circa 33 Kg trattato per via parenterale con 1,25 g/die per 6 giorni con una miscela di streptomicina e diidrostreptomicina e quindi per 5 giorni con 500 mg/die di neomicina, dopo tre settimane dall'ultimo trattamento ha presentato segni di diminuzione dell'udito e nella settimana seguente sordità (17).

Si tratta di posologie elevate ma non molto lontane da quelle comunemente consigliate.

Nel gatto, sperimentazioni condotte misurando la sensibilità acustica hanno evidenziato che la somministrazione parenterale di neomicina alla dose di 80 mg/Kg determina diminuzione dell'udito già dopo soli cinque giorni (31).

La presenza di una insufficienza renale con conseguente ritardo nell'eliminazione del farmaco favorisce la comparsa di fenomeni di oto-tossicità.

La somministrazione per via orale, grazie allo scarso assorbimento intestinale degli aminoglucosidi, non comporta invece pericoli di sorta.

— *Placche neuromuscolari:* diversi antibiotici possono determinare blocco neuro-muscolare; si tratta di un fenomeno di tipo acuto che si

manifesta in seguito a somministrazione di forti dosi per via endovenosa od intraperitoneale.

Questi farmaci bloccano le giunzioni mioneurali in modo simile al curaro determinando paralisi della muscolatura striata, in particolare paralisi dei muscoli respiratori con apnea (8).

Svolgono azione neuro-bloccante gli aminoglucosidi, le tetracicline, la lincomicina, le polimixine.

Nel cane compaiono manifestazioni di blocco neuro-muscolare con la somministrazione per via endovenosa di 10 mg/Kg di neomicina, 10 mg/Kg di polimixina (31).

Gli anestetici generali come l'etere ed il pentobarbital possono potenziare questo effetto (8).

Un'esperienza condotta su cani anestetizzati con etere (8) è molto significativa in merito: il volume respiratorio medio di 5 soggetti sottoposti ad anestesia, che era di 2,56 litri/m, dopo 4 m dalla somministrazione di neomicina per via parenterale, alla dose di 10 mg/Kg, scese a 0,45 litri/m.

Gli anticolinesterasici (neostigmina) ed i sali di calcio sono in grado di opporsi al blocco neuromuscolare; i primi antagonizzano gli effetti postsinaptici, i secondi possono opporsi agli effetti presinaptici (3).

Altri antibiotici quali β-lattamine, cloramfenicolo e macrolidi, non esercitano blocco neuro-muscolare, ma sono in grado di potenziare l'azione di agenti dotati di questa attività (26).

È quindi sconsigliabile negli animali sottoposti ad anestesia generale, soprattutto se trattati con curarosimili, somministrare per via endovenosa od endoperitoneale forti dosi di antibiotici capaci di determinare blocco neuro-muscolare.

È opportuno inoltre ricordare che il cloramfenicolo può prolungare l'effetto degli anestetici generali interferendo a livello epatico con gli enzimi che intervengono nel metabolismo di queste sostanze ritardandone la degradazione. Studi condotti su gatti (1), mediante somministrazione di 30-35 mg/Kg di cloramfenicolo 10-15 minuti prima dell'anestesia con pentobarbital, hanno dimostrato che la durata dell'anestesia viene aumentata di 2,4-3,6 volte rispetto ai controlli non trattati con cloramfenicolo.

D'altra parte il pentobarbital è in grado di accelerare la degrada-

zione del cloramfenicolo diminuendone i livelli ematici ed il tempo di emivita.

6) *Effetti tossici cardiovascolari*

Nell'uomo sono descritti casi di arresto cardiaco consecutivo alla somministrazione di alte dosi di kanamicina (27), e fenomeni ipotensivi consecutivi alla terapia con cloramfenicolo, streptomicina, gentamicina, kanamicina e lincomicina (10, 13, 20).

Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che il cloramfenicolo, gli aminoglucosidi e le tetracicline diminuiscono la forza contrattile cardiaca nel cane (29), nel gatto (10) e nel coniglio (30).

Gli aminoglucosidi oltre a ridurre la gittata cardiaca e determinare bradicardia, diminuiscono la pressione sanguigna, agendo non solo a livello cardiaco, ma anche a livello periferico mediante vasodilatazione e riduzione delle resistenze periferiche (10, 30). Si pensa che sia l'azione a livello cardiaco che quella a livello vascolare siano dipendenti dall'interferenza degli aminoglucosidi con il metabolismo del calcio (4, 2, 18). In effetti la somministrazione di cloruro di calcio è in grado di bloccare l'effetto depressivo cardio-vascolare degli aminoglucosidi (4).

La depressione cardiovascolare si manifesta se gli aminoglucosidi vengono somministrati rapidamente per via endovenosa od endoperitoneale utilizzando dosaggi più elevati di quelli comunemente adottati in terapia (8).

Nel cane ad esempio la inoculazione di streptomicina alla dose di 32-40 mg/Kg riduce la frequenza cardiaca del 19-20% e la pressione sanguigna del 40-60% (4).

Negli animali sottoposti ad anestesia la depressione cardiovascolare risulta più spiccata (4); la massima depressione si riscontra 2-5 minuti dopo la somministrazione degli antibiotici; la funzione cardiovascolare ritorna nella norma dopo 30-60 minuti.

Anche in questo caso la somministrazione di calcio è in grado di antagonizzare rapidamente l'effetto cardio-depressivo.

Gli aminoglucosidi interferiscono con il metabolismo del calcio determinando ipocalcemia. Sono stati condotti studi anche su bovine da latte valutando *in vitro* ed *in vivo* l'effetto della somministrazione parenterale degli aminoglucosidi sulla calcemia (12).

Lazione della gentamicina è stata valutata *in vitro* (2,5-5 mg/ml di sangue); quella della diidrostreptomicina (14 mg/Kg) e della neomicina (4,5 mg/Kg) *in vivo,* rispettivamente in vacche in asciutta ed in lattazione subito dopo il parto.

I risultati (sintetizzati nella Tabella n. 2) permettono di concludere che questi tre antibiotici riducono in modo apprezzabile le frazioni calciche totali e combinate; non viene modificata la frazione non combinata.

TABELLA 2: Effetto ipocalcemico degli aminoglicosidi.

	Ca totale (mg/100 ml)	
	prima del trattamento	dopo il trattamento
a) 4 bovine in asciutta ev. 14 mg/Kg diidrostreptomicina	8,40	7,40
b) 13 bovine post-partum ev. 4,5 mg/Kg neomicina	7,07	6,52

Da segnalare che su 13 bovine, trattate con neomicina 12 ore dopo il parto, soltanto 3 non hanno presentato manifestazioni cliniche; le altre hanno presentato tutte sintomi di varia gravità (fascicolazioni muscolari, dispnea, atassia, collasso) e 2 sono morte.

Alla luce di questi risultati risulterebbe l'indicazione di utilizzare con prudenza questi antibiotici nel periodo post-partum, in particolare nelle bovine con precedenti di collasso puerperale, evitando in ogni caso la somministrazione di elevate posologie per via endovenosa od endoperitoneale.

Ritornando alle manifestazioni di depressione cardio-vascolare, è probabile che in animali normali la somministrazione di antibiotici non sia in grado di determinare la comparsa di segni clinici apprezzabili. Sarà invece buona norma utilizzare con prudenza tali farmaci negli animali in cui è presente ipotensione o depressione cardiovascolare.

7) *Effetti tossici embrio-fetali*

Il cloramfenicolo è in grado di esercitare azione inibente sul sistema emopoietico fetale (21), di inibire la sintesi proteica e lo sviluppo del sistema enzimatico fetale (16).

Le tetracicline si fissano sul tessuto osseo, ritardando lo sviluppo dello scheletro fetale, determinano ipoplasia dello smalto dentario, colorazione giallastra e fluorescenza dei denti da latte (21, 25).

La streptomicina e gli aminoglucosidi in genere, se somministrati a posologia elevata e per lungo tempo, possono esplicare ototossicità anche a livello fetale (21).

Le stesse considerazioni valgono per gli animali neonati sia nel caso di trattamento diretto che nel caso di trattamento indiretto (trattamento della madre con passaggio degli antibiotici nel latte; sia il cloramfenicolo che le tetracicline passano in notevole quantità nel latte).

Come è già stato precisato i fenomeni tossici descritti sono generalmente potenziali, poiché i dosaggi in grado di produrli sono di norma parecchio superiori a quelli utilizzati in terapia. Al di fuori però di eventuali errori di dosaggio, l'intervento contingente di determinate situazioni organiche può rendere attuale questo pericolo potenziale.

Condizioni patologiche di varia natura, quali insufficienze renali od epatiche, che influiscono sulla eliminazione e degradazione dei farmaci, alterazioni cardio-vascolari — tanto per ricordarne alcune — possono modificare in modo radicale la risposta del soggetto trattato ai farmaci somministrati. Non va in proposito sottovalutato il fatto che le prove di tossicità acuta e cronica dei farmaci vengono comunemente eseguite in soggetti in normali condizioni di salute e non sono quindi sempre prevedibili gli effetti degli stessi farmaci in soggetti con grave scompenso cardiaco od insufficienza renale. Né va trascurato il fatto che per tali prove spesso si utilizzano animali di laboratorio di specie diversa da quelle in cui il farmaco andrà realmente utilizzato.

Vi sono inoltre non poche situazioni para-fisiologiche (gravidanza, neonati, soggetti anziani, ecc.) che possono modificare la tollerabilità dei farmaci.

La Tabella n. 3 sintetizza brevemente i concetti suesposti: la presenza di una X indica che l'antibiotico, nelle varie situazioni patolo-

giche o parafisiologiche prese in esame, può creare qualche problema di tollerabilità.

TABELLA 3: Impiego degli antibiotici in particolari situazioni patologiche e para-fisiologiche.

	Penicilline	Aminoglucosidi	Tetracicline	Caf
Affezioni epatiche			X	X
Affezioni renali		X	X	
Affezioni cardiache	X	X		
Anestesia		X	X	X
Gravidanza		X	X	X
Post partum		X	X	X
Neonati		X	X	X

Altra eventualità da considerare è l'associazione di più antibiotici o di antibiotici con altri farmaci. È possibile che l'associazione aumenti il pericolo di tossicità.

La Tabella n. 4 ne illustra qualche esempio.

TABELLA 4: Associazioni di antibiotici ed altri farmaci che comportano aumento della tossicità.

aminoglucosidi + polipeptidi	aumento tossicità renale
aminoglucosidi + furosemide	
aminoglucosidi + curarizzanti	aumento del pericolo di blocco neuro-muscolare
polipeptidi + curarizzanti	

Come regola generale si può ricordare che è bene non associare farmaci che presentino una potenziale tossicità sugli stessi organi; ad esempio aminoglucosidi e polipeptidi, entrambi tossici a livello renale.

Ultima eventualità da considerare è l'errore posologico, che nel settore veterinario può essere facilitato dalla notevole differenza di mole esistente tra le varie specie animali.

FENOMENI DIPENDENTI DALL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA

Sono imputabili all'attività specifica dell'antibiotico sulla flora batterica saprofita o patogena.

1) *Dismicrobismo*

È la conseguenza dell'attività degli antibiotici sulla flora saprofitica normalmente presente nell'organismo, a livello dell'apparato respiratorio, urinario e soprattutto gastro-enterico.

Viene alterato il normale equilibrio intermicrobico (23), cioè la depressione o la scomparsa, per effetto dell'antibiotico, di determinati microorganismi, provoca di conseguenza un incentivo alla moltiplicazione di altri microorganismi, talora patogeni, non più frenati dai normali fenomeni di antagonismo microbico.

Questa situazione può determinare due pericoli: *soprainfezioni da selezione microbica,* di cui sono responsabili germi (stafilococchi antibiotico-resistenti - enterococchi - protei - clostridi) o funghi (genere *Candida*). Il pullulamento di tali microorganismi determina l'insorgenza di stati morbosi di difficile guarigione, ad esempio enteriti e diarree croniche.

Altra conseguenza del dismicrobismo è la *carenza di fattori vitaminici* (es. vitamina K - vitamine del gruppo B), dovuta alla scomparsa della flora batterica che normalmente li sintetizza a livello enterico e all'alterato assorbimento da parte della mucosa intestinale lesa dall'azione tossica degli antibiotici.

La condizione di avitaminosi e le azioni tossiche dirette degli antibiotici sulle mucose, ne riducono la resistenza ai fenomeni infiammatori e favoriscono l'attecchimento della flora micotica; l'azione degli

antibiotici determina un rallentamento dei processi di rigenerazione delle mucose (23).

Gli antibiotici maggiormente responsabili di fenomeni di dismicrobismo sono quelli forniti di ampio spettro di azione; in particolare ricordiamo le tetracicline, il cloramfenicolo, le penicilline semisintetiche del gruppo dell'ampicillina.

Nel cavallo sono stati segnalati casi di morte, dopo 48-72 ore dall'esecuzione di interventi su fratture del sesamoide prossimale, in animali trattati 48-72 ore prima dell'intervento con 15 g di ossitetraciclina inoculati per via endovenosa in una sola somministrazione (5).

Il sospetto che queste morti fossero imputabili alla tetraciclina stimolò l'esecuzione di prove sperimentali su quattro cavalli in normali condizioni di salute (5). Questi soggetti furono trattati con 15 g di ossitetraciclina per via endovenosa; un soggetto morì dopo 4 giorni, uno dopo 5, uno fu soppresso in condizioni pre-agoniche dopo 12, mentre nel quarto l'esperimento risultò negativo non essendo comparsi sintomi tossici dopo nove giorni.

La sintomatologia fu caratterizzata da diarrea, apatia, anoressia, tachicardia, dispnea.

Gli esami di laboratorio indicavano gravi danni renali ed epatici; l'elettrocardiogramma lesioni miocardiche (extrasistoli). L'esame batteriologico delle feci evidenziò un notevole aumento di *Clostridium perfrigens,* normalmente presente in modesta percentuale nella flora enterica del cavallo. Le necroscopie evidenziarono tiflite e colite catarrale acuta ed emorragica, nefrosi e degenerazione miocardica.

Altri Autori osservarono successivamente la stessa sindrome (11, 6) in soggetti trattati, prima di interventi chirurgici, con dosi modeste di ossitetraciclina (4,4 mg/Kg per via endovenosa).

È probabile che altre forme di diarrea ad eziologia sconosciuta, associate a stress di varia natura descritte da diversi Autori (11) e per le quali Rooney suggerì la denominazione di « colite X », abbiano la stessa eziologia (alterazioni della flora enterica provocata dall'impiego di antibiotici a vasto spettro).

Nella cavia è descritta una grave sindrome che può portare a morte i soggetti colpiti, consecutiva alle alterazioni della flora del cieco determinata dalla somministrazione di antibiotici a vasto spettro (31).

Da sottolineare il fatto che, nel caso di antibiotici come le tetracicline dotate di spiccato circolo enteroepatico, la perturbazione della

flora enterica si realizza anche dopo somministrazione parenterale.

Nei ruminanti (14) la somministrazione per via orale di antibiotici attivi sui germi Gram + (penicilline - tetracicline - cloramfenicolo - macrolidi) può danneggiare seriamente la microflora del rumine determinando evidenti disturbi digestivi.

Dosi di 350 mg di tetracicline al giorno per soggetto aumentano il rischio di disfunzioni ruminali ed atonia (31).

Dosi di 0,5-1 g/die di clortetraciclina per 15 giorni determinano accumulo di sostanza secca, di proteine indigerite e di acidi grassi non esterificati nel rumine (31).

Alla luce di queste considerazioni, nei ruminanti con rumine funzionante, sarebbe bene evitare la somministrazione di antibiotici per via orale.

2) *Massiccia lisi batterica*

La massiccia e rapida disgregazione di batteri e la conseguente liberazione di tossine, in seguito alla somministrazione di forti dosi di antibiotico, possono determinare l'insorgenza di manifestazioni tossico-allergiche (febbre, collasso cardiocircolatorio).

Tale fenomeno è noto da tempo nel settore umano sotto il nome di sindrome di Herxheimer, osservata in seguito alla massiccia terapia penicillinica della sifilide.

FENOMENI ALLERGICI

Gli antibiotici possono comportarsi da antigeni completi oppure richiedere l'unione con una proteina sierica vettrice.

Il potere antigene può anche essere legato ad impurità residue del processo di sintesi dell'antibiotico (complessi proteici e polipeptidici) o a prodotti di degradazione dell'antibiotico (ad esempio degradazione consecutiva ad idrolisi).

Da un punto di vista clinico si distinguono fenomeni ad insorgenza immediata (entro 30 m dalla somministrazione), tra cui particolarmente temibile è lo shock anafilattico che può anche portare a morte il soggetto, e fenomeni ad insorgenza ritardata (a distanza di più

giorni dalla somministrazione) caratterizzati da manifestazioni cutanee, spesso pruriginose.

Tra gli antibiotici ritenuti responsabili dell'insorgenza di fenomeni allergici ricordiamo le penicilline (31), responsabili sia di fenomeni anafilattici che di reazioni cutanee, le tetracicline (24), il cloramfenicolo (24); è possibile inoltre che si realizzino reazioni crociate tra penicillina e cefalosporine.

È difficile determinare la reale incidenza dei fenomeni anafilattici od allergici. Molti episodi, ad esempio, riscontrati nel cane e nel gatto e attribuiti ad anafilassi da penicillina, sono dovuti all'uso di associazioni di penicillina e streptomicina o diidrostreptomicina. Orbene molti, se non la maggior parte di questi casi, possono in realtà essere attribuiti a dosaggi eccessivi di streptomicina ed alla depressione respiratoria consecutiva a blocco neuro-muscolare (31). Analogamente molti casi di anafilassi, sempre nel cane e nel gatto, consecutivi all'inoculazione di penicillina procaina, possono in realtà essere attribuiti a tossicità da procaina (agitazione - ipereccitabilità - midriasi ed altri sintomi simpatico-mimetici).

È quindi probabile che la reale incidenza dell'anafilassi da antibiotici nei piccoli animali sia inferiore a quanto viene generalmente presunto.

Lo stesso ragionamento può essere accettato in linea di massima per i grossi animali; infatti per quanto riguarda i cavalli esistono in merito scarsi dati attendibili; per quanto riguarda invece i bovini, i dati reperibili in letteratura sembrerebbero testimoniare che i fenomeni allergici hanno un'incidenza non trascurabile; però anche per questa specie animale è difficile quantizzare la reale entità.

Un'indagine condotta nei bovini in Canada (7) per un periodo di 3 anni, presso 46 veterinari pratici ha evidenziato 720 casi di anafilassi da penicillina (di cui 8 mortali) e 18 casi di fenomeni allergici cutanei sempre da penicillina; 324 casi di anafilassi conseguenti all'associazione penicillina + streptomicina (di cui 5 mortali), 21 casi di fenomeni allergici cutanei all'associazione penicillina + streptomicina. Non è stata però determinata l'incidenza di queste manifestazioni allergiche in rapporto ai fenomeni collaterali ed in rapporto al numero complessivo dei soggetti trattati con antibiotici.

Nel resoconto pubblicato nel 1977 dall'FDA sugli effetti collaterali riscontrati nel settore veterinario (15), su 790 casi dovuti ad

agenti antiinfettivi, ben 670 casi si riferiscono ad anafilassi, di cui 472 dovuti a penicillina e 198 ad ossitetraciclina.

In Francia Ruckebusch e coll. (28) riferiscono, in base ai primi elementi scaturiti dall'inchiesta di farmacovigilanza dei medicamenti per uso veterinario presentata sulla rivista « Le Point Vétérinaire », che almeno 1/3 degli effetti collaterali consecutivi alla somministrazione di agenti antiinfettivi è costituito da reazioni allergiche.

BIBLIOGRAFIA

1) ADAMS H.R., DIXIT B.N. (1970): Prolongation of pentobarbital anesthesia by chloramphenicol in dogs and cats, JAVMA *156*, 902.
2) ADAMS H.R., GOODMAN F.R., WEISS G.B. (1974): Alteration of contractile function and calcium ion movement in vascular smooth muscle by Gentamicin and other aminoglycoside antibiotics, Antimicrob. Agents Chemother, *5*, 640.
3) ADAMS H.R. (1975): Acute adverse effects of antibiotics, JAVMA *166*, 983.
4) ADAMS H.R. (1975): Cardiovascular depressant effects of the neomycin - streptomycin group of antibiotics, Amer. J. Vet. Res. *36*, 103.
5) ANDERSON G., EKMAN L., MANSSON I., PERSSON S., RUBARTH S., TUFVESSON G. (1971): Lethal complications following administration of oxytetracicline in the horse, Nord. Vet. Med. *23*, 9.
6) BAKER J.R., LEYLAND A. (1973): Diarrhoea in the horse associated with stress and tetracycline therapy, Vet. Rec. *93*, 583.
7) BRISBANE W.P. (1963): Antibiotic reactions in cattle, Can. Vet. J. *4*, 234.
8) CLARK C.H. (1977): Toxicity of aminoglycoside antibiotics, Modern Veterinary Practice *58*, 594.
9) CLARK C.H. (1978): Metabolic effects and toxicities of chloramphenicol, Modern Veterinary Practice *59*, 663.
10) COHEN L.S., WECHSLER A.S., MITCHELL J.H., GLICK G. (1970): Depression of cardiac function by streptomycin and other antimicrobial agents, Am. J. Cardiol. *26*, 505.
11) COOK W.R. (1973): Diarrhoea in the horse associated with stress and tetracycline therapy, Vet. Rec. *93*, 15.
12) CRAWFORD C.M., CAMBPELL D.L., HARVEY T. (1977): Hypocalcemic effect of aminoglycoside antibiotics in the dairy cow, Can. J. Comp. Med. *41*, 251.
13) DAUBECK J.L., DAUGHETY M.J., PETTY L. (1974): Lincomycin-induced cardiac arrest: a case report and experimental investigation, Anesth. Analg. *53*, 563.

14) DEBACKERE M. (1972): Effetti indesiderati nei trattamenti medicamentosi di massa, Vlaams Diegeneesk Tijdschr *41,* 465 e Selezione Veterinaria *14,* 562.
15) FDA (1978): Adverse drug reactions, Modern Veterinary Practice *59,* 689.
16) FETTES I.M., FREEMAN D.H., FREEMAN K.B. (1972): Effect of chloramphenicol on enzyme synthesis and growth of mammalian cells, Can. J. Biochem. *50,* 200.
17) FOWLER N.G. (1968): The ototoxicity of neomycin in the dog, Vet. Rec. *82,* 267.
18) GOODMAN F.R., WEISS G.B., ADAMS H.R. (1974): Alterations by neomycin of 45 Ca movements and contractile responses in vascular smooth muscle, J. Pharmacol. Exp. Ther. *188,* 472.
19) GOODMAN L.S., GILMAN A. (1975): The pharmacological basis of therapeutics, 5° ed. Mac Millan Publ. Co Inc. New York.
20) HALL D.A., McGIBBON D.H., EVANS L.L., MEADOWS G.A. (1972): Gentamicin, tubocurarine, lignocaine and neuromuscular blockade, Brit. J. Anaesth. *44,* 1329.
21) HARRIS W.H. (1977) Hazards of administering drugs to pregnant animal: a review, Can Vet. J. *18,* 309.
22) LAEDERS F., PITTINGER C.B., LONG J.P. (1960): Some pharmacological properties of selected antibiotics, Antibiot. Chemother. *10,* 503.
23) LEGRAMANTE A., PELAGALLI L.A., SANTILLI E. (1974): Effetti collaterali e danni della terapia chemio-antibiotica, Il Policlinico, Sez. Pratica *81,* 421.
24) NDRITU C.G., REED ENOS L. (1977): Adverse reaction to drugs in a Veterinary hospital, JAVMA *171,* 335.
25) OWEN L.N., STEVENSON D.E., KEILIN J. (1962): Abnormal pigmentations and fluorescence in canine teeth, Res. Vet. Sci. *3,* 139.
26) PINAULT L. (1974): Toxicité des antibiotiques, Le Point Vet. *1,* 35.
27) REAM C.R. (1963): Respiratory and cardiac arrest after intravenous administration of kanamycin with reversal of toxic effects by neostigmine, Ann. Inter. Med. *59,* 384.
28) RUCKEBUSCH Y., DANTZER R. (1979): Pharmacovigilance des médicaments à usage vétérinaire, Le Point Vet. *9,* 15.
29) SWAIN H.H., KIPLINGER G.F., BRODY T.M. (1956): Actions of certain antibiotics on the isolated dog heart, J. Pharmacol. Exp. Ther. *117,* 151.
30) WOLF G.L., WIGTON R.S. (1971): Vasodilatation induced by streptomycin in the perfused canine kidney, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. *194,* 285.
31) YEARY R.A. (1975): Systemic toxic effects of chemotherapeutic agent in domestic animals, Vet. Clin. Morth. Am. *5,* 51.

S. MALETTO

ANTIBIOTICI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE E SALUTE UMANA

Il problema relativo ai residui di antibiotici nelle derrate di origine animale in rapporto ai rischi che ne potrebbero derivare all'uomo quale loro consumatore, in questi ultimi anni è stato dibattuto ampiamente a livello scientifico, ponendo su un piano di revisione gli stessi principi attivi già ammessi. Del problema si è anche impossessata l'opinione pubblica, la quale vi ha inserito una componente emotiva non sempre valida al raggiungimento di una visione chiara e scientificamente provata dell'oggetto in causa.

Le motivazioni di queste preoccupazioni sono ovvie ed hanno fatto seguito all'individuazione di problemi di ordine vario, tra i quali figurano in primo piano quello delle resistenze batteriche, quello dell'allergogenesi, e quelli della mutagenesi, della teratogenesi e della cancerogenesi, che molti principi attivi e gli eventuali loro metaboliti possono proporre.

Ovviamente il rischio legato alla presenza di residui di antibiotici e dei loro eventuali prodotti di metabolizzazione non va trascurato, e ciò in funzione della enorme diffusione del loro impiego anche continuativo in quasi tutti i momenti del ciclo vitale di tutte le specie di animali di interesse zootecnico.

Il concetto stesso di tossicità, codificato da Paracelso nella frase « *sola dosis fecit venenum* », nel caso delle microdosi di residui assume un aspetto nuovo, chiaramente temporizzato. Infatti l'uomo, come consumatore quotidiano di derrate di origine animale, può divenire un assuntore continuo di detti residui, con rischi di accumulo e di conseguenti effetti cronici ipotizzabili a tempi lunghi. La longevità della specie umana, difficilmente comparabile a quella delle specie animali su cui vengono attuate le prove di laboratorio, rende più difficile accettare come valido ogni criterio estrapolativo.

Circa l'impiego degli antibiotici nel settore animale, quattro sono le modalità di trattamento: quella parenterale, quella perfusiva-cavitaria, quella topica e quella orale. Tutte, in misura maggiore o minore, sono suscettibili di prospettare problemi di residui nelle derrate alimentari.

La via orale, in particolare, è quella che si è andata via via imponendo in parallelo con la tecnicizzazione degli allevamenti, e ciò in funzione del fatto che la miscelazione del principio attivo nell'alimento permette di garantire a tutti gli animali corretti dosaggi con bassi costi di manodopera.

La via orale si presta a realizzare tre tipi di funzioni, che possono essere così schematizzate:

a) *Funzione auxinica,* in cui i principi attivi vengono impiegati a basso dosaggio e senza interruzioni, escluso l'eventuale periodo di sospensione che precede il momento della macellazione. In questo caso l'azione richiesta all'antibiotico è quella di favorire l'accrescimento o le produzioni animali e/o di migliorare il valore dell'indice di conversione dell'alimento con un conseguente vantaggio economico. Non va comunque esclusa anche un'azione generale di tutela dello stato di salute degli animali i quali, in rapporto alle migliorate condizioni nutritive, risultano più vigorosi di fronte ai vari fattori dell'ambiente;

b) *Funzione profilattica,* nella quale i principi attivi vengono impiegati per lunghi periodi di tempo a dosi più elevate rispetto a quelle auxiniche, con lo scopo di prevenire l'insorgenza e la diffusione di malattie infettive o infestive. Di norma questo tipo di trattamento viene interrotto in epoca abbastanza giovanile degli animali, quando cioè la loro recettività alle malattie si riduce, benché vi siano casi, particolarmente per le infestioni, in cui tale rischio sussiste fino al termine della loro carriera produttiva;

c) *Funzione terapeutica,* nella quale i principi attivi vengono impiegati ad alto dosaggio in modo saltuario in qualsiasi momento della vita degli animali ed in concomitanza con l'insorgenza nell'allevamento di malattie infettive gravi, per le quali è possibile l'intervento di massa per via orale.

Per quanto concerne la via parenterale, il problema dei residui è ovvio, data l'immissione diretta del principio attivo ad alti dosaggi nell'organismo, ed è legato direttamente alla quantità introdotta, al

modello e alla cinetica di eliminazione e di eventuale metabolizzazione ed al tempo intercorso tra il trattamento e la macellazione o l'utilizzazione ed al tempo intercorso tra il trattamento e la macellazione o l'utilizzazione di produzioni quali ad esempio il latte. Problema del medesimo tipo si verifica nel caso dell'aspersione di prodotti contenenti antibiotici nell'interno dell'organismo a seguito di interventi chirurgici, caso nel quale il concetto di « dose » non è rigoroso come quando si impiega la via inoculativa.

La via perfusiva, che nel caso degli animali domestici è quasi esclusivamente limitata al trattamento dell'apparato mammario, prospetta due ordini di problemi così schematizzabili:

1) assorbimento e passaggio in circolo dell'antibiotico con sua diffusione in tutto l'organismo;
2) persistenza del principio attivo nelle cavità e nei dotti galattofori o nel parenchima mammario, con eliminazione nel corso della lattazione.

Il trattamento topico è quello che in linea generale prospetta un minore livello di rischio. La barriera cutanea e la normalmente limitata superficie trattata, riducono notevolmente le possibilità di assorbimento e coinvolgono una parte del corpo che molte volte è esclusa come derrata alimentare. Ciò ovviamente non è valido per alcuni prodotti ad azione antiparassitaria, che vengono aspersi su tutto il corpo dell'animale o vengono impiegati per la preparazione dei c.d. « bagni ».

L'impiego stratificato degli antibiotici in tutti gli allevamenti intensivi del mondo, le differenze nelle normative che ne regolano l'accettazione e l'uso ed i tempi di attesa prima della macellazione, nonché la grande massa di interscambio di derrate alimentari, prospettano ovviamente un indice di rischio di difficile valutazione, che potrà essere superato soltanto con una regolamentazione unificata, sia per le modalità d'uso che per il tipo di sostanze ammesse.

I criteri adottati per valutare l'innocuità dei residui degli antibiotici e dei loro metaboliti nelle derrate alimentari prodotte dagli animali di interesse zootecnico non sono ancora unificati e le unità di misura variano da paese a paese. Vi è infatti chi, basandosi su un concetto teorico alquanto restrittivo, pretende il « livello zero », mentre altri ritengono sufficiente l'ordine di grandezza delle centinaia o delle migliaia. Ovviamente questa disparità di vedute rispetto al ter-

mine di « sicurezza » dovrà essere dibattuto e risolto su una base comune che consenta l'applicazione di tecniche di trattamento in funzione del libero scambio delle derrate alimentari, pur garantendo il criterio prioritario della salvaguardia del consumatore. Come regola generale, comunque, la determinazione dell'innocuità dei residui nei tessuti commestibili viene realizzata tenendo conto dei dosaggi effettuati su animali in cui non è stato attuato il tempo di sospensione (tempo zero) e su altri in cui tempi scalari hanno permesso di verificare la cinetica di scomparsa. Sul principio attivo e sui suoi metaboliti, verranno inoltre condotte prove di tossicità subacuta su animali di laboratorio. Si tratta di prove della durata di 90 giorni da condursi su almeno due specie di animali, di cui una non appartenente all'ordine dei roditori (di norma il ratto ed il cane).

I protocolli richiesti per gli studi di tossicità subacuta sono ormai standardizzati e propongono l'impiego di quattro gruppi di animali, tre dei quali trattati per via orale con dosi crescenti del principio attivo in causa ed uno tenuto come controllo. Le dosi dovranno permettere di mettere in evidenza la correlazione esistente tra dose e tossicità e di calcolare la relativa retta di regressione. Ovviamente il numero di animali presenti in ogni gruppo dovrà essere tale da permettere di derivare conclusioni su base matematico-statistica dei dati rilevati nel corso e alla fine delle prove. Tale modello si applicherà anche ai singoli metaboliti del principio attivo. Circa i metaboliti talvolta presenti in numero elevato e non sufficientemente individuabili per il loro esiguo dosaggio, il Ferrando ed il Truhaut hanno proposto la metodica della « Tossicità di relais ». Si tratta di un metodo indiretto di valutazione nel quale si procede alla somministrazione ad animali di laboratorio, di derrate prodotte da animali alimentati con dosi di additivi tali da garantire la presenza di residui del principio attivo e/o dei suoi prodotti metabolici.

Si tratta di un mezzo di valutazione accettato come « coadiuvante » di quelli classici presso gran parte dei paesi della CEE, ma che negli USA viene considerato insufficiente. In Italia, date le limitazioni imposte dalla legge 283, l'applicazione della « Tossicità di relais » alle sperimentazioni non è accettata.

In ogni caso, gli studi sulla tossicità subacuta hanno come primo obiettivo, quello di indicare quale sia il livello esente da effetti negativi facendo riferimento alle specie più sensibili. Queste prove inclu-

dono una vasta serie di esami condotti sugli animali in vita, con controlli sull'appetito, sull'accrescimento, sullo stato di salute, sul comportamento, sull'ematologia e sulla funzionalità degli organi. La prova di funzionalità degli organi deve essere attuata in tutti i gruppi di animali, prima dell'inizio della somministrazione del principio attivo, al trentesimo ed al novantesimo giorno di trattamento. Al termine della prova (90° giorno), si procede all'esame anatomo- ed istopatologico dei tessuti e degli organi di tutti gli animali del gruppo di controllo e di quelli trattati con il dosaggio più elevato, procedendo anche su quelli a cui sono state somministrate dosi minori quando in quest'ultimo si fossero riscontrati effetti tossici.

Soltanto dopo aver individuato la « dose senza effetto », potranno essere portati a termine i calcoli adatti a stabilire il livello di innocuità dei residui nei tessuti, nonché i periodi « di sospensione » atti a garantire il coefficiente di sicurezza per la tutela del consumatore.

Il calcolo dei coefficienti di sicurezza si attua sulla base della quantità di residui contenuti nelle derrate alimentari che potrebbe essere ingerita mediamente per giorno da un uomo del peso di 70 Kg. Tale dato va riferito a 1 Kg di peso corporeo.

Al riguardo può essere chiarificatore il seguente esempio.

Supponendo che un uomo di 70 Kg di peso vivo ingerisca 450 g di carne al giorno e che detta carne contenga 0,1 ppm di residuo di antibiotico, si procede applicando il seguente ragionamento.

La carne in oggetto contiene, come è stato indicato, 0,1 mcg/g (pari a 0,1ppm) di residuo di principio attivo, il che corrisponde a 450 x 0,1 mcg = 45 mcg/450 g.

Ne deriva che un uomo di 70 Kg di peso corporeo, che ingerisca 450 g al giorno di detta derrata, introdurrà nel suo organismo ogni giorno:

$$\frac{45 \text{ mcg}}{70 \text{ Kg}} = \frac{x}{1 \text{ Kg}}; \; x = 0{,}64 \text{ mcg/Kg di peso corporeo}$$

Moltiplicando il valore individuato per un « fattore di sicurezza », si troverà la dose a cui, con le prove di tossicità subacuta precedentemente indicate, non si dovranno verificare effetti negativi.

I fattori di sicurezza variano da paese a paese e sono compresi tra un valore di poche centinaia ed alcune migliaia.

In alcune nazioni è consentito qualsiasi livello di residuo nei tessuti animali purché, tra la concentrazione nel tessuto ed il livello « esente da effetti » trovato con le prove di tossicità subacuta, si realizzi un fattore di sicurezza di 1000-2000. Negli USA ed in alcuni altri Paesi, sono consentite concentrazioni di residui fino ad un massimo di 0,1 ppm indipendentemente dal valore del coefficiente di sicurezza, e ciò fino a quando non siano stati forniti i risultati di tossicità cronica.

Ritornando all'esempio di residui pari a 0,1 mcg/g ed adottando il valore 2000 come criterio di sicurezza, il dosaggio calcolabile risulta pari a:

0,64 mcg/Kg di peso corporeo x 2.000 = 1280 mcg/Kg di peso corporeo = = 1,28 mg/Kg di peso corporeo.

Ne deriva che, nel caso di un uomo di 70 Kg di peso corporeo, il quale consumi 450 grammi di derrate di origine animale contenenti 0,1 ppm di residui, se si desidera un coefficiente di sicurezza di 2.000 volte, non dovranno essere riscontrabili « effetti » sulle specie di animali di laboratorio più sensibili, trattate per 90 giorni con una dose di 1,28 mg di principio attivo/Kg di peso corporeo. Detto dosaggio è per convenzione e per misura prudenziale corretto per eccesso, con un arrotondamento che nel caso particolare è pari a 2 mg/Kg di peso corporeo.

Un altro criterio proposto, è quello di impiegare una « scala di sicurezza progressiva » (Fig. 1).

In essa viene dimostrato in forma schematica che differenti concentrazioni di residui sono in rapporto a livelli « senza effetto tossico » pur mantenendo costante il coefficiente di sicurezza di 2.000 volte. Questa scala può essere modificata imponendo qualsiasi valore del coefficiente di sicurezza.

Nonostante che esistano i mezzi per valutare i limiti di sicurezza, l'opinione del consumatore e quella di numerosi ricercatori e legislatori è orientata ad una posizione dura. Questo comportamento può apparire ovvio, se si pensa a tutta una serie di constatazioni che si inseriscono sul problema e che non permettono di realizzare degli

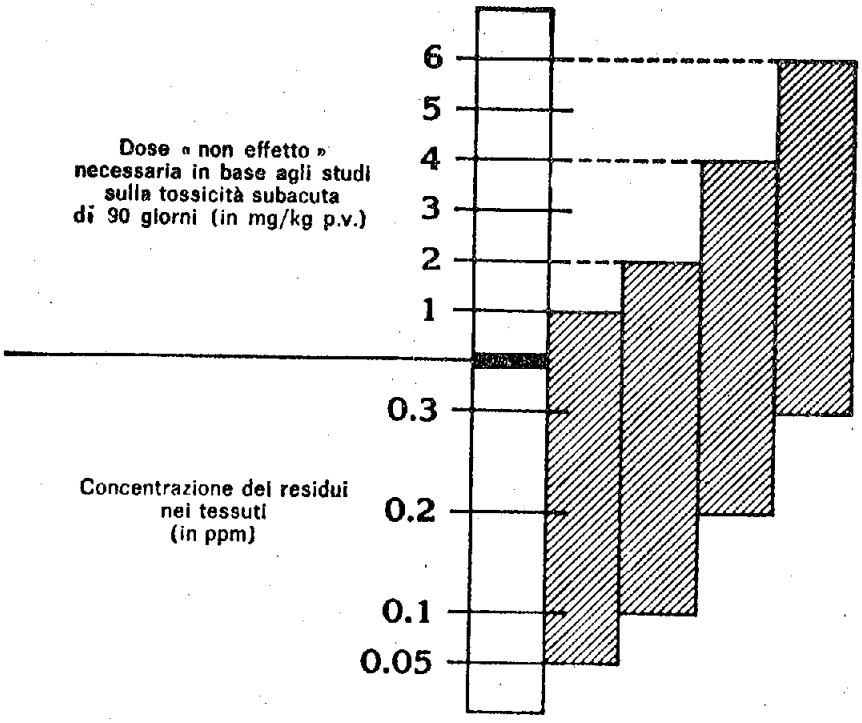


FIG: 1 Scala di sicurezza progressiva riferita ad un coefficiente di sicurezza di 2.000 volte in rapporto a diverse concentrazioni di residui (da C.J. DI CUOLLO) (2).

standards di fatti e opinioni. In particolare risultano fattori di variabilità la presenza sul mercato di numerose sostanze, molto diverse per struttura e azione farmacologica, nonché per modelli di assorbimento, di metabolizzazione, di elettività organistica e tissutale, di eliminazione e di decadimento nel corso della conservazione e dei trattamenti culinari delle derrate che eventualmente le contengono come residui.

Non meno importante appare anche il fatto che in molti casi non si utilizza come additivo il principio attivo puro, ma prodotti miceliali che lo contengono e per i quali appare impossibile, o almeno molto

difficile data l'eterogeneità del sistema, approntare rigorose prove tossicologiche « mirate » su ciascuno dei componenti eventualmente in grado di prospettare problemi di rischio.

Non va ancora trascurato il fatto che sul mercato esistono numerosi prodotti simili, derivati da processi industriali diversi, per i quali dovrebbero essere approntati dossiers sperimentali atti a dimostrare non soltanto l'uguaglianza di azione farmacodinamica con quello originario, ma anche un medesimo comportamento metabolico e simili livelli di accumulo.

Un altro problema è quello dell'osservanza dei tempi di sospensione o dell'intervallo che deve intercorrere tra il trattamento e l'abbattimento dell'animale o prima di destinare una produzione al consumo. Disporre di una regola codificata in Legge, non significa automaticamente che essa sia rigorosamente applicata. Nel caso dell'utilizzazione del principio attivo come farmaco, il valore stesso dell'animale, specialmente quando appartiene alle specie maggiori, può indurre il proprietario a trovare i mezzi per nascondere il fatto quando si rendesse necessario l'abbattimento d'urgenza. Il rischio per il consumatore esiste ed è da mettere in rapporto all'alto dosaggio del farmaco applicato ma, data la rarità dell'evento, appare limitato a fenomeni acuti ed a pochi individui.

Ben più grave e temibile può invece essere il problema quando non si applicano i tempi di sospensione nel caso dell'uso dell'additivo come auxinico. L'impiego continuativo può infatti permettere l'accumulo di residui nei tessuti e negli organi dell'animale, i quali possono entrare come componenti nella dieta dell'uomo ogni giorno, per tutto l'arco della sua vita. In questi casi non è più l'allergogenesi che conta, ma tutta la serie dei rischi c.d. cronici, quali la cancerogenesi diretta o indiretta, la teratogenesi, la mutagenesi, la carenza di risposta immunitaria, l'adattamento al farmaco ecc.

Che vi sia una tendenza da parte dell'allevatore a disattendere l'applicazione dei tempi di sospensione è naturale, perché significa applicare una tecnologia scomoda, che impone di disporre di mangimi non contenenti l'additivo e di impiegarli per un periodo finale di pochi giorni.

La carenza di controlli relativi all'applicazione dei tempi di sospensione da parte di responsabili ufficiali, l'impossibilità di verifica analitica stratificata sulle derrate animali e l'elevato costo della sua

attuazione, nonché l'interscambio di prodotti di origine animale tra paesi tra di loro lontani, suggerisce un elevato rigore valutativo dei dossiers sperimentali e la tendenza ad ammettere esclusivamente come auxinici quei principi attivi che, oltre a non essere enteroassorbibili, allontanino anche altri tipi di rischio. Al riguardo, le competenti autorità sanitarie hanno così elencato i requisiti cui un additivo auxinico deve rispondere:

1) non appartenere alla famiglia chimica cui appartengono farmaci impiegati in terapia umana e/o veterinaria;
2) non esercitare una pressione selettiva nei confronti del fattore R;
3) non indurre resistenze parallele rispetto ai prodotti impiegati in terapia;
4) non possedere proprietà antigeniche e apteniche;
5) non produrre metaboliti nell'organismo animale, in grado di aggravare il problema dei residui nelle derrate alimentari;
6) non essere assorbibili o esserlo soltanto limitatamente;
7) decadere rapidamente nell'ambiente senza proporre problemi di polluzione, con conseguenze sulla vegetazione e sulla vita acquatica e, indirettamente, sull'uomo.

Circa gli schemi sperimentali per la valutazione dei rischi che i residui di principi attivi propongono al consumatore, può servire come « guida » lo schema ricavato dalle « Linee direttrici per la valutazione degli additivi nell'alimentazione del bestiame », preparate dall'apposito Comitato Scientifico della CEE (Fig. n. 2).

Secondo la natura dell'additivo e le circostanze del suo impiego, può essere imposta l'applicazione totale o parziale dello schema. A tale riguardo non deve prevalere alcuna regola rigida. La conoscenza del comportamento e delle trasformazioni dell'additivo nell'animale da allevamento al quale esso è destinato potrà in nessun caso essere fondata su studi limitati all'animale di laboratorio, poiché tali studi non possono fornire alcuna indicazione sul metabolismo del prodotto nell'animale da allevamento, soprattutto per quanto riguarda la natura dei residui e la loro biodisponibilità.

Conclusioni

L'impiego in terapia, profilassi e nutrizione animale di sostanze dotate di attività antibatterica è una necessità assoluta per garantire

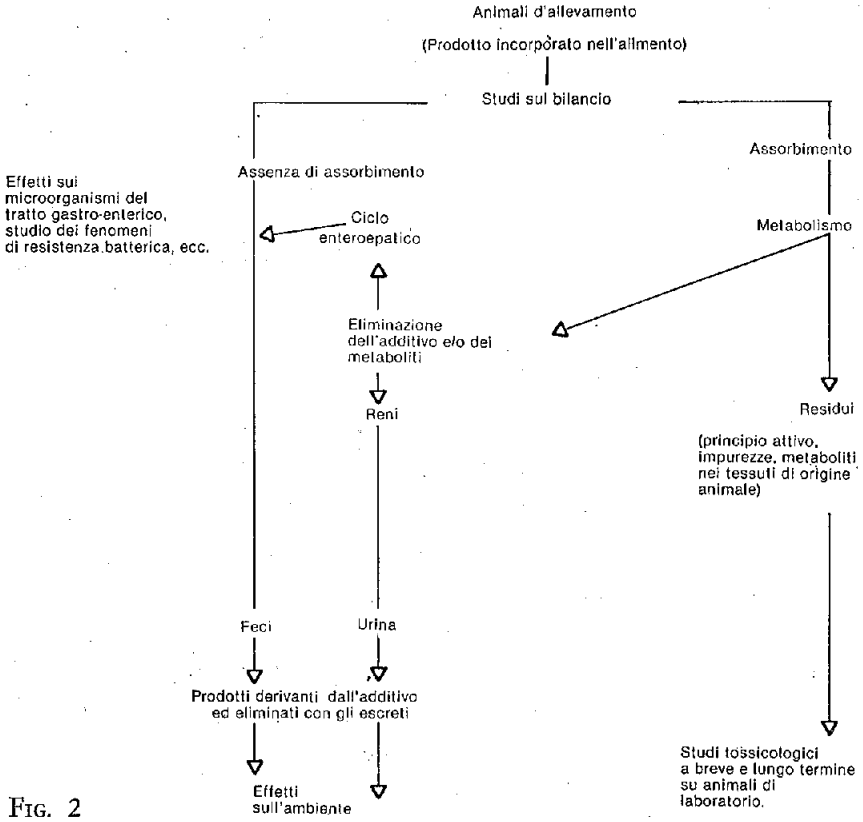


FIG. 2

lo stato di salute degli animali e l'economia degli allevamenti. Queste sostanze hanno però la possibilità di proporre problemi di natura varia, tra i quali emerge fondamentale quello dei rischi per l'uomo come consumatore delle derrate prodotte. Si rende perciò necessaria una continua revisione delle regolamentazioni e la loro rigorosa applicazione al fine di evitare la presenza di residui negli alimenti di origine animale.

Tenendo presente che esiste un mercato clandestino di sostanze non autorizzate e che il controllo rigoroso delle derrate alimentari richiede un impegno tecnico e finanziario notevole senza offrire sempre le garanzie necessarie al consumatore, appare ovvio l'impegno del

veterinario per attuare l'applicazione delle norme di Legge e per realizzare corretti trattamenti terapeutici.

Oltre alle opere di prevenzione e di controllo attuate dai preposti organi pubblici, si rende necessaria l'intensificazione della ricerca scientifica nei settori delle conoscenze tossicologiche e metaboliche dei principi attivi, nonché l'informazione e la responsabilizzazione di tutti coloro che operano nel settore dell'allevamento degli animali produttori di derrate. Il compito non è facile per i differenti modelli di interesse e di cultura che coinvolgono il mondo degli operatori dell'industria farmaceutica e mangimistica, quello del legislatore, del veterinario e dell'allevatore e che coinvolgono su una base più emotiva il consumatore.

Il problema dei rischi da farmaci va indubbiamente esaminato con rigore e, se questi rischi esistono, debbono essere posti in bilancio con i vantaggi che ne derivano alla società dell'uomo. Ciò che conta, ovviamente, è l'onestà scientifica e operativa da cui può nascere la fiducia dell'umanità rispetto alle tecnologie. Onestà da parte degli sperimentatori e di chi dovrà prendere le decisioni o applicarne le regole imposte, e fiducia da parte della società verso coloro che, con la loro competenza e serietà, decidono responsabilmente sull'impiego di queste sostanze.

BIBLIOGRAFIA

1) BENAZET F.: « Les antibiotiques dans l'alimentation animale », Cah. Méd. Vet., 47, 1978.
2) DI CUOLLO C.J.: « Determinazione dell'innocuità per l'uomo della Virginiamicina quale promotore di performance e sua influenza sull'ambiente », Atti Tavola Rotonda su « Performance in Animal Production », Edizioni Minerva Medica, 1980.
3) GANZIN M.: « L'enquêt de consommation dans l'évaluation du risque alimentaire », Vdl. Rev. Nutr. Diet., 29, 1978.
4) MACRÌ A. e C. BRAION: « Tossicologia degli antibatterici in alimentazione animale e residui nelle derrate prodotte », Atti Tavola Rotonda su « Performance in Animal Production », Edizioni Minerva Medica, 1980.

5) MALETTO S.: « La legislazione sull'integrazione dei mangimi a tutela dell'uomo e dell'ambiente », Atti Tavola Rotonda su « Performance in Animal Production », Edizioni Minerva Medica, 1980.
6) SMITH R.V.: « Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds by Intestinal Microrganism », Vld. Rev. Nutr. Diet., 29, 1978.
7) TRUHAUT R. e FERRANDO R.: « Le toxicologue et le nutritionniste face aux problèmes d'évaluation toxicologicque », Vdl. Rev. Nutr. Diet., 29, 1978.

G. BALLARINI

TERAPIA CHEMIOANTIBIOTICA E PROTEZIONE DELLA SALUTE UMANA

Premessa

Il tema della presente esposizione — TERAPIA CHEMIOANTIBIOTICA E PROTEZIONE DELLA SAUTE UMANA — è complesso da un punto di vista teorico, ma ancor più complicato e lontano dall'essere soddisfacentemente risolto da un punto di vista applicativo.

In teoria è facile, anzi *troppo* facile, limitarsi ad enunciazioni come la seguente. I trattamenti degli animali con chemioantibiotici, come con qualsiasi altro farmaco, oltre ad essere *efficaci, competitivi* e *migliorativi* (e cioè *economici*) in confronto ad altri trattamenti (ad esempio preventivi ed igienici), devono essere *sicuri* (e cioè *privi di rischi*) *per l'uomo e per l'ambiente,* con particolare attenzione alle produzioni destinate alla alimentazione dell'uomo (carni, latte, uova, miele). È infatti agevole rilevare che i tre indicati parametri di *efficacia, economicità e sicurezza* non seguono la regola del « tutto o niente », ma ammettono una gradualità; tra loro esiste inoltre una complessa e variata gamma di interrelazioni. È ad esempio possibile che un trattametno sia efficace, economico, ma rischioso (poco sicuro per l'uomo o per l'ambiente); o che un trattamento poco rischioso sia invece scarsamente efficace e/o poco economico. Già da un punto di vista teorico è quindi necessario stabilire criterii di quantizzazione e metodi di « misura » dei parametri sopra indicati e soprattutto di quello della « *sicurezza* » (o se si vuole del *rischio*) che più interessa in questa sede, per arrivare a schemi di valutazione del farmaco nel suo complesso.

Passando alla applicazione pratica è facile, ed anche qui bisogna ripetere *troppo* facile, credere di risolvere tutto con la esclusione di

alcuni o di molti farmaci dall'uso veterinario e/o con la applicazione dei tempi di sospensione. È infatti ben noto che la proibizione di un farmaco efficace, ancorché pericoloso o solo rischioso, ha come immediata conseguenza la sua distribuzione clandestina secondo il principio che « la moneta cattiva scaccia la buona ». I tempi di intervallo tra la somministrazione del farmaco e la utilizzazione delle produzioni animali, i cosidetti « tempi di sospensione », costituiscono una nozione che di semplice ha solo la enunciazione, in quanto sono strettamente collegati alla sensibilità e specificità dei metodi di analisi e ad una perfetta conoscenza della farmacocinetica nelle diverse specie animali, in condizioni di salute e soprattutto di malattia. Tutti problemi questi lontani dall'essere ancora risolti. Non sono inoltre da sottovalutare le difficoltà di far coincidere la applicazione dei tempi di sospensione alle tecnologie di allevamento e di poter effettivamente controllare, sia pure a campione, il loro rispetto.

In questo ordine di idee, lungi dal ritenere di poter esaurire e risolvere l'argomento, e solo come proposta per una discussione (o se si vuole di una « meditazione »), ci soffermeremo su alcuni aspetti del problema che oggi ci paiono di particolare attualità.

* * *

RISCHI DA CHEMIOANTIBIOTICOTERAPIA E TEMPI DI SOSPENSIONE

I rischi per la salute umana conseguenti all'uso di chemioantibiotici negli animali (a scopo di terapia individuale, terapia di massa, chemioantibioticoprofilassi) sono di tipo diretto (tossicità, cancerogenicità, allergizzazione) ed indiretto (chemioantibioticoresistenza diretta e trasmissibile). Anche i rischi riguardanti l'ambiente, seppure molto ridotti nei trattamenti terapeutici e limitati in quelli profilattici, sono di tipo diretto e indiretto, ed analoghi a quelli suindicati.

Una valutazione dei rischi necessita una loro quantizzazione, e solo da questa discende la individuazione di una « soglia » o di un « livello di accettabilità » del rischio. Come già indicato in premessa non è infatti possibile *abolire* ogni rischio tramite la applicazione di tempi di sospensione, che ovviamente si devono basare sulla « certezza » di una completa eliminazione del farmaco. Questa certezza non è raggiungibile, perché il « mitico » livello zero non esiste, in quan-

to dipende solo dalla sensibilità e specificità dei metodi di analisi, che sono in continua evoluzione, come dimostra la TABELLA n. 1 nella quale è indicata la evoluzione nelle tecniche di analisi di alcuni farmaci.

Per quanto riguarda i chemioantibiotici bisogna inoltre rilevare che i metodi di analisi microbiologica, che mettono in evidenza la attività antimicrobica del farmaco, hanno una sensibilità mediocre e pressoché stabile. Altri metodi, e soprattutto quello di molecole marcate con nuclei radioattivi sono in continua evoluzione (vedi Tabella n. 1), hanno sensibilità estremamente più elevate, ma non danno informazioni dirette e sicure sulla attività biologica delle molecole radioattive rilevate nella analisi. Molti di questi metodi, e soprattutto i più sensibili, non sono inoltre utilizzabili per controlli di routine di derrate alimentari.

Chiarito che non è possibile stabilire un livello di sicurezza solo attraverso un tempo di sospensione basato sul « residuo zero », bisogna ricorrere ad un « livello di accettabilità » che per un chemioantibiotico (come per gli altri farmaci) dipende dalla probabilità (*quantizzata*) che l'uso del farmaco costituisca un rischio per la salute umana. Questo rischio è in rapporto alla derrata alimentare (ci viene qui alla mente che il colorante E 123 è ancora permesso per la colorazione del caviale), ma è soprattutto in rapporto ai seguenti tre fattori.

Fattore 1 = Uso: frequenza e finalità del trattamento. Deve essere considerato un *trattamento individuale* a scopo terapeutico o preventivo di una o più malattie ben definite, ed attuato con specialità medicinali o galenici, e sotto diretto controllo medico, ricettazione, ecc. Esiste anche il *trattamento di massa* a scopo terapeutico o preventivo di una malattia ben definita, attuato con « medicato » e sotto controllo veterinario (triplice ricetta, ecc.). Infine esistono *trattamenti sistematici di massa, tramite i chemioprofilattici,* senza controllo veterinario.

Fattore 2 = Livello dei residui (farmaco e metaboliti). A questo riguardo è bene precisare che in ogni specie animale (« specie bersaglio ») esistono organi o tessuti in cui il farmaco raggiunge maggiori concentrazioni o vi permane più a lungo (« organo o tessuto bersaglio »). Negli organi e tessuti bersaglio i chemioantibiotici hanno tempi di permanenza a seconda del metodo di rilevazione. Il metodo microbiologico rivela il farmaco biologicamente attivo con una sensibi-

lità di solito limitata; gli altri metodi (molecole marcate con atomi radioattivi, ecc.) (come esempio vedi Tabella n. 1) hanno invece una sensibilità molto maggiore di quella microbiologica.

Fattore 3 = Potenziale tossico-resistenziale. È a sua volta costituito da almeno tre categorie di caratteri: a) Tossicità (ed attività allergizzante) rilevata con i noti test della farmacologia sperimentale;

TABELLA 1: Evoluzione nelle tecniche di analisi di alcuni farmaci.

Composto e data	*Tecnica analitica*	*Limite di deter.*	*Specificità*
DDT			
1940-1950	colorimetria	10 ppm	bassa
1950-1960	cromatogr. carta	1 ppm	moderata
1970	gascromatogr.	alcune ppb	moderata
	gascrom/spettr. mass.	» »	elevata
Cortisone			
1940	—	—	—
1950-1960	colorimetria	4 mg/ml	bassa
1970	cromat. alta press.	5 ng	moderata
Clorpromazina			
1940-1950	titrimetria	50-100 mcg	bassa
1960-1970	cromatografia	pochi mcg	bassa
Reserpina			
1940	—	—	—
1950-1960	colorimetria	più di 10 ppm	bassa
1970	fluorescenza	circa 5 mcg/ml	alta
Digitale			
1940	test biologico	LD 80 mg/kg	bassa
1950	» »	» » »	»
1960	» »	» » »	
1970	radioimmunol.	circa 0,5 ppb	alta

ppm = parti per milione = mg/Kg o mg/l

ppb = parti per miliardo = μg/Kg o μg/l

b) Cancerogenesi (e mutagenesi almeno come prova preliminare e di *screening*); c) Induzione di chemioantibioticoresistenza, soprattutto di tipo trasferibile e nei riguardi di chemioantibiotici di specifico interesse per la terapia dell'uomo.

Una *quantizzazione* dei potenziali negativi per l'uomo dei suindicati fattori può essere effettuata sulla base di diversi criterii di giudizio. Nella Tabella n. 2 viene proposto uno schema di quantizzazione, che in parte si ispira a quanto proposto negli USA per i carcinogeni negli alimenti di origine animale (FEDERAL REGISTER USA, 20 marzo 1979). I limiti di quantizzazione proposti sono i seguenti: *Fattore 1* da 1 a 100 punti; *Fattore 2* da 1 a 100 punti ed in base alle parti per miliardo (ppb) di residui determinati con metodi di elevata sensibilità (radioattività, radioimmunologia, ecc.); *Fattore 3* da 1 a 1000 punti in rapporto alla positività/negatività dei test di tossicità, cancerogenesi, induzione di antibioticoresistenza; a quest'ultimo proposito va rivelata la particolare attenzione dedicata alla presenza di caratteri di cancerogenicità, da sola o associata ad altri caratteri negativi, che comporta la assegnazione del punteggio massimo di 1000.

Dalla quantizzazione dei singoli potenziali negativi di un chemioantibiotico, è possibile passare ad uno schema di uso del farmaco che contemporaneamente tenga presente il tipo, l'uso e la sua frequenza (media) di impiego, e le potenzialità tossico-resistenziali del farmaco, fornendo contemporaneamente la « soglia di rischio » da non superare e la durata dei tempi di sospensione. Nella Tabella n. 3 è riportato uno schema applicativo, nel quale viene preso come « soglia di rischio » da non superare il valore *1000* (ottenuto moltiplicando i punteggi attribuiti ai Fattori 1, 2, 3). Come risulta da un esame della Tabella n. 3 è evidente che quando un chemioantibiotico ha un potenziale tossico-resistenziale elevato (100-1000) dovuto alla presenza di cancerogenità e/o elevato potere induttivo di chemioantibioticoresistenza, viene automaticamente escluso dalla chemioprofilassi o dal trattamento di massa.

Per quanto riguarda i tempi di sospensione, questi variano in rapporto all'uso del farmaco ed alle sue caratteristiche tossico-resistenziali e dovranno essere stabiliti in modo da raggiungere contemporaneamente: a) *assenza* di attività chemioantibiotica al limite della sensibilità dei tests microbiologici (« zero microbiologico »); b) *livelli* di

TABELLA 2: Punteggi da assegnare ai singoli fattori di rischio nell'uso dei chemioantibiotici in medicina veterinaria.

FATTORE 1 = USO: FREQUENZA E FINALITÀ DEL TRATTAMENTO

— Trattamento individuale a scopo terapeutico o preventivo (Terapia con specialità medicinale e/o galenico)	punti 1
— Trattamento di massa a scopo terapeutico o preventivo di una specifica malattia (Terapia con Medicato)	punti 10
— Trattamento di massa sistematico (Uso di Chemioprofilattico)	punti 100

FATTORE 2 = LIVELLO DEI RESIDUI (FARMACO E METABOLITI)

— Punteggio uguale ai p.p.b. (millesimi di p.p.m.) nell'organo o tessuto « bersaglio » nella specie « bersaglio », nel momento in cui è *prevedibile* la immissione sul mercato delle produzioni animali, od al termine del « tempo di sospensione ».

Per esempio	1 p.p.b.	(0,001 p.p.m.)	punti 1
	10 »	(0,01 »)	punti 10
	100 »	(0,1 »)	punti 100

FATTORE 3 = POTENZIALE TOSSICO-RESISTENZIALE

— Punteggio ottenuto dalle seguenti *tre* fonti di informazioni:

a) Tossicità (e attività allergizante)

b) Cancerogenesi (e batteria di test mutagenetici)

c) Elevata capacità induttiva di antibioticoresistenza (soprattutto di tipo trasferibile e nei riguardi di farmaci di specifico interesse umano)

Sulla base delle risposte relative ai punti a), b), c) viene stabilito un punteggio come segue (valori POSITIVI indicati da lettere MAIUSCOLE, valori negativi da lettere *minuscole*):

= a-B-c; A-B-c; A-B-C	punti 1000
= a-b-c	punti 1
= A-b-c	punti 10
= A-b-C; a-b-C	punti 100

chemioantibiotico o suoi metaboliti (determinati con metodo della radioattività, ecc.) pari od inferiori a quelli indicati nella Tabella n. 3.

TABELLA 3: Concentrazione massima ammissibile di residui di chemioantibiotici nell'organo o tessuto di maggiore accumulazione in rapporto alle condizioni di impiego (FATTORE 1) e della potenzialità tossico-resistenziale (FATTORE 3) con una « soglia di rischio » non superiore a 1000.

Potenziale tossico-resistenziale (FATTORE 3)	Tipo di trattamento (FATTORE 1)		Livello massimo nel tessuto od organo « bersaglio » (FATTORE 2)
Punti 1	Tratt. indiv.	p. 1	0,1 ppm (punti 100)
	Tratt. massa	p. 10	0,1 ppm (punti 100)
	Chemioprofil.	p. 100	0,01 ppm (punti 10)
Punti 10	Tratt. indiv.	p. 1	0,1 ppm (punti 100)
	Tratt. massa	p. 10	0,01 ppm (punti 10)
	Chemioprofil.	p. 100	0,001 ppm (punti 1)
Punti 100	Tratt. indiv.	p. 1	0,01 ppm (punti 10)
	Tratt. massa	p. 10	0,001 ppm (punti 1)
	Chemioprofil.	p. 100	*Escluso l'impiego*
Punti 1000	Tratt. indiv.	p. 1	0,001 ppm (punti 1)
	Tratt. massa	p. 10	*Escluso l'impiego*
	Chemioprofil.	p. 100	*Escluso l'impiego*

* * *

CHEMIOANTIBIOTICOTERAPIA DI MASSA E TEMPI DI SOSPENSIONE

Una corretta applicazione dei tempi di sospensione nella chemioantibioticoterapia di massa (ed in modo analogo nella terapia individuale) trova ostacoli e difficoltà, che indicheremo unitamente alla proposta di possibili soluzioni migliorative.

Innanzitutto è da rilevare la esistenza di una elevata diversifica-

zione dei tempi di sospensione, che per i medicamenti da usare nella terapia di massa vanno da 0 a 21 giorni (e dai 0 ai 45 giorni per le specialità medicinali). Per ovviare le conseguenze di inevitabili « sovrapposizioni » e « dimenticanze » è necessario ridurre tale diversificazione costituendo delle « fasce » che per i « medicati » potrebbero essere le seguenti: giorni 0-7-14-21 (e per le specialità medicinali da usare sul singolo animale: giorni 0-3-7-14-21-35-42). Sarebbe inoltre, utile che ogni « fascia » fosse identificata da un colore apposto sulle confezioni di commercializzazione del farmaco, ad esempio:

Tempo di sospensione giorni	0	=	fascia di colore VERDE
	3-7	=	fascia di colore GIALLO
	14-21	=	fascia di colore ARANCIONE
	35-42	=	fascia di colore ROSSO

Anche al fine di ovviare la impossibilità di uno « scadenziario » a memoria dei tempi di sospensione in corso in un allevamento, è inoltre possibile immaginare di far associare alle confezioni di medicati delle etichette autoadesive del colore della fascia, da applicare alla parete del box o del capannone trattato per la annotazione del giorno in cui termina il tempo di sospensione. Più difficile è invece ipotizzare un sistema analogo con marche per i trattamenti individuali.

Per quanto riguarda i trattamenti di massa che comportano tempi di sospensione, è necessario un loro uso coerente alle tecnologie di allevamento, addivenendo alla istituzione di « alimenti di finissaggio ». Si tratta di stabilire, al termine dei cicli di allevamento, un periodo nel quale è vietato qualsiasi medicamento, chemioprofilattico o medicato di massa e che comporti un tempo di sospensione. D'altra parte nel periodo terminale del ciclo di allevamento le malattie sono rare. Non ci si deve tuttavia nascondere la difficoltà, nei grandi allevamenti, di avere un particolare settore di finissaggio o di avere nell'ultimo periodo di allevamento la possibilità di differenziare l'alimentazione per box o reparto. Come orientamento si potrebbero dare i seguenti periodi di « finissaggio » per le diverse specie animali e tecnologie di allevamento:
maiali da carne = un mese (o più per il maiale pesante)
polli e volatili da carne = una settimana
vitelli da carne = un mese (o più per i vitelloni)

Di non immediata soluzione pare la « marcatura » degli alimenti contenenti farmaci che comportino tempi di sospensione o all'opposto

degli alimenti di finissaggio privi di farmaci, e ciò per facilitare uno « *screening* » su cui poi eseguire i controlli. È infatti da notare che l'eventuale marcatore dovrebbe essere innocuo per l'animale (e come tale preferibilmente non enteroassorbibile e non metabolizzabile), ma metabolizzabile nell'ambiente e non accumulabile nei terreni. Per questo ultimo motivo sono ad esempio da escludere tutti gli eventuali marcatori minerali, come il biossido di titanio, e non è facile trovare un « marcatore ideale » che risponda a tutti i requisiti.

Indagini più approfondite nella individuazione di uno o più « marcatori » sono comunque estremamente necessarie, perché tramite la ricerca di tali marcatori nei mangimi medicati, specialità medicinali, chemioprofilattici, si possono facilitare le necessarie indagini di controllo, contribuendo anche a risolvere il problema dell'uso clandestino delle cosidette « materie prime ».

Un ultimo e non trascurabile aspetto della applicazione dei tempi di sospensione nell'allevamento intensivo (ed in modo analogo nei trattamenti individuali con specialità medicinali) è quello della precisa responsabilità nel caso di una loro mancata osservanza. È chiaro che in prima istanza è il proprietario che è responsabile, ma non è difficile riconoscere un « concorso di colpa » da parte del veterinario. La già indicata istituzione di un sia pur grossolano « scadenziario » dei termini di decorrenza e di esaurimento dei tempi di sospensione nei singoli gruppi di animali tramite etichette colorate, e soprattutto la obbligatorietà di un certificato di accompagnamento stilato dal veterinario di allevamento per ogni gruppo o partita di animali inviati al macello, potrebbe contribuire ad affrontare il problema in modo concreto.

* * *

CHEMIOANTIBIOTICOTERAPIA INDIVIDUALE E TEMPI DI SOSPENSIONE

L'esistenza di tempi di sospensione nella utilizzazione a scopo alimentare delle carni e del latte di singoli animali (e ci riferiamo ovviamente ai mammiferi) dopo trattamenti con chemioantibiotici, pone alcuni problemi clinico-terapeutici che condizionano un nuovo modo di fare la clinica veterinaria. Schematicamente sono individuabili alcune

situazioni, relative soprattutto alla prognosi della forma morbosa da trattare.

a) In caso di forme morbose con prognosi *fausta quoad vitam* (ad esempio talune lesioni di tipo chirurgico), qualsiasi trattamento per via generale (parenterale, orale, ecc.) o locale non pone alcun problema per l'utilizzazione delle carni, in quanto una eventuale macellazione (collegata ad esempio alla inefficacia del trattamento terapeutico) potrà essere rimandata oltre limiti previsti dai « tempi di sospensione ».

Il problema diviene più delicato se in animali sottoposti a trattamento generale si considera la utilizzazione del latte: non solo per quanto concerne la perdita del prodotto (che talvolta potrebbe essere destinato alla alimentazione dei vitelli) quanto — e ci riferiamo agli allevamenti intensivi di bovine da latte con elevata meccanizzazione — alla opportunità di modificare al minimo le pratiche di mungitura. In questi allevamenti è comunque indispensabile costituire un gruppo di bovine trattate con chemioantibiotici (per qualunque via, anche *endouterina*); questo gruppo di bovine verrà munto per ultimo, il latte non destinato alla alimentazione e dopo la mungitura l'impianto verrà accuratamente lavato.

In caso di malattie « a localizzazione » (artriti, artrosinoviti, ecc.) diviene particolarmente indicata la terapia topica (iniezioni intrarticolari, ecc.), con posologie limitate e soprattutto con preparazioni farmaceutiche limitatamente assorbibili (ad esempio contenenti silicone -c.d. sinovia artificiale). Nel caso invece di mastiti non vi è alcuna difficoltà nell'eliminazione del latte, che comunque non può essere usato per l'alimentazione dell'uomo, fino a guarigione dell'organo, il che vuol dire completa ripresa e normalizzazione della secrezione lattea e quindi assenza di infezione e/o di malattia.

b) Diversa è la situazione del trattamento di forme morbose con prognosi *riservata quoad vitam,* e con probabilità di dover macellare l'animale, se non entro breve tempo (macellazione di urgenza), almeno entro alcuni giorni se la terapia dovesse fornire risultati insoddisfacenti.

b-1) Innanzitutto bisogna notare che quando la prognosi è *riservata quoad vitam* vi sono casi nei quali una terapia si impone prescindendo dal problema dei residui. Questo avviene per malattie in cui le carni dell'animale sono comunque *non* destinabili alla alimentazione

umana (prognosi *infausta quoad carnem*). In questo gruppo vi sono le malattie di qualsiasi tipo in vitelli con carni « immature »; le malattie infettive per le quali non solo è vietata la utilizzazione delle carni, ma la stessa macellazione (ad esempio carbonchio ematico); le malattie infettive nelle quali si impone un esame batteriologico delle carni la cui positività per agenti infettanti causa di zoonosi o tossinfezioni alimentari è molto probabile se non certa, per cui le carni andrebbero quasi certamente distrutte per tali infezioni: ad esempio enteriti, polisierositi, ecc. di natura salmonellare, ecc. In questi, come in altri casi analoghi, è sempre vantaggioso un trattamento terapeutico, perché non trattando l'animale non vi è comunque la possibilità di utilizzare le carni.

b-2) Se invece si tratta di malattie che di per sé permettono la utilizzazione delle carni (prognosi *fausta quoad carnem*), e nelle quali il trattamento risulti poco efficace e si imponga una macellazione (macellazione di urgenza o di necessità), risulta ovvia la *opportunità di ridurre al minimo indispensabile i tempi di sospensione.* A questo proposito è necessario utilizzare — da un punto di vista clinico — le conoscenze o gli elementi disponibili sull'assorbimento, trasporto, eliminazione e metabolismo dei farmaci, per individuare quali sono le condizioni da sfruttare per ridurre al minimo i tempi di sospensione senza derogare dalla protezione della salute dell'uomo. Innanzitutto è da rilevare che la *somministrazione dei farmaci per via endovenosa elimina il problema dei residui a livello del punto di inoculazione:* è ciò particolarmente vantaggioso perché è proprio in tale sede che possono permanere per un certo periodo di tempo elevate quantità di farmaco. Con la somministrazione per via endovenosa si ottengono inoltre altri due vantaggi:

a) *precocità di azione e sua più breve durata;*

b) più facile e completo legame del farmaco alle proteine seriche per cui, *con un regolare dissanguamento,* come è richiesto per la utilizzazione delle carni in questi, come in altri casi, *si elimina la massima parte del farmaco,* salvo le quote fissate ai tessuti eventualmente infiammati, o presenti negli organi metabolizzatori (fegato) o emuntori (rene).

Se infine consideriamo i trattamenti per malattie di tipo acutissimo o acuto, con prognosi riservata *quoad vitam,* risulta sempre ov-

via la opportunità di *usare farmaci a breve tempo di azione* (*non ritardo!!*).

I problemi di responsabilità circa una corretta applicazione dei tempi di sospensione nei trattamenti di singoli animali ammalati, pur ricalcando quanto già indicato per i trattamenti di massa, pongono in primo piano il ruolo del veterinario, soprattutto se nella terapia egli ricorre a più o meno complesse associazioni estemporanee (i cosidetti *cocktail* di farmaci). È d'altra parte sempre al veterinario che compete l'onere e l'onore di utilizzare correttamente i risultati delle ricerche di laboratorio e soprattutto di quelle volte a mettere in evidenza la chemioantibioticosensibilità (c.d. antibiogramma). Anche quanto dettato da una recente circolare ministeriale, che vieta al laboratorista di comunicare dati relativi a chemioantibioticosensibilità di farmaci non approvati per essere usati negli animali, necessita di un confronto con la situazione clinica, perché uno stesso farmaco è permesso e vietato contemporaneamente a seconda della specie animale, via di somministrazione, modalità di uso, ecc. (vedi quanto è già ora in uso per il cloramfenicolo) e solo il veterinario curante può e deve caricarsi di questa responsabilità.

È inoltre ovvio che se si vuole seguire la linea di intervento sopra indicata al punto b-2, e cioè quella di ricorrere a trattamenti con chemioantibiotici a breve azione e per via endovenosa nella eventualità di una macellazione di urgenza o necessità allo scadere dei tempi di sospensione, il veterinario si assume precise responsabilità e diviene assolutamente necessaria la ricerca dei residui del farmaco nelle carni prima di esitarle al consumo. Si riconferma quindi la necessità di un più stretto collegamento tra attività clinica ed igienico-ispettiva, e nel caso ora citato è già indispensabile che il veterinario curante invii al macello l'animale per macellazione d'urgenza con una lettera di accompagnamento in cui venga indicata la necessaria ricerca delle c.d. « sostanze inibenti ». D'altra parte deve divenire una norma « statutaria » la ricerca delle sostanze inibenti in tutti gli animali sicuramente o solo presuntivamente macellati d'urgenza, o comunque in situazione non perfettamente limpida.

Che un tale tipo di collegamento sia particolarmente importante lo si può desumere anche dai risultati ottenuti con la sistematica ricerca delle sostanze inibenti nel muscolo e negli organi (in particolare rene) degli animali macellati di urgenza e/o necessità, o degli ani-

mali nei quali per qualsiasi motivo sia opportuno o necessario un esame batteriologico delle carni. In una recente indagine (BALLARINI G., GATTI R., GUIZZARDI F., *Osservazioni sulla presenza di sostanze inibenti nel muscolo e nel rene di animali macellati nella provincia di Mantova negli anni 1974-1979* - In corso di pubblicazione) risulta ad esempio che negli ultimi anni vi è una tendenza all'aumento soprattutto nei vitelli e suini, ma molto meno nei bovini adulti e negli equini (Tabella n. 4). Di pari passo si osserva una generale diminuzione nelle percentuali di sostanze inibenti nel muscolo quando il test è positivo nel rene (Tabella n. 5). A nostro parere questi risultati testimoniano di una maggiore attenzione dei veterinarii (che come è noto seguono da vicino la clinica dei bovini adulti e dei cavalli, mentre quella dei vitelli e suini è più nelle mani degli allevatori) al problema della macellazione degli animali trattati con chemioantibiotici.

Conclusioni

Nella premessa sono stati indicati i limiti di questa esposizione, che non ha la pretesa di fornire *la soluzione* al complesso problema dell'uso dei farmaci negli animali produttori di derrate alimentari destinate all'uomo. In questo orientamento, e soprattutto come ipotesi da meditare e soprattutto da discutere, sono da intendere le proposte che sono state indicate.

TABELLA 4: Positività del test di ricerca delle sostanze inibenti in animali macellati di urgenza o necessità e per i quali è stato richiesto l'esame batteriologico della carne, in provincia di Mantova (N° Numero animali esaminati; % percentuale di positività del test) (Ballarini, Gatti, Guizzardi, in corso di pubblicazione).

Specie animale	1974		1975		1976		1977		1978		1979	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Bovini adulti	1774	1,92	1782	7,13	1915	5,12	2068	7,02	2082	12,64	2167	12,60
vitelli	652	4,15	679	12,23	854	9,72	645	14,27	908	35,47	890	31,35
Equini	58	3,45	72	2,78	54	5,56	48	4,17	36	8,34	52	5,76
Maiali	519	1,35	647	3,87	638	2,51	513	6,63	535	11,59	630	11,91
Totale	3007	2,33	3180	7,46	3463	5,78	3275	8,34	3562	18,28	3739	16,80

TABELLA 5: Positività dei tests di ricerca delle sostanze inibenti nel muscolo di animali macellati di urgenza o necessità o per i quali è stato richiesto l'esame batteriologico, in provincia di Mantova (% T = valore percentuale rispetto al totale degli animali; % R = valore percentuale rispetto gli animali con test positivo nel rene) (Ballarini, Gatti, Guizzardi, in corso di pubblicazione).

Specie animali	1974		1975		1976		1977		1978		1979	
	% T	% R	% T	% R	% T	% R	% T	% R	% T	% R	% T	% R
Bovini adulti	0,50	26,47	2,63	37,00	1,61	31,63	2,51	35,86	1,10	8,74	1,98	15,75
vitelli	3,37	81,48	6,77	55,42	3,86	39,75	6,35	44,56	4,95	13,97	5,95	19,00
Equini	—	0	—	0	—	0	2,08	50,00	2,77	33,33	—	0
Maiali	1,15	85,71	1,70	44,00	0,62	25,00	4,87	73,52	2,42	20,96	2,53	21,33
Totale	1,23	52,86	3,27	43,88	1,96	34,00	3,63	43,59	2,30	12,59	2,99	17,78

DISCUSSIONE

Gli interventi in discussione sono stati ricavati, in parte, dalla registrazione su nastro e, in parte, dal testo presentato dai singoli intervenuti.

M. Venturoli

A mio avviso, il sequestro parziale dei visceri per l'eventuale presenza di sostanze inibenti ripropone il problema, già noto negli anni 60, riguardante gli ascessi epatici, le nefriti interstiziali, le calcolosi renali nei vitelloni alimentati con il metodo Preston. Si suggeriva allora di praticare una campagna di profilassi antibiotica onde impedire la comparsa di lesioni che, senza dare problemi in ordine all'accrescimento degli animali, preoccupavano in sede di macellazione in quanto l'economia dell'allevamento si reggeva spesso solo sul guadagno derivante dalla vendita del fegato e del rene. Siamo anche arrivati a momenti in cui l'ipodermosi costituiva un problema in quanto non consentiva di realizzare alcun utile dalla vendita della pelle.

A Ballarini vorrei chiedere come è possibile sanare il contrasto fra le esigenze economiche della zootecnia e la tutela della salute umana in quanto, se quest'ultimo obbiettivo si realizza attraverso il sequestro parziale, la situazione zootecnica può essere messa in crisi.

G. Ballarini

Probabilmente mi sono espresso male. La mia proposta-ipotesi è la seguente: quando si eseguono dei tests sulla base di ben precise

indicazioni e questi risultano positivi, anziché distruggere l'intera carcassa come avviene attualmente, si dovrebbe procedere alla distruzione dei soli organi incriminati sulla base dei referti anatomico, batteriologico e di positività per sostanze inibenti.

M. VENTUROLI

È auspicabile un programma di intervento capace di evitare la presenza di residui sia nelle carni che nel rene?

La seconda domanda è rivolta al Prof. Schito. Nella sua relazione sono stati trattati soprattutto problemi di patologia umana con numerosi esempi riguardanti l'esame batteriologico delle urine e del liquido cefalo-rachidiano. Si tratta di liquidi che si prestano all'esame colturale che, a sua volta, può fornire precise indicazioni. In patologia veterinaria i dati illustrati dal Prof. Schito trovano riscontro soltanto nel settore dei piccoli animali. Per esempio, la patologia tonsillare da streptococchi è quasi esclusiva del cane così come quella delle basse vie urinarie, tipica del cane, è quasi esclusiva del cavallo. Altri problemi esistono ancora nella patologia dei grossi animali ma vorrei ora conoscere se le tecniche di laboratorio possono essere eventualmente modificate in funzione delle particolari esigenze del clinico veterinario.

G.C. SCHITO

Ho già anticipato che avrei portato una esperienza sul paziente uomo. Non so cosa farei nel cavallo o in animali di altra specie ma è il materiale che si deve prestare ad analisi microbiologiche diverse. Ritengo quindi che un pus sia sempre un pus e che la gascromatografia, fatta per conoscere se esso è « bonum et laudabile » oppure se è provocato dalla contemporanea presenza di anaerobi, sia utile in animali di ogni specie. Ritengo poi importante la conoscenza della normale flora microbica dei singoli distretti nei diversi animali. Si tratta in questo caso di una microbiologia che non conosco, tuttavia, una volta accertato l'agente eziologico resta la validità generale della determinazione di sensibilità e resistenza.

M. VENTUROLI

Sono soddisfatto della risposta specie in riferimento alla patologia autoctona ed al problema delle infezioni nell'ambiente dove il veterinario opera. Anticipo in parte quanto dovrò dire nel pomeriggio affermando che la risposta dell'antibiogramma è utilissima per il medico veterinario. Ciò non soltanto per le indicazioni riguardanti il singolo caso da risolvere nell'immediato ma anche per le conoscenze riguardanti la sensibilità dei germi nella sede e nel luogo di lavoro nel quale si opera.

Al Prof. Carli vorrei chiedere informazioni riguardo alle differenze della farmaco-cinetica nelle diverse specie animali. Ad esempio, la procain-benzil-penicillina viene usata soprattutto nel cavallo, tra l'altro, per il basso costo e la semplicità della somministrazione. È noto, e ne chiedo conferma, che la benzil-penicillina presenta nel cavallo una farmaco-cinetica diversa rispetto ai ruminanti ed al suino. In particolare mi sembra di ricordare che, nel cavallo, i livelli ematici non aumentano in proporzione diretta con l'aumentare della dose contrariamente a quanto avviene nei ruminanti e nel suino. Tuttavia, nel cavallo, aumentando le dosi si aumenta il tempo di terapia.

È possibile questo?

S. CARLI

In linea di massima è vero ma il discorso è molto più ampio e non riguarda soltanto la benzil-penicillina. Non ritengo del tutto corretto affermare che, aumentando le dosi, i livelli ematici aumentino proporzionalmente e ciò indipendentemente dalla specie animale. I livelli ematici infatti aumentano ma difficilmente in modo proporzionale. È chiaro quindi che i tempi di eliminazione variano di conseguenza ma sempre in relazione a ciò che è stato detto riguardo al veicolo (oleoso o meno) o al sale impiegato. In ordine alla specifica domanda la risposta è affermativa anche se l'argomento deve essere esaminato in termini più generali.

M. VENTUROLI

Il problema è appunto quello della carenza di informazioni sulla farmaco-cinetica nei grossi animali che ha dei riflessi nella attuazione pratica delle terapie. I suggerimenti riguardo alla dose vengono tratti dalla sperimentazione sull'uomo e sui piccoli animali per cui, salvo poche eccezioni, non sono esattamente noti dosaggi e tempi di intervento negli animali di grossa taglia.

S. CARLI

A questo riguardo posso ricordare le note pubblicazioni fatte da Ziv e presentate dalla Beechman al Congresso di Utrecht in settembre. Da esse traspare che lo stesso antibiotico, amoxicillina o ampicillina in sale sodico, presenta variazioni notevolissime nella stessa specie animale a seconda della sede dell'inoculazione.

L. NARDELLI

Ballarini chiede di aggiungere una osservazione ad una domanda.

G. BALLARINI

Sono perfettamente d'accordo con Venturoli su una problematica basata su questo fatto: se il clinico facesse solamente ciò di cui è sicuro farebbe ben poco. Purtroppo il clinico-pratico è costretto ad operare al di là delle sue comprensioni ed a questo livello emergono delle conoscenze che possono diventare utili successivamente. Ad esempio molte delle nostre terapie, ed i risultati relativi, non corrispondono a quanto ci ha presentato Carli. Pensiamo alla terapia della tubercolosi nell'uomo ed alla terapia antibiotica intermittente con alte dosi battericide ad intervalli variabili. Tale terapia fornisce dei risultati soddisfacenti, ma allora o non sono validi i dati clinici il che è difficile da accettare oppure non sono valide le nostre ipotesi. Da qui la necessità di approfondire questi problemi.

M. VENTUROLI

Ancora una brevissima osservazione. Il dott. Girardi ha parlato di diarree croniche dovute, nel cavallo, a terapia antibiotica. Non vorrei che ciò desse luogo a dei timori che molto spesso risultano privi di fondamento. È in primo luogo difficile correlare la diarrea con la terapia antibiotica. Secondariamente è necessario verificare l'incidenza di questi aspetti della patologia. Esistono delle statistiche australiane ed americane, nonché due lavori comparsi nel 1975 e nel 1976, secondo i quali l'incidenza presunta di tali forme raggiunge il 3% circa e che esse riconoscono l'intervento, se ben ricordo, di 10 fattori eziologici diversi.

L. SIDOLI

Al Prof. Schito chiedo se non ritenga pericoloso abbandonare metodiche impegnative ma standardizzate, come è il caso del Kirby-Bauer, per adottarne altre più pratiche ma dominate dall'interpretazione soggettiva del laboratorista. In effetti, prima della scelta definitiva del p-B, tests di sensibilità eseguiti da diversi laboratori sullo stesso ceppo batterico fornivano risultati contraddittori. Ritengo perciò poco opportuno derogare da un metodo che offre garanzie che in altri mancano.

G.C. SCHITO

Il senso della domanda è chiaro ed io non mi sono espresso contro la standardizzazione ma contro il rischio di pensare che essa possa per sé risolvere tutti i problemi. La standardizzazione infatti si riferisce alle prove *in vitro* ed i dati del laboratorio, nonostante numerose opinioni contrarie al riguardo, non sono sempre trasferibili sul malato. Il metodo Kirby è ottimo ma non imperativamente corretto. Esistono tuttavia metodi alternativi e provvisti della stessa validità, per esempio quello di Stokes. A mio avviso i nuovi parametri deriveranno dalla tendenza deduttiva che è imperante nella microbiologia clinica ossia l'automazione. Personalmente e fino a due anni fa ero

abbastanza contrario all'automazione e l'ho accettata per l'incremento del numero degli esami, per l'esattezza e la costanza dei reperti e per la necessità di strumenti che risolvono i problemi di carattere operativo. Tali strumenti oggi esistono. Ad esempio, tutti i sistemi di turbidimetria garantiscono la standardizzazione delle operazioni. Comunque, anche i sistemi automatizzati non debbono creare il mito che la standardizzazione *in vitro* sia ugualmente valida nell'applicazione clinica. Ciò si verifica soltanto se la terapia viene poi monitorata nei casi più importanti e questo è il senso del mio messaggio.

Il discorso dell'automazione resta tuttavia importante ma sarebbe essenziale individuare, *in vitro,* modelli più simili a quanto accade *in vivo.* Recentemente sono apparse delle notizie molto interessanti. Ad esempio, l'insuccesso della Rifampicina nelle endocarditi da enterococchi. In terapia umana, come ultimo tentativo, si usa Rifampicina associata a carbenicillina o ad aminoglucoside ma ciò non funziona in presenza di vegetazioni valvolari. Esistono modelli *in vitro* che predicono con precisione questo insuccesso. Infatti in presenza di coaguli di fibrina la Rifampicina non è attiva neanche *in vitro.* A mio avviso, la soluzione ideale, al di là di automazioni e standardizzazioni, sarebbe quella di dare maggiore significato applicativo ai reperti di laboratorio.

S. Pascucci

Al Prof. Schito vorrei domandare quale significato deve essere attribuito alle colonie batteriche che sviluppano entro l'alone di inibizione. Tale reperto l'ho sempre interpretato in senso sfavorevole ma, recentemente, ho letto un lavoro nel quale non è condiviso questo giudizio.

In veterinaria l'esigenza di fornire il risultato dell'antibiogramma non è sempre così pressante come in medicina umana e perciò ritengo che esso non debba essere eseguito direttamente a partire dal materiale patologico. Ciò andrebbe a scapito della precisione e non compenserebbe il vantaggio di fornire la risposta prima delle previste 36-48 ore.

Ho avuto piacere di ascoltare l'opinione del Prof. Ballarini riguardo alla presenza di residui nei visceri e nei muscoli. In provincia

di Forlì noi seguiamo da anni la linea di condotta da lui indicata e perciò, in presenza di sostanze inibenti nei visceri, essi vengono distrutti con recupero delle carni. Mi rimane tuttavia un dubbio riguardo alla sensibilità del metodo impiegato. Ad esempio, la ricerca di sostanze inibenti usando il *Subtilis mesentericus* non sempre fornisce risultati attendibili specie nel caso del Cloramfenicolo, per cui la diminuzione percentuale dei reperti positivi nel muscolo e nel rene dovrebbe essere verificata.

G.C. Schito

La presenza di colonie entro l'alone di inibizione non è sempre indicativa di mutanti resistenti all'antibiotico. Non così per la sciamatura, fenomeno da considerare di crescita normale.

È chiaro che negli stafilococchi esiste una percentuale molto elevata di stipiti resistenti ma ciò non ha significato in quanto la terapia con penicillina anche nel caso di beta-emolitici e catalasi produttori ha in genere successo. In questi casi è però importante valutare l'entità della popolazione resistente. Se questa è limitata all'1% il reperto non dovrebbe avere implicazioni negative in terapia. L'interpretazione della sciamatura è diversa in quanto la lettura dell'antibiogramma va eseguita sulla base della presenza di colonie che costituiscono segno di resistenza ma sulla cui interpretazione ho i miei dubbi.

Per quanto riguarda l'esecuzione diretta dell'antibiogramma su materiale patologico io non lo consiglio in generale specie come metodo di routine. In caso di necessità esso va eseguito con metodiche speciali come la microscopia, la valutazione col Gram, la gascromatografia.

Peraltro, si tratta di un metodo che in situazione di emergenza può salvare una vita e ciò ha forse contribuito allo sviluppo di quelle apparecchiature che eseguono un antibiogramma in quattro ore.

G. Ballarini

I dati che ho presentato sono quelli della Sezione di Mantova dell'Istituto Zooprofilattico, e ringrazio il dott. Loda e collaboratori per

la raccolta. Essi rispecchiano una situazione locale, ma sarebbe utile di effettuare analisi dello stesso tipo anche presso altre Sezioni, allo scopo di seguire nel tempo e nello spazio l'evoluzione della situazione. Preciso: sono percentualmente aumentati gli animali positivi per sostanze inibenti in almeno un organo, ma è in pari tempo diminuita la percentuale delle positività nel muscolo. Ciò sta ad indicare che gli operatori sono più accorti. È questa una nota positiva ma, per essere sfruttata, è necessario che gli Istituti Zooprofilattici esaminino i dati per catalogarli, valutarli e confrontarli, allo scopo di studiare una linea operativa provincia per provincia a seconda delle produzioni prevalenti in ciascuna di esse.

S. Dominici

Premesso che spesso, purtroppo, non esiste collaborazione a priori fra microbiologo e clinico ed in assenza di notizie anamnestiche precise, come ci si deve regolare nei seguenti casi:

1) - Infezione mista: occorre stabilire a priori quale sia il germe responsabile di una certa infezione, oppure eseguire l'antibiogramma separatamente per tutti i germi isolati.
2) - Germi saprofiti o banali: spetta al microbiologo abbandonare l'indagine o procedere considerando tali germi potenzialmente patogeni in particolari situazioni a noi sconosciute.
3) - Urine: con cariche microbiche inferiori a 100.000/ml come ci si deve comportare.

In sintesi, il microbiologo (veterinario, medico, biologo) deve sostituirsi al clinico nella valutazione dei risultati oppure deve trasmettere tutti i dati in suo possesso quando non esiste la possibilità di specifiche valutazioni per carenza di notizie o per scarsa seppure involontaria collaborazione.

G.C. Schito

La mia opinione, molto personale ma che va trovando sempre più credito, è che noi forniamo dei servizi, serviamo, ma non vogliamo essere sfruttati. Un servizio è tale in forza della collaborazione che

offre. In medicina umana il microbiologo ha un ruolo importante perché è il clinico, talora il chirurgo, che chiede di monitorare casi importanti che noi seguiamo anche attraverso dei suggerimenti in ordine alla terapia.

Per tornare alle domande ritengo necessaria qualche precisazione. Nel caso di infezioni miste è necessario precisare anche la sede. Nelle urine esse sono rarissime.

S. Dominici

Della gola.

G.C. Schito

In questa sede possono essere presenti virus ed in questo caso non c'è molto da fare, oppure sono presenti lo streptococco o stafilococchi. In tali casi si tratta sempre di flora prevalente. In caso di tonsillite da stafilococco si osserva, in primo luogo, una manifestazione di ordine clinico e, secondariamente, uno spostamento completo della flora del cavo orale con scomparsa degli stessi alfa-emolitici. In questi casi l'orientamento verso l'antibiogramma è semplice e non richiede un'analisi dettagliata della flora presente nel retrobocca. In altri casi la risposta del laboratorio riferisce l'esito delle indagini eseguite: assenza di streptococco beta-emolitico di gruppo A, flora microbica normale.

Il compito del microbiologo è appunto questo anche perché, con ogni rispetto, non tutti i clinici conoscono la flora microbica normale di tutti i distretti dell'organismo. In campo veterinario il problema è molto più complesso essendo in gioco numerose specie animali.

L'infezione mista, seppure rara, è quella da anaerobi: ci sono quindi dei problemi di valutazione. È compito del microbiologo fornire o meno, succintamente, dati riguardanti la flora batterica normale. Sono convinto che nessuno di noi fornirebbe il reperto batteriologico delle feci se non altro perché rischierebbe di omettere il 99% dei costituenti la flora normale che, per la grande maggioranza (97%), è anaerobia. È chiaro quindi che, almeno nell'uomo, si farà la

ricerca di salmonelle, shigelle, coli enterotossici. Questo è un discorso di selezione che spetta al microbiologo ed il clinico manterrà gli opportuni contatti se ne ha interesse.

S. Dominici

Il Prof. Ballarini ha parlato di fasce e di tempi di sospensione e di altre cose molto utili.

Vorrei sapere se egli è d'accordo sul fatto che, a monte, sarebbe da evitare la contaminazione dell'ambiente con gli antibiotici esercitando un maggiore controllo da parte dei veterinari. In effetti molta responsabilità deve essere attribuita a quanti fanno pervenire sostanze antibiotiche direttamente agli allevatori.

G. Ballarini

I veterinari possono rispondere fino ad un massimo del 10% del problema, in quanto (si dice) il 90% dei farmaci in distribuzione non è da essi controllato.

A. Bignardi

Ai dott.ri Girardi o Carli chiedo quale possa essere la tossicità locale da somministrazione intracanalicolare mammaria di cloramfenicolo, l'importanza del veicolo e il dosaggio.

C. Girardi

Tutti i farmaci, se introdotti in mammella, sono in grado di determinare fenomeni irritativi di intensità diversa in rapporto alle caratteristiche fisico-chimiche dei farmaci stessi ed alla loro concentrazione. Anche il CAF non sfugge a questa regola. È anche per questo motivo, oltre che per garantire una migliore diffusione nell'ambito della mammella, che attualmente viene rivalutata la terapia pa-

renterale delle mastiti, come abbiamo recentemente ascoltato nella relazione svolta dal Prof. Ziv a Verona, non soltanto per le forme parenchimatose, ma anche per quelle catarrali.

A. Bignardi

Come pratico posso asserire che, in presenza di mastiti catarrali nelle quali l'antibiogramma suggerisce l'impiego di cloramfenicolo, io intervengo soltanto per via intracanalicolare. Se il veicolo è costituito da glicole, sono costretto ad impiegare 50-100 ml di soluzione fisiologica sterile o acqua distillata senza superare la dose di 1-1,5 g. Se ho a disposizione, ad esempio, emosuccinato posso usarne anche una dose maggiore. Come pratico sono rimasto sorpreso dei dosaggi suggeriti dal professore israelita.

C. Girardi

Utilizzando del CAF emosuccinato sodico veicolato in soluzione acquosa, la tollerabilità è migliore sia per via intramuscolare che per via endomammaria.

G. Ballarini

Una brevissima osservazione. In occasione del Convegno di Milano sulle mastiti si è detto che la penicillina determina positività al CMT per 3 giorni, penicillina con antistaminico per 7 giorno. L'antistaminico è quindi un « irritante »: quanti di noi hanno usato l'antistaminico per via intramammaria allo scopo di ridurre l'infiammazione?

M. Venturoli

Di questo argomento mi sono interessato dal punto di vista medico-legale a proposito di un grave episodio di mastopatie conseguenti a trattamento endomammario in asciutta. Questo era stato effettuato a

scopo profilattico quindi in animali sani nei quali si è successivamente manifestata una mastopatia come conseguenza dell'introduzione della pomata in mammella. Si trattava di mastopatie produttive interessanti la cisterna e il dotto, gravi, e presenti nei quattro quartieri mammari. L'intervento terapeutico era effettuato con pomate a base di glicol etilenico il cui pH variava da 1,8 a 2,3 il che giustificava l'insorgenza di una mastopatia, istologicamente definita di tipo irritativo aspecifico. D'altro lato, le indagini batteriologiche hanno escluso la presenza di agenti di natura infettiva. Le mastopatie in questione erano quindi dovute al pH della pomata ed hanno investito parecchie decine di bovine ad elevata produttività.

A. Bignardi

Quindi bastava mungere gli animali trattati per tre volte ed essi sarebbero guariti.

S. Carli

Vorrei porre a Girardi un quesito sulla tossicità del CAF. Esiste una correlazione tra la dose e la durata della terapia? Vorrei sapere se esiste un rapporto di tipo tossicologico tra una dose elevata in caso di terapia breve e una dose bassa in caso di terapia prolungata. Vorrei inoltre sapere se esistono dei dati riguardo ad una significativa correlazione fra l'età dell'individuo e la comparsa di effetti tossici.

C. Girardi

Possono essere sufficienti 5-6 giorni di terapia per determinare la comparsa di depressione midollare. Perché compaiano alterazioni a livello ematico sono invece richieste almeno due settimane di terapia. Per quanto riguarda i dosaggi richiesti dispongo solo di dati riferiti ai piccoli animali. Sono comunque dosi piuttosto elevate (200 mg/kg/die nel cane, 50 mg/kg/die nel gatto), somministrati per via orale.

Riguardo all'influenza dell'età, la depressione della funzione emo-

poietica risulta più temibile nei soggetti giovani e nei neonati. Nei bambini sono state descritte forme di depressione latente sviluppatesi con posologie piuttosto basse.

S. Carli

La seconda domanda riguarda i residui ed è rivolta ai Proff. Maletto e Ballarini. È vero che il livello zero è utopistico ma è necessario tenere conto anche dei metaboliti non attivi batteriologicamente. A questo punto mi domando se non sia il caso di standardizzare le metodiche di ricerca delle sostanze inibenti utilizzando non più dei ceppi batterici (*B. subtilis, Sarcina lutea, B. steatothermophilus*) in quanto l'accettabilità o meno di una determinazione è chiaramente correlata alla sensibilità del metodo. In pratica, si dà il caso che il livello viene raggiunto perché il metodo non è sensibile al di sotto di 0,5 μg che costituisce ancora un residuo enorme.

Riguardo ai residui si deve ancora aggiungere che pur non essendo biologicamente attivi, essi possono essere tossici. Questo toglie significato all'indicazione dei tempi di sospensione se si fa ricorso al dosaggio batteriologico. Non sarebbe allora il caso di introdurre anche da noi il metodo di dosaggio radio-immunologico (Radio Immuno Assay - RIA) marcando le sostanze da ricercare e verificando anche l'effettiva scomparsa di metaboliti?

S. Maletto

Il Radio Immuno Assay (RIA) viene già impiegato in molti casi, ma non si può affermare che questo metodo possa risolvere tutti i problemi. Le vie di metabolizzazione di una sostanza e la possibilità di trasposizione dell'atomo marcato, possono infatti far commettere errori di valutazione. Il RIA resta comunque valido come metodo avanzato, coadiuvante quelli chimici e microbiologici classici.

Per quanto concerne i residui della sostanza o dei suoi metaboliti nelle derrate alimentari, da tempo è stata proposta la prova della « tossicità di relais », e ciò particolarmente quando le quote residuali sono troppo piccole per avere risposte sicure con altri metodi d'inda-

gine, o/e quando il numero di metaboliti è troppo elevato.

Anche se le opinioni di molti esperti ed alcune legislazioni (quella italiana non accetta questa prova come discriminante) sono contrarie, ritengo che il metodo estrapolativo della « tossicità di relais » possa porci nella condizione di sicurezza provvisoria rispetto al consumatore, in attesa della messa a punto di metodi di indagine più sicuri.

In ogni caso, però, non bisogna correre il rischio di « fare utopia » ricercando il « livello zero » di residui, dato che detto livello è determinato dal grado di sensibilità dei metodi analitici impiegati. Grado di sicurezza, tossicità e livelli di residui sono realtà tra di loro strettamente correlate, per cui bisogna utilizzare una buona logica interpretativa onde evitare di divenire cacciatori di fantasmi.

La « tossicità di relais » attuata su animali di riferimento, può dunque rappresentare un mezzo coadiutore per la valutazione generale del rischio tossicologico al fine di evitare che essa venga realizzata direttamente sull'uomo.

Non va comunque dimenticato che ogni attività farmacologica sugli animali allevati a scopo zootecnico, pone le sue radici su una base economica che riversa i suoi benefici e rischi sull'umanità. Ne deriva che soltanto una giusta valutazione, che ponga anche in bilancio benefici e rischi, potrà permettere di giungere alla decisione finale.

G. Ballarini

Maletto ha affrontato il problema del singolo farmaco, ma esiste anche quello delle derrate alimentari. Su queste abbiamo idee chiare in ordine alle caratteristiche batteriologiche, generiche e specifiche, con livelli massimi ad esempio di coliformi ecc. Ora si stanno discutendo criteri di quantità di mutagenesi, cercando di stabilire un livello di mutagenesi accettabile, così come dovrà essere posto un livello di attività inibente accettabile a prescindere dalla sostanza che la determina.

S. Carli

Ci vuole un limite però.

G. Ballarini

Bisogna che le Autorità sanitarie comincino a pensarci perché loro insistono sul livello zero.

C. Rossi

Confermo le statistiche di Loda aggiungendo che, nella nostra zona, siamo sull'80% di reni di vitelli positivi, mentre per le carni è sul 20%. Nei bovini adulti la positività è in media sul 30% dei visceri. Vorrei però sottolineare che la preoccupazione derivante dalla distruzione dei visceri è limitata trattandosi per lo più di animali macellati d'urgenza, per cui il problema del consumo dei visceri non si pone nemmeno. Capita a volte che la positività riguardi il muscolo e non i visceri. Vorrei chiedere se questo fatto può in qualche modo essere spiegato.

G. Ballarini

Oppure il lardo e non la carne.

L. Sidoli

Nella nostra casistica il lardo è sempre risultato negativo.

C. Rossi

Monti e Girardi hanno parlato di attività immunosoppressiva del Cloramfenicolo. Tale attività potrebbe essere correlata con la diffusione di alcune malattie virali? Sappiamo infatti che il Cloramfenicolo viene largamente somministrato, insieme al cortisone, ai vitelli provenienti dall'estero.

F. Monti

La possibilità indicata è reale e riguarda le malattie condizionate in generale. È opportuno però precisare che essa non coinvolge soltanto il Cloramfenicolo ma si riferisce piuttosto all'impiego indiscriminato di antibiotici, al quale si aggiunge spesso quello del cortisone con i suoi noti effetti immunosoppressivi. In effetti, ai vitelli provenienti dalla Francia vengono somministrate alte dosi di antibiotici diversi, talvolta tra loro antagonisti, uniti al cortisone. In tali circostanze non si può incriminare il solo Cloramfenicolo ma gli antibiotici nel loro complesso. Ciò può provocare talora negli animali così trattati sindromi poco chiare con temperatura febbrile anche elevata, senza segni di localizzazioni. Si tratta probabilmente di forme di natura virale che non compromettono seriamente lo stato generale e che regrediscono in qualche giorno con le consuete terapie. A volte però esse evolvono in maniera grave con attacchi febbrili ripetuti imponendo la macellazione d'urgenza.

F. Monti

Se il moderatore lo consente vorrei porre una domanda al Prof. Schito. La sua relazione ha fornito dei dati molto interessanti in ordine ai criteri da seguire nella terapia d'urgenza, a ciò che non si deve fare, agli antibiotici che non si debbono usare, alla terapia mirata ecc. È stato anche fatto cenno a determinazioni più raffinate quali la concentrazione minima inibente o battericida, che consentono di dare una indicazione al clinico sui dosaggi da impiegare che dovrebbero essere quattro volte la MIC.

G.C. Schito

Se mi è consentito, questa è la classica interpretazione clinica della sensibilità. Noi riteniamo che una terapia possa essere realizzata, a dosi di antibiotico piene ma normali, quando sono raggiungibili dei tassi ematici quattro volte superiori alla MIC. Ciò evita alcuni inconvenienti derivanti da un cattivo assorbimento da parte del paziente,

dalla presenza di edemi, da ipotensione e da ogni circostanza che riduce l'assorbimento.

F. Monti

Un'ultima cosa vorrei aggiungere riguardo alla questione sollevata da Ballarini sulla distruzione dei visceri. Rossi ha già precisato che spesso si tratta di animali già morti ed io mi ricollego a quanto diceva Dominici. Quanto afferma Ballarini è valido e giusto ma, secondo me, è soltanto repressivo. Infatti, quando interveniamo al termine della carriera economica del bovino non possiamo farlo se non in senso repressivo. Viceversa noi dovremmo agire prima. È vero che il 90% dei farmaci sfugge al controllo veterinario ma se noi riprendesimo in mano la situazione a livello degli allevamenti potremmo avere una garanzia sulle condizioni degli animali al termine della loro carriera. Si verificherebbe in tal modo una situazione analoga a quella dei polli. Il bovino dovrebbe perciò arrivare alla macellazione scortato da una documentazione che pone in una condizione di tranquillità gli addetti all'ispezione delle carni.

G.C. Schito

Nella relazione di Maletto è stato sottolineato il concetto della non influenza delle dosi auxiniche sulle resistenze. Mi piacerebbe sapere se veramente esistono dati così confortanti perché studi sulla genetica dei plasmidi tendono al contrario ad affermare che le concentrazioni impiegate sugli animali sono pericolose. Si tratta di una lettura fatta anni fa e non vorrei che nel frattempo le cose fossero così favorevolmente cambiate. Esistono lavori di Anderson riguardanti *Salmonella tiphymurium* che, in Inghilterra, correlavano la diffusa resistenza agli antibiotici di questo germe con il largo impiego di auxinici. È ben noto che anche un solo farmaco mantiene la circolazione plasmidica a più resistenze il che rappresenta un notevole danno.

S. Maletto

La mia non specificità di lavoro nel settore delle « resistenze » mi permette di fornire esclusivamente dati di letteratura derivati dalla massa di valori recenti, affluiti e dibattuti in seno al Comitato scientifico CEE per l'alimentazione animale, al quale è stato affidato il compito di decidere circa l'opinione che le dosi auxiniche di antibiotici fossero la causa prima dell'induzione delle « resistenze ». L'accusa era ovviamente grave, dato l'impiego stratificato di queste sostanze in tutti i settori dell'allevamento.

Recenti sperimentazioni (Gedek et al.) hanno dimostrato che anche per l'induzione o la selezione di « resistenze » è valido il concetto che dice: « sola dosis fecit venenum ». In base alla sperimentazione è risultato che il problema dell'induzione ha inizio prevalentemente a dosi profilattiche e in quei casi in cui si procede ad una terapia non ben dosata o male mirata.

Circa gli antibiotici auxinici è inoltre accertato che alcuni di questi (non adatti alla terapia ed alla profilassi) sono addirittura in grado di ridurre elettivamente la frequenza dei microorganismi resistenti.

In campo di nutrizione è comunque in atto il processo di sostituzione di quegli antibiotici impiegati in profilassi e terapia, con altri ad esclusivo uso auxinico, non capaci di indurre resistenze.

In tema, è interessante rilevare come dai risultati di una inchiesta condotta in campo medico-ospedaliero nei paesi della CEE, non sia mai emerso che la frequenza dei fenomeni di resistenza, in operatori del settore zootecnico a continuo contatto di animali riceventi dosi auxiniche di antibiotici, risultasse superiore a quella riscontrata nel resto della popolazione.

Oggi comunque, per livello auxinico di un antibiotico si intende quella dose di principio attivo che, pur somministrato in continuità per lunghi periodi, non è in grado di modificare quantitativamente e qualitativamente (anche rispetto ai ceppi resistenti) la simbiosi gastro-enterica dei microrganismi.

G.C. Schito

Rimane allora un ultimo dubbio: è noto a tutti che le salmonelle a riserva esclusivamente umana (*typhi* e *paratyphi*) non presentano

resistenze, neppure al cloramfenicolo, farmaco da decenni usato per la terapia delle forme enteriche umane. Al contrario esistono diffuse resistenze in tutte le Salmonelle di origine animale, dalla *typhi murium* alla *wien,* ad altre. Allora si può ancora sostenere che è la profilassi, e non le dosi auxiniche a provocare tale sfavorevole situazione?

S. Maletto

Ad indurre o selezionare « resistenze » possono intervenire anche altre sostanze non tradizionalmente antibiotici. Il rame, ad esempio, largamente impiegato quale miglioratore di crescita nell'allevamento del suino e di altre specie animali, particolarmente per dosaggi superiori a 125 ppm di elemento nell'alimento completo è risultato essere un attivo selettore di ceppi resistenti. Tenendo conto di quanto riferito in precedenza e dei dati ricavati da allevamenti in cui gli « auxinici » impiegati non erano del tipo induttore, appare più facile dubitare che siano le dosi sub-terapeutiche (profilattiche) e quelle farmacologiche male mirate e/o dosate quelle su cui dovrà essere orientata l'indagine. In particolare la profilassi, dato il modello stratificato di impiego, dovrà essere sottoposta a rigorosa attenzione nel futuro.

M. VENTUROLI

PRINCIPI GENERALI DI TERAPIA ANTIBIOTICA

Il successo di una terapia antimicrobica dipende in linea generale dalla possibilità di mantenere nel focolaio di infezione una concentrazione del farmaco tale da eliminare o mantenere in rigoroso controllo il microrganismo causale, agendo direttamente od indirettamente, e con le minori ripercussioni nocive sull'animale ospite.

Per ottenere tale obbiettivo il farmaco deve poter esplicare la sua attività terapeutica a concentrazione ottimale inibitrice o letale, nel luogo di infezione.

Questi principi sono estensibili alla terapia antibatterica in tutte le specie animali e condizionano pertanto la scelta del farmaco che deve essere usato nelle circostanze particolari.

Purtroppo, nella terapia pratica veterinaria condotta su animali da reddito, il problema economico risulta spesso fondamentale per tale scelta.

Questa considerazione comprende non soltanto il costo primario del farmaco ma anche altri fattori collaterali quali ad esempio la sua via di somministrazione, la frequenza e la durata degli interventi terapeutici che lo caratterizzano.

Gli elementi procedurali che sotto il profilo teorico dovrebbero condizionare la scelta di un determinato farmaco antimicrobico sono i seguenti:

1) identificazione del focolaio di infezione ed identificazione dell'agente eziologico;

2) determinazione della concentrazione minima inibente la moltiplicazione del germe; a tal proposito una scelta iniziale dovrebbe favorire quei farmaci in grado di penetrare nel focolaio infetto e raggiungervi concentrazioni ottimali terapeutiche e che tuttavia rimangono a valori inferiori a quelli tossici per l'animale;

3) scelta di un farmaco che rispettando le richieste del punto 2 permetta di operare a dosaggi meno elevati per vie di somministrazione di più facile applicazione pratica e con frequenza di interventi minima ma sempre sufficiente a raggiungere le concentrazioni terapeutiche desiderate;

4) la scelta definitiva dovrebbe dipendere dalle considerazioni circa la tossicità potenziale del farmaco per la specie animale oggetto di intervento, l'efficacia dell'antibiotico e il suo costo.

Ovviamente per numerose situazioni patologiche non è possibile seguire fedelmente questi criteri procedurali prima di programmare una terapia. A volte infatti occorrono alcuni giorni per identificare l'agente eziologico e la sua sensibilità ed anche la scelta della via più rapida ovvero un antibiogramma « cieco » potrebbe richiedere troppo tempo tanto che una eventuale risposta avrebbe probabilmente un significato puramente storico.

Al momento attuale inoltre non sembrano essere disponibili precise informazioni circa le reazioni tissutali ed i livelli organici raggiungibili negli animali di grande mole al variare della dose e delle vie di somministrazione per ogni antibiotico.

A motivo di tali incertezze si rendono spesso necessari alcuni accorgimenti nell'attuare una terapia clinica antibiotica: uno, rappresentato dalla dose raccomandata dalla ditta produttrice e l'altro dal saggio della sensibilità microbica su di esso.

Per quanto riguarda alcune malattie spesso la conoscenza dell'efficacia chimica di un antibiotico è il solo elemento che ne consiglia il suo impiego ad un determinato dosaggio e per un periodo definito di tempo.

In altre situazioni patologiche la scelta di un determinato antibiotico può non derivare da una esperienza clinica vissuta ma essere il risultato di un ragionamento basato sui principi sopra enunciati.

Si deve tuttavia ammettere che molto spesso la terapia antibiotica assume caratteristiche di empirismo, almeno nelle fasi iniziali della malattia per divenire in seguito più razionale nella misura in cui si renderanno disponibili maggiori informazioni sulla esatta natura dell'agente causale.

Per tali motivi uno dei traguardi che deve essere raggiunto in prima istanza è quello della identificazione della malattia attraverso l'esame clinico.

Nelle malattie infettive scopo diagnostico fondamentale è l'identificazione della origine e della localizzazione del focolaio di infezione. L'importanza dell'esame clinico accurato costituisce condizione preliminare indispensabile per ottenere una terapia antibiotica efficace. La diagnosi in molti casi, identifica immediatamente l'agente patogeno e rende possibile la scelta razionale dell'antibiotico specifico.

Stabilita la diagnosi, l'esperienza clinica può suggerire immediatamente l'antibiotico più adatto e permettere una fiduciosa previsione circa il successo della terapia; può altresì indicare il probabile fallimento terapeutico o la necessità di prolungare il trattamento. Ad esempio la diagnosi clinica di mal rosso o di morbo di Glasser nei suini oppure di polmonite corinebatterica nei puledri od ancora di adenite equina identifica l'agente eziologico dell'infezione ed il tipo di antibiotico che si renderà necessario.

Dalla esatta diagnosi clinica scaturiscono ancora preziose informazioni sulla necessità di attuare interventi di ordine chemio-profilattico e sotto questo profilo può rendersi indispensabile una accurata diagnosi differenziale nel suino tra una diarrea da enterite necrotica superficiale a quella associata ad una gastroenterite da coliformi.

I problemi sulla scelta razionale di un farmaco antimicrobico sono praticamente inesistenti quando sia possibile fare una diagnosi definitiva eziologica.

Spesso tuttavia questo non può essere realizzato sulla scorta di elementi che si possono raccogliere in un primo esame clinico ma, anche in tali casi, è necessario suggerire immediatamente un programma terapeutico che possa essere di una qualche utilità per la salute dell'animale e nello stesso tempo serva a mantenere un buon rapporto tra medico e cliente. La macanza di una diagnosi eziologica non dovrebbe mai precludere l'inizio di una terapia durante il periodo nel quale vengono condotte indagini laboratoristiche atte a stabilire l'esatta natura del processo patologico.

In tali casi la perspicacia clinica guida una terapia razionale; ad esempio quando da un esame clinico di un cavallo che soffre di disturbi respiratori scaturisce una diagnosi generica di pleurite essudativa l'esperienza porta a ritenere che in linea eziologica possono essere chiamati in causa in ordine di incidenza statistica streptococchi, *Actinobacillus equuli* o pasteurelle e di conseguenza l'indicazione terapeutica si orienterà sulla benzilpenicillina o sull'ampicillina e sulla

via di somministrazione dei farmaci che, nel caso specifico, risulterà essere paraenterale o intrapleurica dato che entrambi questi farmaci possono essere introdotti nelle cavità sierose senza provocare danni da irritazione locale.

Questi approcci terapeutici si rendono spesso necessari nella medicina veterinaria applicata agli animali di grande mole, essi però richiedono una solida preparazione clinica ed una profonda conoscenza non solo dei vari aspetti della patologia ed in particolare di quello che incide nella zona di attività professionale ma anche della frequenza statistica di ogni agente patogeno.

Le considerazioni sopra esposte trovano ad esempio una valida indispensabile applicazione nelle mastiti iperacute del bovino che spesso dipendono da stafilococchi o coliformi e seppure più raramente da *C. pyogenes* e *Pasteurella multocida;* il trattamento di tali mastiti deve essere tempestivo se si vuole salvare contemporaneamente la mammella e l'animale stesso. Sottili sfumature sintomatologiche ed epidemiologiche possono permettere una diagnosi differenziale tra questi agenti patogeni e quindi una scelta razionale del farmaco più adatto ma, in assenza di un qualche orientamento diagnostico, appare logico intervenire con un antibiotico a largo spettro di azione o con associazioni di antibiotici. Lo stesso programma terapeutico verrà consigliato qualora il focolaio di infezione sia a localizzazione profonda come ad esempio nel caso di ascessi epatici o splenici.

Nei casi in cui l'agente eziologico non può essere individuato dall'esame clinico è necessario che la sua identità e la sua sua sensibilità agli antibiotici venga determinata, su campioni di materiale biologico, in sede laboratoristica.

Alcuni fattori risultano limitanti nella pratica: la disponibilità di un laboratorio ed il costo degli esami stessi; spesso le risposte ottenute risultano superate dal successo terapeutico ma, ciò nonostante, le informazioni fornite da tali indagini possono risultare di estremo interesse se proiettate nel futuro e sfruttate per casi clinici che si presentino con analoga sintomatologia; esse possono essere utilizzate come elementi di valutazione sulla sensibilità della popolazione microbica autoctona e valide quindi come bagaglio di conoscenza clinica. Non sempre è necessario ricorrere ad esami colturali per ottenere informazioni utili per la terapia; nella mastite infatti un semplice e ra-

pido esame microscopico colorato al gram può fornire la chiave interpretativa per la probabile efficacia di una terapia antibiotica iniziale.

Il prelievo di campioni da singoli animali ammalati è indispensabile in quadri clinici particolarmente gravi e tali che, qualora la risposta al primo intervento terapeutico sia insoddisfaciente, la successiva scelta dell'antibiotico possa essere guidata dalla risposta laboratoristica. Spesso anche episodi di malattie a decorso cronico richiedono un intervento diagnostico collaterale in quanto gli agenti eziologici di tali processi risultano scarsamente sensibili a numerosi chemioterapici. Anzi proprio per tali casi, in cui il fattore tempo non risulta determinante ai fini del successo terapeutico, le indagini laboratoristiche devono essere effettuate e l'attesa per un intervento mirato sembra essere giustificata.

Maggiore interesse rivestono le indagini di laboratorio nella patologia infettiva di massa in quanto permettono di individuare il diagnostico e quindi l'intervento terapeutico in modo da ridurre al minimo le perdite economiche.

In una epidemia di diarrea in suini appena svezzati l'esame clinico ed anatomopatologico permette di escludere le responsabilità della enterite necrotica superficiale ma, spesso, non è in grado di differenziare una enterite da salmonelle da quella sostenuta da coliformi; il solfato di neomicina potrebbe risultare il farmaco di scelta per tale sindrome, ma la frequente insensibilità dei microorganismi causali rende indispensabile la loro esatta identificazione laboratoristica anche in previsione di futuri programmi di profilassi.

Dosaggio degli antibiotici

In teoria non esiste un dosaggio ideale possibile a prestabilirsi per ogni chemioterapico; nell'organismo animale le concentrazioni valide nei riguardi di diversi microorganismi variano ed è possibile far fronte ad esigenze diverse modificando il dosaggio del farmaco. In pratica però tali possibilità non risultano attuabili ed in realtà è consigliabile usare il farmaco alla dose raccomandata.

La dose raccomandata è quella in grado di provocare livelli ematici e tissutali efficaci contro un germe molto sensibile causando nello stesso tempo effetti collaterali trascurabili nell'ospite. A tale riguardo la dose raccomandata dovrebbe essere considerata la dose minima at-

tiva. Compatibilmente con la tossicità dell'antibiotico la dose raccomandata può essere aumentata quando ci si trovi di fronte ad un germe poco sensibile, nei processi infettivi nei quali il tessuto necrotico impedisca o rallenti la diffusione del farmaco oppure quando, per motivi pratici e spesso nella terapia di massa, sia possibile eseguire un solo intervento.

I dosaggi farmacologici e gli intervalli tra ogni intervento che vengono consigliati dalle ditte produttrici di farmaci per gli animali di grande mole risultano spesso rispettivamente inferiori e di maggiore durata rispetto a quelli che vengono suggeriti per l'uomo e per i piccoli animali ed il motivo è probabilmente d'ordine economico; tuttavia, in molti casi, tale situazione è in netto contrasto con documentate informazioni farmacologiche che attribuiscono ad alcuni farmaci emivite piuttosto brevi e tempi di escrezione rapidi nei ruminanti e nel cavallo rispetto ad altre specie animali.

È noto comunque che per ottenere una terapia efficace si considerano necessari livelli ematici e tissutali da tre a cinque volte superiori alla concentrazione inibitoria minima documentata « in vitro » e che tali livelli debbono essere mantenuti costanti per tutta la durata del trattamento in particolare per gli antibiotici batteriostatici.

Vie di somministrazione

Endovenosa

Poiché è noto che gli antibiotici introdotti per via endovenosa raggiungono immediatamente alti livelli ematici e tissutali questa via dovrebbe essere preferita nella terapia delle malattie setticemiche e di particolare gravità prognostica; essa inoltre può essere consigliata nei processi infettivi che coinvolgono tessuti difficilmente raggiungibili dall'antibiotico o per quelli nei quali alterazioni necrotiche formano barriera alla diffusione del farmaco ed ancora nelle infezioni croniche come ad esempio nella polmonite corinebatterica dei puledri caratterizzate da formazioni ascessuali polmonari e dalla capsula del germe e che richiedono quindi alte concentrazioni di antibiotici.

L'intervento antibiotico massivo per via endovenosa tende inoltre ad impedire lo sviluppo di germi mutanti resistenti e può risultare

efficace anche nel trattamento di infezioni sostenute da germi scarsamente sensibili al farmaco utilizzato.

La via endovenosa è inoltre preferibile a quella intramuscolare nei cavalli da corsa e negli animali che debbono essere macellati entro breve tempo.

La via endovenosa non è scevra di rischi; il farmaco o l'eccipiente possono provocare gravi reazioni tossiche nell'animale; a tale proposito ricordiamo che la morte di un animale gravemente ammalato che si verifichi immediatamente dopo una iniezione endovenosa può indurre il proprietario a ritenere l'intervento responsabile del decesso.

Considerazioni di ordine economico consigliano per un programma terapeutico da effettuarsi sul « campo » la somministrazione endovenosa di carico iniziale seguita da successivi interventi per altre vie e che possono essere gestite dallo stesso proprietario.

Intramuscolare

La iniezione intramuscolare è la più comune via di introduzione dei farmaci antimicrobici negli animali di grande mole.

Particolari avvertenze debbono essere tenute in considerazione nei riguardi di detta via per farmaci ad azione irritante quali l'eritromicina e la ossitetraciclina che dovrebbero essere usati con cautela o meglio evitati, nel cavallo che spesso accusa reazioni tissutali al punto di inoculo. Per la stessa specie animale sono da proscrivere le iniezioni intramuscolari di farmaci veicolati in eccipiente oleoso.

Endoperitoneale

Di raro impiego nella terapia antimicrobica, trova una valida applicazione nei suini con diarrea nei quali il farmaco antibatterico viene veicolato in soluzioni idratanti sostituendo pertanto la via endovenosa che in questa specie animale non è di facile accessibilità.

Negli animali di grande mole viene spesso utilizzata nel caso di peritoniti essudative e nel cavallo in particolare può risultare utile in quanto la stessa agocannula inserita nella linea medioventrale dell'addome può essere sfruttata come drenaggio per l'essudato. Nel bovino viene comunemente eseguita sulla fossa del fianco destro nel

punto medio tra l'ultima costa e l'articolazione coxofemorale od almeno dieci centimetri ventralmente rispetto ai processi laterali vertebrali, così da evitare l'introduzione del farmaco nella regione retroperitoneale e perirenale.

Essa trova utile applicazione nei casi di tossiemia acuta con gravi difficoltà respiratorie per la somministrazione di farmaci del gruppo delle tetracicline i quali potrebbero causare un collasso letale se introdotti per via endovenosa.

Sottocutanea

Essa rappresenta una alternativa alla via endomuscolare, ma trova applicazione solo nei giovani animali ed in particolare nei suinetti.

Orale

Adottata per la somministrazione di antibiotici nei preruminanti monogastrici e specialmente nei puledri, suini e volatiti permette di ottenere livelli ematotissutali considerevolmente inferiori a quelli che possono essere raggiunti con dosi equivalenti somministrate per via parenterale; per tale motivo la dose orale supera di 2-4 volte quella parenterale.

Il raggiungimento dei livelli organici terapeutici è meno prevedibile poiché le caratteristiche di assorbimento del farmaco possono variare in funzione del volume delle ingesta, della mobilità gastrointestinale e dei particolari legami chimici che il farmaco può contrarre con le ingesta stesse. In particolare si ricorda che la benzilpenicillina viene distrutta in sede gastrica e che gli aminoglicosidi e le polimixine non vengono assorbiti nell'apparato digerente.

La via orale costituisce spesso una scelta dettata da esigenze di ordine applicativo (terapia di massa) e da fattori di ordine economico ed in genere viene consigliata per programmi terapeutici che si prolungano nel tempo e risulta necessaria per malattie enteriche.

I farmaci antimicrobici vengono raramente somministrati ai ruminanti; fanno eccezione a questa regola i derivati della sulfanilamide per una terapia di mantenimento che faccia seguito ad un intervento parenterale o nella chemioprofilassi degli ascessi epatici negli animali alimentati con metodo Preston con bassi dosaggi del farmaco

I livelli ematici che seguono la somministrazione per via orale nei ruminanti sono estremamente variabili e non vengono generalmente raggiunti prima di 12-18 ore. Molti chemioterapici vengono inattivati a livello ruminale essi tuttavia ne alterano in modo significativo la flora microbica con conseguente comparsa di una sindrome digerente caratterizzata da anoressia ed acinesia ruminale. Quest'ultima attività viene in particolare sfruttata ai fini terapeutici nei riguardi della cosiddetta putrefazione del rumine: esempio tipico di somministrazione orale di chemioterapici a finalità terapeutica localistica o per meglio dire ambientale e per la quale trovano impiego la streptomicina (5-10 g/die per 2-3 giorni) e le tetracicline (2-3 g/die per 2-3 giorni) nel tentativo di frenare l'abnorme sviluppo di *E. coli* e protei, germi che contribuiscono al determinismo della sindrome in oggetto.

La somministrazione orale è di facile applicazione nei suini per i quali il farmaco viene miscelato all'alimento o sciolto nell'acqua di bevanda: quest'ultima metodica è preferibile in quanto i suini ammalati pur essendo anoressici bevono con avidità.

Le quantità di farmaco assunte giornalmente dai singoli animali nelle terapie orali di massa sono spesso imprevedibili in quanto condizionate da fattori di ordine individuale correlati alla malattia (anoressia, polifagia, adipsia e polidipsia) ambientali (affollamento dei recinti, temperatura ambiente ecc.) e dalle caratteristiche dell'alimento (solido o liquido, appetibilità del medicamento).

È necessario usare grande cautela nella somministrazione orale di antibiotici a cavalli di età inferiore ai 3 mesi nei quali infatti tale intervento è spesso seguito da diarrea spesso intrattabile, responsabile di un dimagramento cronico e spesso anche mortale.

La somministrazione orale di un antibiotico è di facile attuazione nei suini per i quali il farmaco viene spesso miscelato all'alimento o sciolto nell'acqua di bevanda. Quest'ultima modalità è comunque da preferirsi in quanto i suini ammalati pur essendo anoressici bevono con avidità ed inoltre le soluzioni acquose possono essere preparate ed utilizzate rapidamente. La terapia dietetica generalmente si utilizza per trattare le malattie a decorso cronico. Al diffondersi di una malattia contagiosa in un allevamento di suini quelli ammalati all'interno del gruppo vengono inizialmente trattati singolarmente con un farmaco introdotto per via parenterale in seguito generalmente la terapia prosegue nella massa degli animali tramite l'acqua di bevanda

medicata. Quest'ultima modalità di somministrazione può risultare di semplice esecuzione per suini che si abbeverano ai trogoli; negli allevamenti ove si utilizzano sistemi automatici il problema diviene più complesso e l'intervento medicato può essere effettuato attraverso il serbatoio principale, quando questo possa essere isolato, oppure più comunemente tramite barili contenenti circa 200 litri di acqua medicata che può essere assunta dagli animali per mezzo di tazze apposite o rubinetti inseriti lateralmente. Per determinare la concentrazione di antibiotico necessaria per l'acqua si calcola la dose giornaliera totale del farmaco moltiplicando il peso totale dei suini in kg per la dose giornaliera del farmaco in milligrammi/kg. Tale quantità di farmaco verrà poi aggiunta all'acqua che viene consumata in una giornata. È chiaro che questa quantità varierà in funzione delle condizioni climatiche e della natura della malattia dei suini: ad esempio, i suini diarroici possono bere più acqua del normale. In pratica si può utilizzrae la regola empirica che indica nel 10% del peso corporeo il consumo di acqua giornaliero dei suini di età tra lo svezzamento e la vendita, preventivando un 15% per le situazioni nelle quali si preveda un maggiore consumo di acqua. Successivamente la dose giornaliera totale viene aggiunta al numero di litri di acqua equivalente al 10-15% del peso corporeo totale stimato del gruppo. La medicazione dell'acqua viene continuata per un periodo di almeno 5 giorni.

La medicazione sistematica del fabbisogno idrico degli animali incontra in pratica alcune difficoltà. Il consumo giornaliero di acqua è direttamente proporzionale alla quantità di cibo solido ingerito e quindi gli stati di anoressia e l'inappetenza comportano una riduzione notevole dell'acqua ingerita fino a giungere in casi estremi a semplici livelli di sopravvivenza. In funzione del farmaco utilizzato, l'appetibilità dell'acqua medicata può ripercuotersi sulla quantità che potrà essere assunta. Quando si utilizzano grandi serbatoi di acqua potabile che vengono alimentati continuamente, oppure due o tre volte al giorno, risulta difficile valutare la quantità di farmaco che deve essere aggiunta come dose giornaliera per riuscire a mantenere una concentrazione costante e adeguata. In teoria, i dispositivi di medicazione automatici dell'acqua dovrebbero fornire una concentrazione uniforme del farmaco. Tuttavia alcuni di questi dispositivi sono scarsamente affidabili e necessitano pertanto di una continua sorveglianza. Nei paesi nei quali le temperature ambientali raggiungono livelli al di

sotto dello zero nel corso dei mesi invernali, la medicazione dell'acqua di bevanda può non essere attuabile. Nello stesso modo si può calcolare la concentrazione di antibiotico da aggiungersi per la medicazione dell'alimento. Si calcola la dose giornaliera totale del farmaco antibatterico necessario al gruppo e questo risultato viene poi aggiunto alla quantità di alimento consumata giornalmente dal gruppo stesso. Il consumo alimentare giornaliero varia a seconda delle diete praticate e può essere facilmente valutato dal proprietario.

Una regola empirica per il consumo di cibo calcola l'assunzione del 5% del peso corporeo dallo svezzamento fino a un peso di 45 kg con una riduzione del 2,5% a 90 kg in rapporto anche al tipo di alimentazione applicato durante il periodo di finissaggio. Il rapporto tra la quantità giornaliera di farmaco e consumo alimentare giornaliero viene poi calcolato al fine di fornire una concentrazione del farmaco in mg/kg di cibo o più comunemente grammi per tonnellata. Questo metodo però, non permette una esatta definizione della quantità di farmaco che può inibire microorganismi scarsamente sensibili, né tantomeno risulta adeguato o sufficiente per la terapia orale delle scrofe nelle quali la assunzione di cibo può variare approssimativamente dai 2 kg a 7 kg.

In tutte le specie animali il protrarsi a lungo di una terapia orale può essere responsabile di infezioni secondarie spesso causate da stafilococchi o *Pseudomonas aeruginosa* o lieviti. La sovrainfezione si manifesta molto spesso nei vitelli trattati con agenti antimicrobici diversi e specialmente a seguito di terapie con tetracicline o cloramfenicolo e generalmente esplode due settimane dopo l'inizio del trattamento con l'antibiotico.

Altre vie di somministrazione

Quando si vogliono raggiungere alte concentrazioni di un antibiotico in tessuti nei quali la diffusione dei farmaci per somministrazione parenterale od orale può essere limitata essi possono essere inoculati direttamente nella sede desiderata. Ci riferiamo all'introduzione diretta di chemioterapici in sede intrapleurica, pericardica, articolare, subcongiuntivale, endorachidea ed endooculare e endomammaria.

La loro trattazione è strettamente specialistica ed in questa sede

sembra sufficiente il suggerimento che tali interventi debbano essere associati ad un trattamento parenterale ed effettuati in asepsi stretta e con preparati non irritanti.

Durata del trattamento

Per alcune malattie infettive esiste un programma terapeutico ben definito e derivante dall'esperienza clinica e dai risultati che con esso sono stati ottenuti. Di esse si occuperanno i relatori che tratteranno la parte specialistica.

Come generica regola empirica si potrebbe suggerire che la terapia dovrebbe essere continuata per un periodo di 3-5 giorni od anche oltre qualora esistano elementi che fanno intravedere la possibilità di una localizzazione cronica del processo infiammatorio in particolare per quelli a carattere cronico purulento. I trattamenti chemioterapici dovrebbero essere prolungati per 2-4 settimane. Una ulteriore regola empirica valida in particolare per i chemioterapici batteriostatici suggerisce che gli interventi terapeutici dovrebbero continuare per 48 ore dopo la scomparsa della temperatura febbrile.

Distribuzione del farmaco

Gli antibiotici appartenenti al gruppo degli aminoglicosidi (streptomicina, neomicina ecc.) e le polymixine non vengono assorbiti nel tratto digerente quindi quando si vuole ottenere per tali farmaci livelli ematici consistenti bisogna ricorrere alla introduzione parenterale. Quando sia necessario raggiungere livelli terapeutici del farmaco sia intestinali che sistemici, come ad esempio nella colibacillosi neonatale, gli antibiotici devono venire somministrati sia per via orale che parenterale. La benzilpenicillina e la meticillina vengono distrutte in un ambiente a pH acido e quindi la loro somministrazione orale è da sconsigliare. Alcuni derivati della sulfanilamide (lo ftalilsulfatiazolo, la ftalilsulfacetamide, la sulfaguanidina e il succinil-sulfatiazolo) non vengono assorbiti nel tratto digerente. I restanti antibiotici ed i derivati della sulfanilamide vengono assorbiti dopo somministrazione orale nei vitelli od agnelli preruminanti, nei suini e nei cavalli. I fattori che regolano la distribuzione degli agenti antimicrobici nei liquidi organici sono complessi e la loro diffusione dovrebbe

essere esaminata in termini di un sistema multicompartimentale le cui varie componenti sono direttamente o indirettamente a contatto con il sangue. Il meccanismo di scambio dei farmaci tra il sangue ed i vari compartimenti tissutali è regolato da fattori che influenzano la diffusione dei soluti, quali ad esempio la concentrazione del farmaco ed il volume del flusso ematico attraverso i tessuti, nonché le dimensioni del tessuto stesso. Un ruolo considerevole inoltre è esercitato dalla portata del legame proteico del farmaco nel sangue e nei tessuti, dalla costante di ionizzazione, dalle differenze del pH nei vari compartimenti e dal livello di solubilità nei lipidi del farmaco. Nella maggioranza dei processi patologici la infezione si presenta nei compartimenti tissutali extravascolari e in tale sede la efficacia della terapia è determinata dalla concentrazione in situ di farmaco libero. Purtroppo però, la determinazione sperimentale della concentrazione tissutale del farmaco in queste zone è particolarmente difficile e dispendiosa e la maggioranza degli studi farmaco-cinetici effettuati su agenti antimicrobici negli animali di grande mole si sono semplicemente occupati della cinetica ematica, che, peraltro, è in grado di fornire scarse informazioni di pratica utilità. È possibile che esistano differenze significative di ordine quantitativo nella distribuzione tissutale dei vari antimicrobici appartenenti ad uno stesso gruppo o a gruppi diversi. Inoltre potrebbero esistere differenze significative da specie a specie nella distribuzione tissutale dello stesso farmaco e della sua persistenza in una determinata zona. Sfortunatamente, per quello che riguarda le specie animali di grande mole, le nozioni riguardanti tali problemi sono molto vaghe e difficilmente reperibili e, in mancanza di dati precisi, si può presumere, seppure manchi ogni criterio di certezza, che un determinato farmaco si comporti con le stesse proprietà farmaco-cinetiche sia negli animali da macello sia nei piccoli animali che nell'uomo. Generalmente l'antibiotico presenta una scarsa diffusibilità dei liquidi extracellulari, ma i derivati della sulfanilamide, le tetracicline ed il cloramfenicolo possono raggiungere quasi totalmente i liquidi corporei ed inoltre queste sostanze riescono anche a penetrare nelle cellule. Sono note le cosiddette barriere che ostacolano la diffusione degli antibiotici in alcuni settori quali il cervello, il liquor cefalorachidiano, le cavità sierose, le articolazioni e il liquido sinoviale, l'occhio, la placenta e il feto.

Generalmente i derivati della sulfanilamide, le tetracicline e il cloramfenicolo sono dotati della capacità di oltrepassare in condizioni di normalità queste barriere mentre la penicillina non la possiede. La eritromicina riesce a penetrare a livello intracellulare, a oltrepassare la maggior parte delle barriere ma non è in grado di raggiungere livelli terapeutici nel cervello e nel liquor cefalorachidiano. Le sostanze appartenenti al gruppo aminoglicosidico generalmente raggiungono livelli terapeutici efficaci nel liquido sinoviale e nel versamento pleurico e peritoneale ma non nel cervello o nell'occhio.

La presenza di queste barriere ed in particolare quelle che si riferiscono alle cavità sierose e a quelle sinoviali, può essere di ostacolo qualora tali tessuti divengano sede di un processo infiammatorio; in tal caso può essere utile l'impiego di farmaci chemioterapici in grado di raggiungere le zone infette solo ed esculsivamente quando queste siano infiammate. Eccezione a questa regola fanno le infezioni oculari; esse si combattono solo con concentrazioni ematiche dell'antibiotico molto elevate e quindi la somministrazione dei farmaci richiede sempre un intervento endovenoso. Nelle articolazioni e nelle cavità peritoneale, pleurica e pericardica, gli alti livelli ematici necessari possono essere raggiunti solo mediante inoculazioni locali. Quasi tutti gli agenti antimicrobici vengono escreti attraverso i reni e generalmente l'urina ne contiene elevate concentrazioni. Questa caratteristica non ha grande interesse nella patologia dei grandi animali nei quali le infezioni dell'apparato urinario sono una evenienza piuttosto rara. Le penicilline e le tetracicline hanno un ciclo enteroepatico molto interessante sotto il profilo terapeutico e la eritromicina può raggiungere livelli significativi nella bile.

Associazioni farmacologiche

Nella terapia pratica veterinaria si utilizzano spesso associazioni di farmaci antimicrobici ed in commercio sono disponibili preparazioni farmacologiche sotto forma di combinazioni di due o più antibiotici a dosi fisse. In generale le associazioni vengono utilizzate sia per raggiungere un effetto sinergico su un singolo microrganismo oppure per esercitare un'attività ad ampio spettro nel caso di infezioni che sono sostenute da più agenti eziologici. Inoltre le combinazioni possono essere utili nella lotta contro l'emergere di mutanti resistenti nel corso

della terapia. La combinazione di due farmaci può tradursi in indifferenza, ed allora l'effetto è quello del singolo farmaco più efficace oppure è uguale alla somma degli effetti dei due farmaci considerati singolarmente, ancora può risultare in sinergismo od antagonismo. Nel caso di una terapia non è possibile fare previsioni circa l'instaurarsi di uno dei meccanismi farmacologici sopra elencati, essi infatti non sono regolati da norme codificate. La conoscenza di tali effetti deriva esclusivamente da studi eseguiti su animali di laboratorio e dalla sperimentazione terapeutica sull'uomo. Da quest'ultimo risulta evidente che il fenomeno del sinergismo dipende in gran parte dal tipo di germe infettante e in una certa misura dalla localizzazione del processo infettivo; si deve inoltre aggiungere che due farmaci possono avere effetto sinergico in determinate situazioni patologiche mentre l'effetto può risultare indifferente o a volte anche antagonistico in altri stati infettivi. Anche l'antagonismo non è prevedibile tuttavia i farmaci le cui associazioni risultano più frequentemente ad effetto antagonista sono quelli appartenenti al gruppo delle tetracicline, il cloranfenicolo e il gruppo macrolidico. In via generale si può affermare che le associazioni di farmaci battericidi produrranno un effetto di indifferenza oppure sinergismo, che le combinazioni di farmaci batteriostatici generalmente hanno effetto indifferente mentre l'associazione di un battericida con un farmaco batteriostatico può provocare antagonismo (Tab. 1) Negli animali di fattoria, l'attività sinergica tra penicililna e streptomicina è stata dimostrata nella terapia delle dermatiti micotiche e nell'ulcera caudale della pecora.

Le associazioni di farmaci vengono adottate anche per effettuare una terapia ad ampio spettro di azione. Una diagnosi accurata, con conseguente identificazione del probabile germe causale, permette di realizzare una terapia antibatterica specifica, ed elimina quindi la necessità di interventi ad ampio spettro. Vi sono alcune situazioni cliniche però nelle quali è indicata la terapia ad ampio spettro nonché la possibilità di una terapia con combinazione di farmaci diversi. Ci riferiamo con questo alle setticemie acute nelle quali una serie di microorganismi diversi dotati di diversa sensibilità può produrre malattie a sintomatologia analoga alle infezioni causate da microorganismi che presentano sensibilità variabile a seconda dell'isolato. L'urgenza di un trattamento immediato senza alcuna conoscenza della sensibilità batterica impone l'uso di farmaci antimicrobici che abbiano

TAB. 1: Modalità di azione dei farmaci antimicrobici.

Gruppo I: Battericidi	Gruppo II: Batteriostatici
Penicilline	Tutti i derivati della sulfanilamide
Benzilpenicillina	Tetracicline
Metacillina	Macrolidi
Cloxacillina	Eritromicina
Ampicillina	Oleandomicina
Amoxicillina	Spiramicina
Carbenicillina	Tilosina
ecc.	Carbomicina
Aminoglicosidi	Cloramfenicolo
Streptomicina	Lincomicina
Kanamicina	Trimetoprim
Neomicina	
Gentamicina	
Paromomicina	
Polimixine	
Cefalosporine	
Vancomicina	
Bacitracina	
Novobiocina	
Nitrofurani	

un'attività ad ampio spettro. La disponibilità di farmaci ad ampio spettro quali la ampicillina o la amoxicillina ed i derivati della sulfanilamide potenziati con trimetoprin ha reso meno necessarie le associazioni di farmaci, in alcuni casi però queste ultime possono essere ancora indispensabili e, per altre situazioni, sono certamente ancora consigliabili. È buona norma evitare le associazioni di farmaci batteriostatici e battericidi nella terapia degli animali anche se, fino ad oggi, per essi non è stato ancora dimostrato alcun effetto antagonista. Altre indicazioni per le associazioni di farmaci si riferiscono a fattori economici e a tale proposito una terapia combinata con penicillina-streptomcina ad esempio risulta meno costosa rispetto ad un antibiotico ad ampio spettro come l'ossitetraciclina o l'ampicillina. Inoltre le associazioni di farmaci possono essere meno tossiche ad alte dosi rispetto ad alcuni antibiotici ad ampio spettro come la tetraciclina. Nel

caso in cui si faccia uso di farmaci antibatterici è necessario che essi vengano somministrati singolarmente alle dosi rispettive raccomandate. Alcuni antibiotici se mescolati insieme possono presentare fenomeni di incompatibilità fisica. Tale incompatibilità può dipendere dal farmaco stesso o dal suo veicolo, a volte può anche essere apprezzabile una precipitazione del soluto come nel caso della benzilpenicillina cristallina e della neomicina, in altri casi può essere del tutto invisibile come per gentamicina e la carbenicillina. In tali condizioni i due farmaci dovrebbero quindi essere somministrati separatamente ed in regioni diverse del corpo. Le associazioni a dosi prefissate non sono consigliabili in quanto il livello del singolo farmaco nella combinazione è determinato dal livello degli altri. Ne risulta che non è possibile aumentare il dosaggio di uno dei farmaci della associazione senza aumentare anche gli altri e questo può causare effetti tossici indesiderati nonché aumentare il costo del trattamento. Anche i tassi di escrezione dei due farmaci possono essere molto diversi. Le combinazioni a dosi fisse più comuni, procaina-penicillina/streptomicina presentano questo inconveniente e cioè i livelli terapeutici della penicillina a seguito di una certa dose possono permanere nell'organismo anche 24 ore mentre quelli della streptomicina generalmente sono di 8-12 ore.

Altri fattori determinanti la scelta di un farmaco antimicrobico in terapia

Oltre a considerazioni sulla sensibilità batterica al farmaco antimicrobico ci sono altri importanti fattori che determinano la scelta di un antibiotico utilizzabile in un caso particolare. Nella terapia di molte malattie infettive i farmaci ad uguale efficacia potrebbero essere numerosi ed è importante quindi scegliere il più opportuno.

Il fattore economico è tra i più importanti elementi da considerarsi. Con questo ci riferiamo non soltanto al costo primario del farmaco ma agli ulteriori oneri che possono derivare dalla sua somministrazione. Si tratta infatti di un fattore importante negli animali da reddito non altrettanto significativo però nei cavalli sportivi e da diporto. L'importanza del costo primario del farmaco è ovvia. Ad esempio, nella maggior parte dei Paesi una terapia che si protrae per lo stesso numero di giorni con procaina benzilpenicillina costerà molto meno rispetto a una, per esempio, con ossitetraciclina. Se non vi

è alcuna indicazione specifica per l'uso del farmaco più costoso è opportuno ricorrere a quello di minor costo. Inoltre gli oneri economici derivanti dalla somministrazione del farmaco hanno notevole incidenza; ad esempio la decisione di trattare un animale con antibiotici somministrati per via parenterale per un periodo di giorni in alcune circostanze può richiedere quotidiani interventi terapeutici con relativo aumento della spesa globale. Un livello di efficacia equivalente può essere raggiunto con la sulfametazina con una iniezione iniziale endovenosa seguita da terapia orale gestita dal proprietario.

La via di somministrazione è un fattore ulteriore che incide sulla scelta del farmaco e sul programma terapeutico. In generale si evita di iniziare una terapia con un antibatterico come la tetraciclina che può richiedere somministrazioni endovenose giornaliere e si preferisce un farmaco che possa essere somministrato con tecniche più semplici a meno che non vi siano esigenze cliniche particolari che impongono la scelta del primo farmaco. Quando è possibile inoltre è meglio evitare i preparati ad azione irritante sui tessuti organici. La tossicità del farmaco deve sempre essere valutata quando si interviene su processi infettivi che possono richiedere dosaggi elevati dell'antibiotico, o su infezioni a decorso cronico che richiedono una terapia prolungata. Quando è possibile effettuare una scelta è meglio preferire i farmaci antimicrobici con bassa incidenza di effetti tossici collaterali alle alte dosi. Esistono in realtà scarse informazioni sulla tossicità degli antibiotici nei grossi animali.

Come in tutte le situazioni cliniche che coinvolgono animali di grande mole è indispensabile per ogni singolo episodio di malattia valutarne gli aspetti prognostici informando dettagliatamente il proprietario sul presumibile onere economico e sulla durata del programma terapeutico; da tale colloquio potrà emergere la decisione di intraprendere il trattamento o di procedere alla soppressione dell'animale.

Antimicrobici, battericidi e batteriostatici. Alcuni antibiotici sono dotati essenzialmente di attività battericida, altri solo batteriostatica (Tab. 1). Alcuni di essi inseriti nel I gruppo sono batteriostatici a basse concentrazioni ma battericidi a concentrazioni maggiori. Entrambi i gruppi per poter essere completamente efficaci devono poter contare su meccanismi di difesa organica attivi ed operanti. Nonostante che, in termini di risposta clinica, non sia possibile trovare grandi

differenze tra i due gruppi, in molte situazioni è meglio preferire un antibiotico battericida per l'intervento terapeutico. Ciò è di particolare utilità quando vengano trattati processi setticemici acuti che si associano ad una situazione di grave leucopenia e nei quali l'effetto terapeutico deve essere quindi massimo e rapido. Essi sono inoltre indicati quando sia possibile prevedere episodi di ricaduta della malattia e nella terapia antibiotica che si attua per combattere le possibili infezioni secondarie nelle sindromi agranulocitopeniche, verificantisi a seguito dell'avvelenamento da felce maschio nei bovini, oppure nell'avvelenamento cronico da furazolidone nei vitelli. Gli antibiotici battericidi sono inoltre preferibili nel trattamento dei germi capsulati quali *Klebsiella* spp. e il *Corgnebacterium equi* che possiedono una attività antifagocitaria. Un grave problema terapeutico è costituito dalle infezioni nelle quali l'agente eziologico presenta un parassitismo intracellulare considerevole; la maggioranza dei farmaci antimicrobici che possiedono la caratteristica di penetrare all'interno delle cellule è dotata di attività batteriostatica e quindi nonostante essi possano controllare la malattia, l'infezione può persistere nell'organismo anche successivamente con caratteristiche cliniche di portatore latente.

Deterioramento del farmaco

Molti antibatterici perdono rapidamente la loro attività quando vengono conservati in condizioni ambientali inadeguate. Il controllo della qualità in termini di purezza, efficacia e non tossicità comporta elevati oneri economici e per questa ragione è preferibile acquistare i farmaci prodotti da ditte di fama riconosciuta e seguire le loro indicazioni per quello che riguarda la conservazione e il periodo di validità del farmaco. L'uso di preparati antibatterici di basso costo, spesso acquistati all'ingrosso o confezionati in modo rudimentale nonché distribuiti tenendo in scarsa considerazione i fattori che influenzano la stabilità del farmaco stesso fornisce spesso scarsi risultati terapeutici. Le preparazioni farmacologiche cristalline o in polvere che necessitano di essere riportate in soluzione prima della somministrazione parenterale vengono spesso confezionate in questo modo poiché la loro attività decade rapidamente una volta riportate allo stato liquido; ne consegue la necessità di provvedere, se le indicazioni del produttore non suggeriscono il contrario, alla loro inoculazione rapida. Altri fat-

tori molto importanti che possono influire sull'attività dell'antibiotico sono la temperatura ambiente e l'esposizione alla luce del sole; essi rendono necessario la disponibilità nella pratica di recipienti a freddo per la conservazione di antibiotici e di altri farmaci.

Risposte terapeutiche indesiderate

Il clinico di fronte a malattie infettive che non risentono immediatamente dei benefici effetti della terapia instaurata è indotto a sospettare di aver errato nella scelta del farmaco, tale sospetto si avvalora maggiormente per i casi clinici nei quali una diagnosi eziologica incerta ha condotto ad un trattamento programmato su basi intuitive. In tali occasioni è consigliabile non affrettarsi nel modificare la condotta terapeutica ed attendere almeno 3 giorni prima di valutare il possibile fallimento di una terapia. Dopo di che sarà opportuno ricorrere ad altri farmaci eventualmente appartenenti ad un altro gruppo chimico e sempre tenendo presente la possibilità di un errore diagnostico e riconsiderando il caso in esame alla luce di una eventuale eziologia virale o addirittura non infettiva. In qualunque situazione nella quale si riscontri una scarsa risposta alla terapia è necessario valutare con attenzione le cause più comuni di questo insuccesso per poter intervenire modificando il trattamento oppure per programmare quelli futuri che si presentino con analoga sintomatologia. L'ipotesi più ovvia è che il germe responsabile sia resistente al farmaco oppure sia insensibile al dosaggio dell'antibiotico che è stato scelto per la terapia. A questo proposito due sono le possibilità di intervento: la prima è rappresentata dall'aumento del dosaggio, della frequenza di somministrazione e/o della scelta di una via di somministrazione diversa così da poter raggiungere livelli organici maggiori e probabilmente più efficaci; sempre però tenendo in considerazione le possibili conseguenze di ordine tossico; il secondo intervento, quello di maggiore sicurezza, è di modificare la scelta del farmaco antimicrobico. Questo problema può essere superato con l'esatta identificazione del microorganismo e della sua sensibilità potenziale attuata con ogni mezzo diagnostico disponibile. Il manifestarsi di fenomeni di resistenza batterica nel corso di una terapia antimicrobica nel singolo animale non rappresenta ancora un problema noto nella terapia applicata agli animali di grande mole. Tuttavia, l'uso ripetuto di un farmaco antimi-

crobico su uno stesso gruppo di animali, può condurre all'insorgenza di fenomeni di resistenza a quel farmaco all'interno della flora microbica residente in quel gruppo. Un'altra causa comune di fallimento terapeutico può essere individuata nella localizzazione del processo infettivo in una regione del corpo non raggiungibile dal farmaco o nella presenza di un ostacolo-barriera naturale alla diffusione dell'antibiotico come ad esempio nelle articolazioni e nell'occhio. Tali situazioni si è già detto richiedono interventi terapeutici più frequenti ed a dosaggi massivi fino alla somministrazione endovenosa del farmaco oppure al trattamento topico ausiliare. Una possibile alternativa è costituita dall'uso di un altro farmaco dotato di un maggiore potere di penetrazione. Perché l'agente antimicrobico riesca ad esercitare il suo effetto i microrganismi debbono trovarsi in una fase di grande attività metabolica. Ciò non si verifica ad esempio nei processi infettivi cronici come nelle endocarditi oppure nei focolai infiammatori nei quali vi sia abbondante materiale necrotico o fibroso; in essi i microorganismi vivono in fase di latenza metabolica che associata agli ostacoli tissutali alla diffusione del farmaco rendono necessari il ricorso a terapie massive e condotte per lunghi periodi di tempo. Nel focolaio di infezione purulenta il drennaggio chirurgico, quando è possibile, rappresenta un coadiuvante essenziale per la terapia antimicrobica.

Risulta quasi superfluo sottolineare l'importanza della terapia ausiliaria e di sostegno atta ad opporsi agli effetti patologici dello shock, della tossiemia e della disidratazione, sindromi sistemiche che spesso accompagnano la malattia infettiva.

S. PASCUCCI

INDICAZIONI, MODALITÀ DI SOMMINISTRAZIONE E DOSAGGIO DEGLI ANTIBIOTICI NEI VOLATILI

Gli interventi con antibiotici in patologia aviare presentano caratteristiche insolite e peculiari di queste specie animali allevate attualmente con sistema altamente intensivo.

Gli antibiotici vengono usati per chemioprofilassi e per terapia di massa. Di tipo preventivo consideriamo gli interventi sull'uovo di tacchino e sul tacchinotto neonato per prevenire e limitare l'infezione da *Mycoplasma meleagridis* e da *Salmonella arizona.*

Sull'uovo si esegue il cosidetto « dipping », cioè l'immersione in soluzione antibioatta con Tylosina 3000 p.p.m. per 15-20', oppure l'inoculazione delle uova nell'albume con Tylosina 1 mg o Gentamicina 0,5 mg per uovo.

In incubatoio si interviene poi sul tacchinotto neonato con inoculazione di Gentamicina 10 mg/Kg p.v. o Tylosina 12,5 mg/Kg p.v., Spectinomicina 3,5 mg abbinata ad ampicillina 5 mg per capo o sola ampicillina 12 mg per capo.

Dove si pratica la fecondazione artificiale nel tacchino viene trattato il seme con 200 μg di Gentamicina per ml a pH 7,5, dato che l'infezione da *M. meleagridis* è di tipo venereo, oltre che respiratorio.

Facciamo presente che questi interventi, pur non riuscendo ad eliminare totalmente l'agente infettante, sono indispensabile punto di partenza per l'eradicazione delle micoplasmosi, non solo del tacchino ma anche del pollo, naturalmente seguiti dal monitoraggio colturale e sierologico.

Possono rappresentare d'altro canto una frode per mascherare infezioni da micoplasmi e salmonelle in pulcini e tacchinotti garantiti indenni.

Pure preventivo per le micoplasmosi è il trattamento dei pulcini e tacchinotti per os con Tylosina 0,5 gr per litro di acqua da bere per

i primi tre giorni di vita da ripetersi in 6-20° giornata.

Trattamenti profilattici con ossi o clorotetraciclina vengono consigliati negli allevamenti soggetti a pasteurellosi polmonare del tacchino da *Pasteurella multocida* alla dose di 5-6 gr per quintale mangime dall'8ª alla 20ª settimana di vita e negli psittacidi, nei piccioni e tacchini per la psittacosi, particolarmente a salvaguardia della salute umana, alla dose di 5000 p.p.m. di mangime per 30-45 giorni.

In entrambi i casi i risultati sono soddisfacenti, anche se è dimostrato che mai si ottiene il risanamento.

La terapia a base di antibiotici dei volatili in allevamento intensivo è quasi sempre un intervento di massa praticato per os, con l'acqua di bevanda o col mangime.

Anche quando la somministrazione è individuale per via parenterale si attua sostanzialmente un trattamento di massa perché tutti i capi del gruppo interessato vengono curati indipendentemente che abbiano sintomi o siano apparentemente sani.

La somministrazione di antibiotici nell'acqua da bere è di solito preferita a quella nel mangime. In tale intervento ai vantaggi della terapia di massa per os, come il minor impiego di mano d'opera e il minore stress per gli animali, si aggiunge la maggiore uniformità di assunzione e la possibilità di trattare anche i soggetti anorettici.

Purtroppo tali vantaggi vengono spesso vanificati dalla abitudine diffusa, avallata dalla legislazione, di dosare il farmaco non secondo il peso dei volatili, ma per quintale di acqua o mangime. Vengono trascurati in tal modo fattori che influiscono in modo determinante sull'assunzione dell'acqua, come l'età degli animali e la temperatura ambientale.

Con temperatura di ambiente di 18°C il rapporto di assunzione acqua/mangime nei polli nelle prime 9 settimane di vita è 1,60/1, passa a 2 - 2,6/1 nella pollastra e 3/1 nella gallina con circa 300 ml di acqua a capo.

Se la temperatura ambientale sale a 35°C il rapporto 2/1 passa a 4,7-5/1. Non trascurabili sono altri elementi come il tipo di abbeveratoio, meglio la canaletta del beccuccio, e il sapore dell'acqua dovuto all'antibiotico.

La scarsa capacità gustativa dei volatili è parzialmente vera per il pH dell'acqua e per gli antibiotici miscelati al mangime.

La sensibilità per le soluzioni è invece molto spiccata, tanto che si

possono verificare in particolare nel tacchino e nella gallina faraona sindromi uratiche da disidratazione e morte per il rifiuto di assumere l'acqua medicata.

Le malattie aviari che più frequentemente vengono curate con antibiotici sono:

1) Le stafilococcosi, sia gangrena alare che artrite stafilococcica, che solitamente cedono al Cloramfenicolo, alla dose di 30 mg/Kg p.v. o 30-40 gr. per ettolitro d'acqua, all'Eritromicina e Spiramicina (20-40 gr./q. mangime) e solo per via parenterale alla Kanamicina (25-30 mg/Kg p.v.) e all'Ampicillina (25-40 mg/Kg p.v.).

2) Le pasteurellosi di *Pasteurella multocida,* sia come colera aviare che pasteurellosi polmonare, che oltre agli antibiotici già ricordati sono sensibili alle tetracicline, specie all'Ossitetraciclina (40-100 gr./q. mangime o 20-50 gr. per ettolitro d'acqua). Causa le frequenti ricadute solitamente la somministrazione di tetracicline viene prolungata per 15-20 giorni o ripetuta varie volte ad intervalli di 4-5 giorni.

3) La pasteurellosi da *Pasteurella anatipestifer* che recentemente si è mostrata resistente a qualsiasi trattamento antibiotico per os nonostante l'ampia sensibilità in vitro dell'agente causale, mentre è risultata sensibile all'inoculazione di Ampicillina (20-40 mg/Kg p.v.) o di Gentamicina (4-10 mg/Kg p.v.).

4) Le salmonellosi, solitamente trattate con furanici, rispondono anche alla terapia con Cloramfenicolo.

5) Le micoplasmosi vengono trattate solitamente con macrolidi quali la Tylosina alla dose di 50 gr. per ettolitro d'acqua da bere o per via sottocutanea 25 mg/Kg p.v. nel pollo, 12,5 mg/Kg p.v. nel tacchino fino ad un massimo di 75 mg per le femmine e 100 mg nel maschio, e l'Eritromicina 20-40 gr. per ettolitro d'acqua. La Tiamulina 25 gr. per ettolitro d'acqua, usata negli USA, sembra dia risultati comparabili a quelli della Tylosina.

6) La micosi dell'ingluvie da *Monilia albicans* della gallina faraona e del tacchino viene trattata con Nystatina 10-20 gr/q. mangime per 7-10 giorni e ad un quarto di dose per altri 15-20 giorni.

7) La colisetticemia di tipo respiratorio è sicuramente la malattia batterica più grave dei volatili. Per tentare di curarla assistiamo all'uso, all'abuso e al massimo spreco di tutti gli antibiotici ricordati e non ricordati. Purtroppo i ceppi di *E. coli* sono gradualmente di-

ventati resistenti a quasi tutti gli antibiotici usati, come si può constatare dagli esiti degli antibiogrammi e dalla diminuita efficacia in vivo.

Per concludere possiamo sostenere, senza timore di eccedere, che almeno il 50% degli interventi terapeutici sui volatili con antibiotici viene eseguito a sproposito e si dimostra inutile o controproducente.

Ciò è dovuto al fatto che spesso non viene neppure tentata una diagnosi, che la terapia non viene mirata con un antibiogramma, che i dosaggi e la durata del trattamento sono spesso impropri e che viene trascurato il controllo di forme virali, causa prima dell'infezione secondaria batterica.

Se teniamo presente che per le normative di legge italiane i soli antibiotici ammessi per la terapia di massa sono le Tetracicline, i Macrolidi e la Nystatina, e che esiste il problema dei residui, che impone a volte sospensioni eccessivamente lunghe se rapportate alla vita breve del volatile, dobbiamo convenire che la terapia con antibiotici, pur avendo contribuito notevolmente allo sviluppo dell'avicoltura, offre campi sempre più ristretti di applicazione.

Ancora valido appare il concetto di chemioprofilassi limitata ai casi sopra descritti, ma forti dubbi sorgono sull'avvenire della terapia in patologia aviare.

L. SIDOLI e G. BARIGAZZI

INDICAZIONI, MODALITÀ DI SOMMINISTRAZIONE E DOSAGGIO DEGLI ANTIBIOTICI NEI SUINI

La terapia rappresenta da anni uno dei più sfruttati presìdi contro le malattie batteriche dei suini. La modificazione del sistema di allevamento ha coinciso con una altrettanto sensibile modificazione degli interventi terapeutici che, da individuali, hanno oggi come obbiettivo il gruppo, i gruppi, la massa degli animali dell'allevamento.

Gli attuali schemi di allevamento, intensivi ed a rapido avvicendamento, ci invitano a ricordare gli insegnamenti offerti dall'allevamento avicolo, la cui patologia, per unanimi consensi, ha avuto il grande merito e la grande responsabilità di precedere, nello studio applicativo, le patologie delle specie animali che oggi vengono allevate con schemi analoghi al suo.

Il più positivo di tali insegnamenti è rappresentato, a nostro avviso, dalla immunoprofilassi; il più disponibile, pratico ma fallace e non scevro di pericoli è rappresentato dalla chemioterapia e dalla chemioprofilassi. E poiché questo è il modello sul quale maggiormente si è indirizzata la difesa degli allevamenti, non resta altro da fare che moralizzarlo imponendogli il sigillo di una scienza veterinaria specializzata.

Malgrado le conoscenze sulla farmacodinamica e farmacocinetica dei chemioterapici siano ancora scarse e frammentarie, il ricorso ai chemioantibiotici per controllare turbe dei vari apparati, non sempre associate a batteri, viene sempre più spesso eseguito con leggerezza e altrettanto spesso senza necessità con conseguenti false indicazioni sul successo e sulla utilità dell'intervento.

La terapia deve essere rivolta ad eliminare un particolare agente microbico o una associazione di due o più di essi. La scelta del chemioantibiotico deriva conseguentemente dalla individuazione dell'agente causale dell'infezione e, nel caso di una virosi, del suo più stretto

gregario batterico, non essendo attualmente disponibile una terapia antivirale.

Si impone quindi sempre, ove sia possibile, la diagnosi eziologica. La sua omissione, la cosidetta diagnosi generica ad esempio di « polmonite batterica, enterite batterica, artrite, meningite » ecc., oltre a sminuire il ruolo del clinico, contribuisce ad elevare l'indice di errore e di insuccesso oltre a favorire, con terapie errate, l'insorgenza di resistenze batteriche sotto l'impulso della selezione operata dall'antibiotico stesso.

Poiché è nostra personale convinzione che entro limiti soddisfacenti è possibile stabilire una diagnosi eziologica della maggior parte delle malattie dei suini per le quali si impone il ricorso alla terapia antibiotica, siamo altrettanto del parere che il clinico, prima di iniziare un qualsiasi intervento in tal senso, in mancanza di segni clinici patognomonici, deve ricorrere alla collaborazione del laboratorio diagnostico veterinario per garantirsi sulla diagnosi, sulla validità, sulla economicità e la atossicità della terapia da attuare.

Generalità sugli antibiotici.

Il numero degli antibiotici disponibili nella terapia e nella profilassi delle malattie del suino, nelle sue varie utilizzazioni cliniche è, complessivamente, limitato a circa una decina.

Di questi, alcuni possono essere utilizzati solo per via parenterale (Caf-Penicillina). Ricordiamo brevemente altre limitazioni che restringono quanto meno il campo di scelta dei rimanenti: il gruppo delle tetracicline è molto attivo verso i batteri GRAM+ e meno verso i GRAM— ed agisce prevalentemente contro batteri a rapida crescita. Inoltre la loro attività è fortemente ridotta dalla presenza di ioni metallici, di calcio e di magnesio, coi quali forma stabili complessi chelati. Loro caratteristica è poi quella di essere assorbite nel tratto intestinale anteriore e di agire per via sistemica anche se somministrate per bocca; presentano limitata attività a livello dell'intestino crasso. Recente è la rilevazione della loro ridotta attività nei confronti di popolazioni batteriche quali *E. coli* e *Klebsiella.* Antibiotici macrolidi quali Eritromicina, Spiramicina, Oleandomicina e Tilosina si adattano bene sia per somministrazione orale che parenterale. La loro attività è prevalentemente rivolta contro i GRAM+ ed i PPLO, *Pasteurella* spp,

Brucella spp. All'interno del gruppo si osserva resistenza crociata parziale tra i singoli antibiotici con ridotta utilizzazione pratica in caso di resistenza ad uno di essi. Sono considerati antibiotici di elezione nelle infezioni da Micoplasmi. La loro attività è, ricordiamolo, batteriostatica.

Esiste poi l'altro grande gruppo di uso rappresentato dagli antibiotici amminoglicosidici i quali hanno una attività antibatterica di tipo *battericida,* spettro d'azione prevalentemente indirizzato contro i GRAM — e potenziale tossicità renale elevata. Di esso fanno parte: Streptomicina, Diidrostreptomicina e Amminosidina, Neomicina, Kanamicina, Gentamicina. Il secondo gruppo ha scarso o nullo assorbimento intestinale: ne consegue che anche per questi il campo di applicazione pratica è limitato.

Per quanto attiene l'applicabilità di un qualsiasi prodotto, non si può sorvolare sul principio per cui ogni farmaco dal quale ci si attende una attività battericida o batteriostatica debba raggiungere una concentrazione plasmatica sufficiente ad esercitare la sua azione inibitrice sul microorganismo in causa. Questo dipende sia dal farmaco scelto che dal ceppo (e non dalla specie batterica) responsabile del quadro clinico. Per conoscere le concentrazioni plasmatiche ottimali, in caso di rilevante interesse economico, scientifico o pratico, si ricorre al MIC da eseguirsi sul microorganismo che si intende combattere. Conoscendo la farmacocinetica dell'antibiotico si può così ottenere nel punto di infezione una concentrazione tale da garantire un risultato soddisfacente. In altri casi, che costituiscono la maggioranza, il clinico veterinario fa riferimento al peso corporeo. Merita ricordare, anche se superfluo, che nel suino le vie di somministrazione dei farmaci sono due: parenterale individuale e di massa, per os nel mangime o nell'acqua di bevanda. Inapplicabile tecnicamente la terapia endovenosa.

Gli antibiotici posseggono attività battericida e batteriostatica o l'una e l'altra assieme. I primi uccidono attivamente i batteri che sono successivamente eliminati dalle difese corporee. I secondi hanno invece la possibilità di prevenire la crescita dei microorganismi lasciando il compito della eliminazione diretta di essi alle difese attive dell'ospite. Nel caso in cui le difese corporee siano insufficienti o nel caso di interruzione del medicamento, la popolazione batterica del-

l'animale ammalato può riemergere nuovamente e dar luogo ad una « ricaduta ».

Malgrado tale suddivisione, la differenziazione tra medicamenti battericidi e batteriostatici è, per alcuni aspetti, relativa. Infatti, alcuni antibiotici batteriostatici, quali eritromicina, sono tali a basse concentrazioni, ma battericidi ad alte concentrazioni. Per molti battericidi, poi, la eliminazione dei microorganismi aumenta con l'aumento della concentrazione plasmatica.

Gli studi di Jawetz e coll. hanno dimostrato da ormai molti anni che se due medicamenti battericidi sono usati assieme a concentrazioni tali per cui ognuno di essi, usato solo, è modicamente attivo, il loro effetto viene « drammaticamente » aumentato. Tale effetto, chiamato sinergismo, si osserva solamente su certi microorganismi e può essere dovuto ad un effetto duplice su distinti processi metabolici, compresa la eliminazione di forme « L » persistenti. Mentre in alcune infezioni non è assolutamente necessario il ricorso a due medicamenti combinati per sfruttare il loro effetto sinergico, essendo sufficiente l'attività di uno dei due, per certe altre tale associazione mostra indiscutibili vantaggi. Tale è l'esempio della Penicillina combinata alla Streptomicina o forse ancora meglio della Penicillina combinata alla Kanamicina.

Non esiste alcun effetto sinergico tra medicamenti batteriostatici. Con dosi liminari, l'effetto è puramente additivo. L'argomento della combinazione di più medicamenti ha conquistato l'opinione pubblica al punto che lo zootecnico empirico ha raggiunto la convinzione che se un antibiotico è attivo, due lo saranno maggiormente e tre cureranno virtualmente ogni malattia. A parte l'esagerazione voluta, un qualche « fondo di verità » esiste purtuttavia e se in alcune situazioni cliniche la rapida emergenza di mutanti batterici resistenti verso un medicamento può rendere precario il risultato della cura, l'aggiunta di un secondo medicamento può in qualche modo indurre una proroga con possibilità di guarigione. Siamo d'accordo tuttavia nello scoraggiare l'implicita falsa sicurezza legata alla propagandata attività di « ampio spettro » o « altissima efficacia » di alcune combinazioni fisse di antimicrobici sulle quali si basano alcuni clinici per le loro terapie standardizzate. Non si devono dimenticare inoltre alcuni effetti negativi legati all'uso di combinazioni chemioterapiche ed anche il

possibile aumento dei loro effetti collaterali come quello tossico, la ipersensibilità e le reazioni allergiche.

Anche l'antagonismo tra antibatterici sembra rivestire più interesse teorico che importanza pratica. In studi « in vitro » e su animali da esperimento Jawetz e coll. riuscirono a dimostrare che se un medicamento battericida viene usato in una concentrazione liminare o in una dose marginale, il suo effetto può essere diminuito a causa di una precedente o simultanea esposizione del microorganismo verso una dose marginale di un medicamento batteriostatico. La spiegazione di questo fenomeno è forse da attribuire al fatto che i medicamenti battericidi sono molto attivi su cellule in crescita, quando cioè l'attività metabolica aumenta durante la crescita cellulare e provvede la massima recettività verso l'azione interferente del medicamento. L'uso di un medicamento batteriostatico eseguito contemporaneamente o precedentemente, riduce l'attività metabolica.

L'effetto di un'alta dose di medicamenti battericidi non è modificato dalla simultanea somministrazione di un batteriostatico.

Cause di insuccesso della chemioterapia.

Tra le cause più probabili di insuccesso della chemioterapia o la ricomparsa della infezione dopo un iniziale risultato positivo, si debbono ricordare le seguenti:

1) persistenza batterica
2) basse difese dell'ospite
3) basso assorbimento del medicamento
4) inattivazione del medicamento (proteine dell'ospite o della flora microbica, sali)
5) bassa penetrazione del medicamento entro tessuti e cellule
6) resistenza batterica ai medicamenti

CENNI DI TERAPIA DELLE PRINCIPALI MALATTIE DEI SUINI

Malattie dell'apparato respiratorio - Spiccano attualmente per importanza, cinque distinte malattie a tropismo prevalentemente respiratorio: influenza, malattia di Aujeszky o pseudorabbia, micoplasmosi o polmonite enzootica, pleuropolmonite contagiosa da *Haemophilus* spp. e bordetellosi, il decorso delle quali può essere puro o complica-

to da agenti batterici cosiddetti di complicazione secondaria tra i quali prevalgono *Pasteurella* spp., *Streptococcus, E. coli, C. pyogenes.* In alcuni casi particolari *Pasteurella multocida* e *Pasteurella haemolytica* possono svolgere un ruolo primario.

I due virus, Myxo ed Herpes, circolano attualmente negli allevamenti suini in forma endemica; essi sono praticamente dimostrabili in tutte le stagioni dell'anno per cui, ogni qualvolta insorge un episodio respiratorio a carattere acuto è ragionevole eseguire indagini atte a dimostrarne la presenza, in quanto il solo rilievo clinico porta ad un alto rischio di errore diagnostico.

Influenza - Nella sua forma pura essa non può essere modificata da trattamenti terapeutici.

Il virus può tuttavia risvegliare batteri insediati nell'albero respiratorio sia come saprofiti transitori che come colonizzazioni di pregresse infezioni, tra i quali prevalgono, come già ricordato, *Pasteurella,* Streptococchi, *E. coli, Haemophylus suis.* Questi conferiscono al decorso clinico complicanze variabili e la insorgenza di forme di polmonite e broncopolmonite cronica a volte irreversibili. Sono questi i casi che il clinico deve seguire con particolare attenzione intervenendo precocemente con terapie a base di batteriostatici. La via orale, come metodo di somministrazione terapeutica ha la grave limitazione di risultare inadatta a causa dell'alta percentuale di morbilità e per il sintomo « anoressia » che per la sua dinamica esclude, in fasi successive, i i suini colpiti dall'utilizzo del medicamento. È il caso classico in cui la via idrica potrebbe essere utilizzata in modo eccellente.

I tempi di somministrazione del medicamento scelto debbono prevedere il controllo della crescita batterica, per cui debbono essere iniziati precocemente, la dose deve essere piena, mentre la sospensione sarà effettuata almeno 4-5 giorni dopo la guarigione degli ultimi suini ammalati.

Eritromicina, Corotetraciclina, Tetraciclina, Ossitetraciclina, Tilosina, Spiramicina e sulfamidici a basso dosaggio sono attivi su bersagli più frequenti: le pasteurelle, mentre *Haemophylus suis* viene meglio controllato da terapie individuali: trimetoprim + sulfamidico, Caf, Ampicillina, a dosi piene ripetute fino a guarigione, seguite da dosi dimezzate per altri 3-5 giorni.

Malattia di Aujeszky o Pseudorabbia - Come noto, questa malattia si manifesta sotto due principali forme cliniche: una con prevalente interessamento del SNC (suinetti alla mammella), incurabile, l'altra con prevalente interessamento dell'apparato respiratorio e con possibile insorgenza di casi isolati caratterizzati da sintomi nervosi o gastroenterici.

La forma respiratoria presenta alcune analogie con l'influenza ed è spesso con quella confusa. Per nostra esperienza essa decorre il più delle volte in forma pura. Non ci sentiamo tuttavia di scoraggiare l'uso di antibatterici specie se l'anamnesi recente o remota di allevamento indica che sintomi respiratori erano presenti in certa percentuale di animali, ciò indicando una probabile pregressa infezione da Micoplasmi, Pasteurelle ecc.

Micoplasmosi o Polmonite enzootica - Viene considerata ancora in Italia una delle affezioni respiratorie più diffuse ed economicamente più dannose dei nostri allevamenti suinicoli specie della Pianura Padana. Indagini personali, non pubblicate, sembrano indicare che tale malattia, riferita ad un campione abbastanza indicativo di suini macellati, è presente in una bassa percentuale di casi e con lesioni molto spesso di entità assai limitata. Ciò può indicare che forse la malattia è in regresso, vuoi per le migliorate condizioni igieniche ed ambientali generali, che per le terapie eseguite. Tale premessa ci pare giustificata in considerazione proprio dell'alto costo dei trattamenti chemio-profilattici proposti e dei risultati non ancora completamente soddisfacenti che sono stati conseguiti in campo mondiale.

Riteniamo sia giusto distinguere allevamenti colpiti in forma pura, che si comporta frequentemente come malattia « leggera », ed allevamenti in cui agenti microbici e virali giocano ruoli complessi tali da rendere difficile l'attribuzione della responsabilità patogena al solo micoplasma.

La politica antibiotica dovrà necessariamente, anche in questo caso, esprimere un programma adatto ad ogni allevamento.

Tilosina, Tiamulina, Spectinomicina, Lincomicina + Spectinomicina, Spiramicina, Eritromicina *per os* sono gli antibiotici più indicati per controllare le perdite economiche poiché non si intravvedono attualmente soluzioni che possano garantire la eradicazione della malattia dagli allevamenti infetti.

Pleuropolmonite contagiosa da Haemophilus parahaemolyticus - Grave infezione dell'apparato respiratorio dei suini sostenuta da un emofilo altamente patogeno che si osserva con frequenza in allevamenti sia da ingrasso che da riproduzione; è nostra personale opinione che essa costituisce, assieme all'influenza, uno dei capitoli attualmente più interessanti della patologia respiratoria dei suini.

Questa malattia, quando entra per la prima volta in un allevamento, crea notevoli danni economici e la sua eradicazione può risultare difficile. Il controllo si ottiene principalmente con interventi individuali generalizzati per via parenterale usando battericidi quali Trimetoprim + sulfamidici, Ampicillina, Penicillina + Kanamicina, Strepto-Penicillina seguiti da somministrazione per lunghi periodi di sulfamidici a basso dosaggio *per os,* oppure Ossitetraciclina od una associazione di questi ultimi per periodi non inferiori a 10-15 giorni.

Nel caso di decorso cronico la sola terapia che giustifica l'attesa di un esito è quella individuale parenterale con battericidi ad alti dosaggi.

Pasteurellosi - Pasteurella multocida e *Pasteurella haemolytica* sono i patogeni più frequentemente isolati da suini colpiti da manifestazioni respiratorie acute e croniche. Il loro ruolo, che non è sempre limpidamente definibile, si preferisce considerarlo secondario nel corso di malattie quali peste suina classica, influenza, pleuro-polmonite contagiosa, bordetellosi. In molti casi è inequivocabile il loro ruolo primario, come accade nelle setticemie emorragiche.

In questi ultimi anni si isola con maggior frequenza che nel passato *Pasteurella haemolytica.*

Se il loro ruolo di responsabilità è secondario, esse divengono dominanti quali bersaglio della terapia in corso di malattia virale.

Dal punto di vista strettamente terapeutico le pasteurelle mostrano sensibilità verso vari antibiotici quali Cloramfenicolo, Ampicillina, Streptomicina, Penicillina G (alcuni ceppi), Ossitetraciclina, Spiramicina, Trimetoprim + sulfamidico, con ampie variazioni da ceppo a ceppo. La Tilosina, normalmente poco attiva verso le pasteurelle, sembra potenziare altamente il suo effetto *in vitro* se associata alla Ossitetraciclina. Anche Spectinomicina può essere usata con successo in combinazione con un antibiotico macrolidico, ma con dosaggi elevati per compensare la bassa attività che presenta *in vitro.*

Normalmente si assiste in pratica al fenomeno delle sequele respiratorie laddove si è verificato un episodio acuto virale od anche battreico (*Haemophilus*): dalle lesioni polmonari l'isolamento più frequente è ancora rappresentato da *Pasteurella*. La terapia della polmonite e broncopolmonite cronica si basa sul controllo della infezione cronica e sul trattamento delle esacerbazioni acute. Per la prima sono indicati Ampicillina e Trimetoprim + sulfamidico, meglio che non le tetracicline sia per l'attività battericida da essi svolta che per la resistenza batterica in aumento di queste ultime. La durata del trattamento può anche essere protratta per lungo tempo, ciò dipendendo da motivi di ordine economico soprattutto.

Per le esacerbazioni acute si preferisce il trattamento parenterale con Cloramfenicolo, Penicillina + Streptomicina o Ampicillina per 5-7 giorni ad alti dosaggi.

Bordetellosi - Considerata l'agente eziologico della Rinite infettiva dei suini, *Bordetella bronchiseptica* è frequentemente associata a *Pasteurella multocida* che concorre a potenziarne il potere patogeno.

La terapia di questa affezione, che è ancora poco chiara sotto molti aspetti, fornisce risultati accettabili solo in via transitoria.

I recenti incoraggianti risultati ottenuti dalla immunoprofilassi con vaccini preparati con ceppi selezionati di *B. bronchiseptica* dotati di alto potere antigene invitano ad imboccare questa via associandole, nel periodo preimmune, il supporto della chemioprofilassi.

Tale chemioprofilassi deve essere iniziata precocemente, ovvero nei primissimi giorni di vita (1^0-6^0-12^0) attraverso la via parenterale individuale generalizzata con antibiotici quali Tilosina, Trimetoprim + sulfamidico, Cloramfenicolo, subentrando con il trattamento per os verso il 15^0-18^0 giorno di vita con associazioni antibiotico-sulfamidiche. Tale trattamento deve essere ininterrotto, eseguito con dosi liminari, per almeno 7-8 settimane. Al di fuori di questo periodo la terapia offre la sola promessa di arrestare la eliminazione batterica da parte di individui portatori-eliminatori.

MALATTIE DI ALTRI APPARATI

Salmonellosi - Questa malattia, generalmente sostenuta da diversi sierotipi di *Salmonella,* è attualmente un evento raro nei nostri al-

levamenti. Più frequente è l'isolamento di *Salmonella* in assenza di malattia. L'uso continuato di chemioprofilattici non antibiotici quali il Carbadox od altri similari, ha avuto una influenza decisiva sulla scomparsa della malattia con il concorso, sia chiaro, del notevole miglioramento delle condizioni igieniche generali.

Nel caso di dimostrazione della malattia in forma setticemica, enterica, entero-pneumonica, è opportuno interrogare il « test di sensibilità » a causa di un'alta percentuale di ceppi resistenti a numerosi antibiotici.

Si ritiene inutile pertanto l'indicazione della terapia lasciando al clinico la scelta con il conforto del laboratorio.

Dissenteria suina - L'uso degli antibiotici nella terapia e nella profilassi di questa importante ed ancora molto diffusa malattia sostenuta da *Treponema hyodysenteriae e Campylobacter* spp., è stato fortemente limitato dai risultati ottenuti dall'impiego in campo dei nitroimidazolici e del Carbadox.

Numerosi lavori testimoniano tuttavia l'attività di Tiamulina, Lincomicina, Apramicina, Virginiamcina, Eritromicina e Tilosina che possono rappresentare una scelta alternativa o possono essere usati in associazione ai primi in casi particolarmente ribelli ai trattamenti usuali.

Colibacillosi - L'uso continuo e diffuso della chemio-antibiotico terapia nel controllo della diarrea colibacillare dei suinetti ha avuto come risultato un incremento della resistenza dei ceppi di *E. coli* ed un aumento della richiesta di antibiotici attivi su di essi. L'intervento terapeutico offre risultati apprezzabili limitatamente a quella manifestazione che insorge entro le prime ore e nei primi 5-8 giorni di vita, interessa particolarmente il piccolo intestino ed è caratterizzata da diarrea profusa, disidratazione e morte, ma anche contro la forma più lieve che può sovente riconoscersi oltre questo periodo, cioè verso le tre settimane. La setticemia si manifesta meno frequentemente dell'enterite: essa porta rapidamente a morte gli animali colpiti. Sono sufficienti poche ore per rendere superfluo qualsiasi intervento.

La gastroenterite emorragica da *E. coli* emolitico, che rientra nelle malattie da svezzamento associate ad *E. coli* può essere minimizzata associando diete alimentari particolari e razionate a terapie anti-

biotiche (Trimetoprim+sulfamidico, Gentamicina *per os,* Acido Nalidixico, Colimicina) ed antitossiche. La malattia degli edemi, rappresenta ancora oggi uno dei problemi più sconcertanti della patologia suina per cui non ci sentiamo di proporre per essa un intervento terapeutico preciso.

L'enterite colibacillare neonatale prevede l'uso di antibiotici sia per via parenterale che per via orale. Anche in questo caso è di fondamentale importanza il ricorso al test di sensibilità da eseguire sul maggior numero di ceppi isolati da ogni episodio. Tra gli antibiotici d'uso più frequente citiamo: Cloramfenicolo, Trimetoprim+sulfamidico, Colistina per via i.m., Neomicina, Streptomicina, Colimicina, Apramicina, Ampicillina per os.

Gentamicina, molto attiva sugli enterobatteri, svolge il più alto potere nefrotossico di qualsiasi altro antibiotico per cui si consiglia prudenza nell'uso.

Malrosso - Malattia sempre molto attuale per l'alta frequenza degli episodi che si riscontrano in campo e per le gravi perdite economiche che provoca: aborti e mortalità neonatale negli allevamenti da riproduzione, setticemie, artriti, endocarditi negli animali adulti quali scrofe e verri, e negli animali da ingrasso.

E. insidiosa presenta una costante ed alta sensibilità nei confronti di molti antibiotici tra i quali primeggiano la Penicillina e le Tetracicline.

Animali clinicamente ammalati, curati nella fase precoce della malattia vengono rapidamente a guarigione con la somministrazione di Penicillina G sodica alla dose di 10.000 U.I./Kg di peso vivo, ripetute per 2-3 giorni.

Ci sembra tuttora un comportamento saggio, dopo la comparsa dei primi casi clinici in un allevamento, eseguire la terapia sui soli animali ammalati, attendere l'evoluzione della malattia attraverso controlli termografici sugli animali del gruppo infetto e su qualsiasi altro animale che mostrasse manifestazioni anche minime di malessere generale. In caso di tendenza alla diffusione, terapia individuale agli ammalati e di massa *per os* con Tetracicline alla dose di 500-1000 ppm per 8-10 giorni durante i quali si esegue la vaccinazione di tutti gli animali sani.

Leptospirosi - Premesso che la profilassi immunizzante rappresenta il metodo migliore di prevenzione di questa diffusissima malattia, nel caso in cui si verificasse una infezione in allevamenti indenni, il ricorso alla terapia è improrogabile ed insostituibile.

Gli antibiotici più attivi sono: Streptomicina e Tetracicline.

Tetracicline somministrate a dosi di gr. 40/ql mangime (1 gr di sostanza pura/scrofa/giorno) per un periodo variabile da 10 a 14 giorni non eliminano il microorganismo dai tessuti renali di tutti gli animali affetti cronicamente ma riducono del 50% il numero dei soggetti portatori e possono aiutare a ridurre i sintomi clinici quali l'aborto. Raddoppiando il dosaggio (80 gr/ql mangime) pare si possano eliminare totalmente i portatori-eliminatori.

Nei casi accertati, tutte le scrofe gravide possono essere protette dall'« evento-aborto » con trattamenti parenterali di Diidrostreptomicina alla dose di gr 5/scrofa/giorno per tre giorni consecutivi poiché le tetracicline danno luogo a reazioni locali.

Infezioni da Streptococchi - Gli streptococchi sono frequentemente associati ad infezione di organi od apparati nella specie suina tali da costituire « problema di allevamento ». I casi più frequentemente osservati sono:
la setticemia diplostreptococcica, la poliartrite-polisierosite, le meningiti, le onfaliti, le metriti, le infezioni conseguenti a castrazione e le linfoadeniti. *Streptococcus equisimilis, faecalis, faecium, infrequens, salivarius, avium, suis, cremoris* sono stati di volta in volta associati a tali infezioni.

La terapia più attiva è rappresentata da interventi individuali per via parenterale utilizzando Penicillina G sodica o Penicilline semisintetiche, Cloramfenicolo, Trimetoprim + sulfamidico da usarsi a dosi elevate e per periodi non inferiori a 5-6 giorni consecutivi.

Metrite-Mastite-Agalassia - Nota da anni, questa sindrome postpartum viene oggi osservata più frequentemente che nel passato negli allevamenti da riproduzione. Non chiarito perfettamente il ruolo dei vari agenti ad essa associati, quali *E. coli, Klebsiella,* Streptococchi, Stafilococchi, Micoplasmi, essa insorge in seguito ad infezione puerperale (febbre puerperale, metriti acute puerperali).

La terapia e la chemio-antibiotico-profilassi si impongono in casi

accertati, adeguatamente precedute da una accurata revisione del « management » di parto. Sono considerati soddisfacenti gli interventi mediante: Trimetoprim + sulfamidico 15 mg/Kg di peso vivo per tre giorni consecutivi, Ossitetraciclina, Tilosina + Streptomicina.

Gli interventi intrauterini sono, da alcuni Autori, considerati più dannosi che utili a causa della asepsi necessaria nella esecuzione.

Cisto-pielite enzootica della scrofa - Infezione di probabile origine venerea, essa è stata osservata in alcuni allevamenti nei quali ha provocato danni rilevanti a causa della morte di numerose scrofe. Sostenuta prevalentemente da *C. renale,* può essere prevenuta con trattamento da eseguirsi per via parenterale usando Penicillina e Streptomicina o Cefalosporine il giorno dell'accoppiamento, unitamente a rigorose norme di igiene genitale.

* * *

A conclusione di questa breve sintesi di indicazione pratica di terapia delle più frequenti malattie dei suini che possono beneficiare dell'intervento con antibiotici, aggiungiamo quanto segue:

1) siamo certi che la chemio-antibiotico-terapia avrà ancora per lunghi anni una azione decisiva e dominante sul controllo di molte malattie batteriche, ma ciò alla sola condizione che il clinico veterinario eserciti un maggior impegno « moralizzante » nella ricettazione specie degli integratori medicati;
2) la terapia deve seguire la diagnosi eziologica là dove essa può essere raggiunta in breve tempo;
3) gli agenti eziologici di molte malattie mostrano variazioni di sensibilità entro la specie alla quale appartengono per cui molto spesso si impone per essi il ricorso ai tests di sensibilità;
4) la terapia di massa con intervento individuale ci sembra preconizzabile come metodo di scelta per il conseguimento di risultati a brevissimo termine nella lotta ad alcune malattie acute e croniche poiché: permette l'uso di antibiotici battericidi, offre la possibilità di interventi tempestivi, diminuisce il pericolo delle resistenze batteriche e rispetta la posologia.

G.C. PRATI

INDICAZIONI, MODALITÀ DI SOMMINISTRAZIONE E DOSAGGIO DEGLI ANTIBIOTICI NEI BOVINI

Gli interventi antibatterici nel bovino vengono praticati sia a scopo terapeutico che profilattico. Gli antibiotici e le loro associazioni con sulfamidici o chemioterapici possono venire usati per entrambi gli scopi.

Purtroppo però nella pratica veterinaria si assiste spesso ad un uso scorretto sia nel dosaggio che nei tempi di somministrazione con la grave conseguenza di facilitare nei batteri l'antibioticoresistenza. Anche l'uso di antibiotici come auxinici in zootecnia ha portato alle stesse negative conseguenze. Ciò, nonostante la comparsa continua di nuovi antibiotici, ha indirizzato molti Colleghi a ricorrere ai vecchi sulfamidici.

Il veterinario pratico dovrebbe imporsi di ricorrere all'uso dell'antibiotico solo quando veramente necessario sia in terapia che, a maggior ragione, in profilassi. Qualora, dopo attenta valutazione decida di ricorrervi, è bene usi sempre i dosaggi più elevati indipendentemente dalla gravità dell'infezione, per un tempo sufficientemente lungo al fine duplice di evitare ricadute, sempre problematiche da risolvere, e di ridurre la possibilità di comparsa di ceppi resistenti; di massima *è bene protrarre la somministrazione di antibiotico per 4-5 gorni dopo guarigione clinica.*

Elemento fondamentale per instaurare un trattamento antibiotico è la diagnosi eziologica e, possibilmente, il test di sensibilità del germe nei confronti degli antibiotici.

A volte però, come nelle affezioni respiratorie dei giovani bovini, dove la forma virale di base è spesso complicata da più agenti batterici (*Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica,* streptococchi, *E. coli, Haemophylus,* micoplasmi ecc.) a seconda dei diversi individui se non addirittura nello stesso soggetto, è indispensabile ricorrere ad

antibiotici a larghissimo spettro e l'antibiogramma è di scarsa utilità.

A proposito di queste forme vengo spesso interpellato da Colleghi della pratica che si trovano in difficoltà nella terapia in allevamenti dove l'anamnesi, quando sincera, riferisce di trattamenti ripetuti con i più diversi antibiotici, a volte alternati gli uni agli altri con dosaggio e per periodi i più fantasiosi, senza un programma organico né di profilassi né di erapia. È il difetto di molti allevatori di seguire il consiglio del venditore di medicinali e chiamare il Veterinario quando la situazione è ormai irrecuperabile. In questi casi, secondo la mia esperienza i risultati migliori si hanno con la vecchia sulfametazina sodica (sulfamidico ad amplissimo spettro) in vena alla dose di mg 200/kg p.v., ripetuta ogni 60-72 ore alla dose di mg 100/kg p.v. per 4-5 volte, associata per i primi 4-5 giorni con mg 10-15/kg p.v. di Tylosina in muscolo, al fine di intervenire anche su micoplasmi che spesso, nella pratica diagnostica, si isolano dai polmoni di vitelloni e vitelli recapitati ai nostri laboratori.

Nei bovini, *la profilassi* con antibiotici viene usata principalmente per prevenire le seguenti forme morbose:

a) - complicazioni di forme respiratorie sostenute da virus, specialmente in occasione di raggruppamenti e trasferimenti di vitelli di diversa provenienza. Si usa ad esempio Spiramicina alla dose di g 6/q p.v. al giorno per 4 giorni e una dose dimezzata per altri 3 giorni, oppure Ossitetraciclina con la stessa posologia (associata a Sulfametazina).

b) - Complicazioni di forme enteriche sostenute da virus (Rota e Corona). Vedi terapia delle colibacillosi.

c) - Colibacillosi dei vitelli. Vedi terapia.

d) - Salmonellosi dei vitelli. Vedi terapia (meglio i Nitrofurani).

e) - Mastiti. Vedi terapia.

Malattie più comuni che frequentemente vengono trattate con antibiotici

SINDROMI RESPIRATORIE

Quando è evidente la compromissione dello stato generale, in singoli animali o in gruppi nei quali sia in corso un trattamento di mas-

sa, è d'obbligo il ricorso alla somministrazione individuale dei seguenti antibiotici.

Cloramfenicolo - Sotto forma di sodio succinato alla dose di mg 10/kg p.v. per via endovenosa o intramuscolare, 3-4 volte al giorno.

Ossitetraciclina (cloridrato) - Mg 10-15/kg p.v., per via intramuscolare ogni 12-24 ore nei primi 2-3 giorni, ogni 24 ore in seguito.

Ampicillina - mg 10/kg p.v. per via intramuscolare, endoperitoneale e endovenosa lenta (diluire 1/10 - 1/20 la soluzione di Ampicillina sale sodico da usare per via intramuscolare).

COLIBACILLOSI

Quasi mai è necessario ricorrere a trattamenti di massa, data la precocità dell'affezione che colpisce i vitelli nei primissimi giorni di di vita. Quando le misure di profilassi igienico-sanitaria non sono sufficienti si ricorre al *trattamento individuale* sia a scopo profilattico che terapeutico con:

Cloramfenicolo mg 1015-/kg p.v. per via intramuscolare o endovenosa 3 volte al giorno oppure mg 30/kg p.v. 2-3 volte al giorno per via orale.

Ampicillina mg 10/kg p.v. per via endoperitoneale o intramuscolare 4 volte al giorno oppure mg 25-30/kg p.v. 3 volte al giorno per via orale.

Neomicina mg 5-10/kg p.v. per os due volte al giorno.

Colimicina 100.000-150.000 u.i./kg p.v. per os due volte al giorno.

Gentamicina mg 10-15, due volte al giorno per os.

SALMONELLOSI

In allevamenti di giovani vitelli è opportuno praticare il trattamento di massa, riservando quello individuale ai soggetti con compromissione dello stato generale.

Cloramfenicolo o *Ampicillina* alle stesse dosi consigliate per le colibacillosi. Nel trattamento di massa il medicamento va somministrato nel latte a dosi tali che gli animali possano assumere nelle 24 ore quanto avrebbero ricevuto se trattati individualmente. È opportuno prolungare il periodo del trattamento dopo la completa remissione dei sin-

tomi, anche oltre i 4-5 giorni. Nel trattamento di massa i nitrofurani rispondono bene.

ALTRE INFEZIONI

Carbonchio ematico. Nelle aree carbonchiose, un improvviso calo della produzione lattea da una mungitura all'altra, un'improvvisa anoressia, unite ad un brusco rialzo termico, possono far sospettare il carbonchio ematico. Sono consigliabili i seguenti trattamenti.
Penicillina G sodica, 10.000-15.000 u.i./kg p.v. per 6 volte al giorno e per via endovenosa al primo-secondo giorno. Successivamente si può passare alla stessa *penicilina in veicolo oleoso* o a penicillina procainica da somministrare alla stessa dose ogni 12 ore. Quest'ultimo trattamento può essere praticato anche a scopo profilattico in bovini sani sospetti di contaminazione.
Ossitetraciclina (cloridrato) mg 10/kg p.v., due volte al giorno per via endovenosa, per i primi giorni, poi per via intramuscolare. Nella profilassi anticarbonchiosa non vanno dimenticati né l'antisiero né le vaccinazioni.

Setticemia diplococcica. È alquanto difficile da diagnosticare in vita data anche la rapidità del decorso. Il trattamento viene fatto spesso a scopo profilattico nel gruppo dove si sono verificati casi di morte per tale forma. *Penicilina G sodica* 10.000 u.i./kg p.v. ogni 12-24 ore per 3 giorni.

Pielonefrite da Corynebacterium. Penicillina G procaina 15.000-20.000 u.i./kg p.v. per via intramuscolare in unico intervento.

Clamidiosi. Cloramfenicolo o Tetraciclina mg 10-15 kg p.v. 3 volte al giorno.

Cheratite infettiva da Moraxella bovis. Pomata oftalmica a base di Cloramfenicolo e Ossitetraciclina 3 volte al giorno fino a guarigione. Nei casi avanzati e più gravi si può anche ricorrere agli stessi antibiotici per via parenterale ai dosaggi più volte citati.

Mastite streptococcica.

a) *Terapia in lattazione.* È consigliata soltanto nelle forme clinicamente manifeste.
Penicillina G procanica 1.000.000 u.i. associata a *Streptomicina* 1 g/quarto per infusione intracanalicolare mammaria in soluzione acquosa (ml 50/100) ongi 24 ore per 2-3 volte. Oppure le stesse dosi in veicolo oleoso. La somministrazione deve avvenire previo accurato svuotamento della mammella e disinfezione dei capezzoli.
Cloxacillina mg 200-300/quarto in veicolo oleoso, da ripetere dopo 24 ore con le modalità ora descritte. Permane nei tessuti per 5 giorni.

b) *Terapia-profilassi in asciutta.*
Penicillina G procainica 1.000.000 u.i. associata a Streptomicina g 1 per infusione intracanalicolare mammaria, in veicolo oleoso alla messa in asciutta e 10-15 giorni prima della ripresa della lattazione.
Cloxacillina mg 500/quarto per infusione mammaria alla messa in asciutta. Permane nei tessuti per circa un mese.

Mastite stafilococcica e da C. pyogenes

a) *Forme acute. Cloramfenicolo* o *Ampicillina* per via endovenosa ed alla posologia indicata per altre infezioni. Quando la diagnosi eziologica è certa si può usare anche *Penicillina G sodica* per i primi giorni endovena, per poi passare alla *Penicillina G procainica* per via intramuscolare secondo la posologia già indicata.
b) *Forme subacute e croniche.* Vedasi quanto detto per le mastiti streptococciche. Nel caso di ceppi resistenti alla penicillina, oltre alla *Cloxacillina* si può usare *Cloramfenicolo* alla dose di g 0,5-1/quarto per via intracanalicolare, oppure *Neomicina* alla dose di mg 500/quarto per infusione intracanalicolare mammaria in soluzione acquosa ripetuta dopo 24 ore.

Mastite da coliformi (*E. coli, Klebsiella, Enterobacter aerogenes*).
Cloramfenicolo o *Ampicillina* mg 15/kg p.v. per via endovenosa 4

volte al giorno; a scomparsa della febbre: lo stesso dosaggio intramuscolo per 3 volte al giorno, si associa trattamento per via intracanalicolare mammaria con lo stesso antibiotico.

d) *Mastite da piocianeo*. *Neomicina* come sopra riportato. *Gentamicina* mg 80-100/quarto/giorno, per via intracanalicolare mammaria.

A. BIGNARDI

INDICAZIONI, SOMMINISTRAZIONE E DOSAGGIO DEGLI ANTIBIOTICI NELLA TERAPIA DELLE MASTITI

Premesso che la terapia delle mastiti con i soli antibiotici può non essere sufficiente, soprattutto nel caso di forme con reazione sistemica, e che la mia esperienza pur ventennale è della sola Provincia di Bologna, chiamato per uno o più casi di mastite delle bovine compio prima l'esame clinico con particolare riguardo all'anamnesi individuale e collettiva, eseguo poi l'esame obbiettivo generale (importantissimo il prelievo della temperatura), quindi procedo alla palpazione del quarto colpito e poi all'esame del secreto mammario.

Prelevato un campione per gli esami microscopici e colturali che con l'antibiogramma mi permetteranno una terapia mirata, seguendo ciò che l'esperienza clinica mi consiglia, ne inizio immediatamente una che l'ulteriore decorso e l'esito degli esami batteriologici potrà confermare o cambiare.

Ricordando che la tempestività dell'intervento terapeutico è indispensabile per impedire la cronicizzazione di molte forme mastitiche, distinguo innanzitutto il trattamento da farsi in lattazione da quello che conviene effettuare in asciutta.

Nel primo caso uso antibiotici in soluzione acquosa ed a rapida eliminazione per evitare conseguenze per la salute pubblica legate alla possibile presenza di residui di medicamento nel latte e nelle carni, nonché per evitare gravi danni all'industria casearia; nel secondo utilizzo antibiotici veicolati in un eccipiente a lenta eliminazione (per esempio olio minerale gelificato con monostearato di alluminio) che permangano nell'ambito del tessuto mammario il più a lungo possibile.

Nel caso del trattamento in lattazione ed in presenza di una cisterno-galattoforite o anche di una mastite catarrale, adopero gli antibiotici per sola via intracanalicolare disciolti in 50 ml di acqua distil-

lata e talvolta ascociati ad enzimi proteolitici (tripsina), o anche a dimetilsulfossido; se è invece presente una mastite parenchimatosa acuta, uso gli antibiotici anche per via venosa, preceduti da una iniezione di 20 u.i. di ossitocina e associati o meno a sulfamidici, desametazone (10 mg), soluzioni disintossicanti. I trattamenti per via canalicolare, da effettuarsi di preferenza alla sera, per poter lasciare almeno 12 ore la soluzione in sito e permettere durante la successiva giornata un frequente svuotamento dei quarti colpiti, dipendono, come numero, dalla risposta della bovina alla terapia applicata e comunque non devono mai essere inferiori a tre.

Gli antibiotici che uso nel trattamento delle mastiti in lattazione sono:

a) - Penicillina G o Benzilpenicillina: per via endomammaria, non meno di 1 milione associata a 1 g di Diidrostreptomicina nelle forme da *Streptococcus agalactiae* che oggi trovo in proporzione non superiore al 10% e che vedo solo in piccole stalle a conduzione familiare; da 1 a 3 milioni, sempre con 1 g di Diidrostreptomicina, nelle mastiti da *Streptococcus uberis* che sono ora in notevole aumento; da 3 a 5 milioni, con 2 g di Diidrostreptomicina, nelle forme sensibili da *Staphylococcus aureus* che costitusce le causa di mastite clinica di più frequente riscontro.

b) - Diidrostreptomicina: 1 o 2 g per via canalicolare e, per via muscolare, 1 g/q p.v. nel caso di mastiti da piocianeo, *Klebsiella, Proteus,* sensibili a questo antibiotico.

c) - Cloxacillina o Dicloxacillina: mg 500/quarto nelle forme da *S. aureus* e da *C. pyogenes.*

d) - Tilosina: g 1 per via canalicolare per 3 giorni oltre a g 1/q p.v. per via parenterale nel caso di mastiti da *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* con concomitante presenza di lesioni a carico del ginocchio e del nodello. È una forma di mastite che ho visto una sola volta su una bovina proveniente dalla Provincia di Piacenza e che penso sia pressoché sconosciuta nel bolognese.

e) - Kanamicina: g 1/quarto nelle mastiti da *S. aureus.*

f) - Neomicina: g 1 per via canalicolare nelle mastiti da *S. aureus* (per almeno 6 anni è stato l'antibiotico di più sicuro successo contro questa forma), molto utile anche nelle forme da enterobatteri.

g) - Gentamicina: : mg 80 per via diatelica e per quarto nelle mastiti da *Klebsiella, E. coli, Pseudomonas* e *Proteus.*

h) - Cloramfenicolo: g 1 o 1,5 per via canalicolare associato a g 5 per via venosa nelle forme parenchimatose da colibacillo e nelle mastiti acute da *S. aureus* che possono avere, a seconda dei ceppi, il carattere della mastite catarrale, gangrenosa o granulomatosa-actinomicotica.

Il trattamento con antibiotici in asciutta è da consigliare in tutte quelle stalle dove sono sorti gravi problemi di mastite strepto-stafilococcica. Dopo avere eliminato dall'allevamento le bovine che hanno presentato più ricadute durante la lattazione, è consigliabile trattare tutti i quarti di quelle presenti. La Dicloxacillina pomata in tubi-siringa da 200 mg, da usarsi una sola volta all'inizio dell'asciutta, o la Cloxacillina in tubi da mg 500, entrambe veicolate in alluminio monostearato, sono gli antibiotici che preferisco.

DISCUSSIONE

Gli interventi in discussione sono stati ricavati, in parte, dalla registrazione su nastro e, in parte, dal testo presentato dai singoli intervenuti.

S. Maletto

Nei trattamenti farmacologici di massa per via orale, il problema del giusto dosaggio del principio attivo in rapporto al peso corporeo degli animali e delle quote di ingestione giornaliera di alimenti o di acqua di bevanda, non è facile. Motivi molteplici di variabilità intervengono a rendere difficile ogni decisione, quali ad esempio la variazione di peso e di appetito tra i singoli individui, le categorie di dominanza sociale nei gruppi di animali conviventi, i fattori climatici e nutrizionali di variazione dell'appetito e della sete, l'interferenza dello stato di salute rispetto ai consumi di alimenti e di acqua, nonché il non lineare andamento tra accrescimento corporeo e quantità di nutrimento ingerito.

Tutto ciò è noto, ma la necessità operativa tipica dell'allevamento zootecnico ci ha imposto di scegliere posizioni intermedie e di codificare i dosaggi secondo legge.

Recentemente si è presa però coscienza di un fatto che tende a rendere nulla o scarsa l'efficacia delle dosi stabilite. Il miglioramento genetico degli animali ha infatti continuato a modificare i valori degli indici di accrescimento giornaliero e quelli di consumo di alimenti. Un broiler di oggi, alla ottava settimana di vita è cresciuto del 230% in più mangiando il 45% in meno rispetto ai suoi ascendenti di 50 anni or sono. Ciò è valido, anche se in misura diversa, per tutte le spe-

cie animali allevate e fa sì che il rapporto dose/kg di peso corporeo si sposti continuamente con il processo di miglioramento genetico su livelli di sottodosaggio.

Ciò impone ovviamente una revisione delle dosi ammesse ed un loro costante aggiornamento, ma rende necessario anche riesaminare tutto il problema dei residui e delle aree di rischio per il consumatore.

S. Pascucci

Sono d'accordo sul fatto che il dosaggio degli antibiotici somministrati nell'acqua debba essere fatto sulla base del peso corporeo del pollo. Le tabelle sono fattibili e ritengo che l'elevata tecnologia esistente nell'industria avicola potrebbe consentirne l'aggiornamento. Il problema pratico e sostanziale è però un altro. Nella gran parte dei casi, il trattamento viene eseguito dall'allevatore che ha bisogno di indicazioni semplici come, ad esempio, tanti grammi per ettolitro di acqua e ciò viene eseguito indipendentemente dalla quantità di acqua consumata nella giornata.

Attualmente si osserva la tendenza ad un recupero del veterinario, purché sia specialista, particolarmente nelle grandi aziende avicole. Nei casi in cui ciò si verifica diviene possibile fare un ragionamento valido dal punto di vista terapeutico.

A. Giulioni

Quali sono le ragioni per le quali il Dott. Sidoli esclude il trattamento antibiotico preventivo, in particolari momenti zootecnici, di forme morbose che l'anamnesi di allevamento indica come ricorrenti, fatto salvo naturalmente il criterio della continuità dei controlli microbiologici, sierologici e clinici dei soggetti presenti?

Quali sono, secondo il Prof. Pascucci gli indici di mortalità embrionale conseguenti all'inoculazione di antibiotici in uova di tacchino ed imputabili alle manualità del trattamento eseguito prima dell'inoculazione. Inoltre, vorrei conoscere quali sono i valori accettabili e quale la tecnica da preferire.

L. Sidoli

Penso di essermi espresso energicamente contro l'applicazione programmata dei trattamenti antibiotici preventivi eseguiti nei confronti di forme morbose che si « ritengono » legate a particolari momenti del ciclo di allevamento del suino, poiché ciò rappresenta a mio parere un comodo ma falso e pericoloso strumento che l'allevatore è invogliato ad utilizzare senza misura e per sua tranquillità. Ricordo ancora che la tecnologia aviaria ci ha indicato i limiti di questa pratica. L'accettare o, peggio, divulgare e consigliare l'uso della chemioprofilassi standardizzata equivarrebbe a spegnere lo stimolo alla ricerca di altri presidi meno pericolosi degli antibiotici.

S. Pascucci

Sulle uova, l'influenza del trattamento antibiotico è irrilevante. Alcuni parlano del 5% di flessione nella schiusa o del 5-10% quando viene applicato lo shock termico. Tale svantaggio risulta però largamente compensato dall'esito del trattamento. In altri termini la percentuale di schiusa è influenzata negativamente più da *Mycoplasma meleagridis* che dal trattamento antibiotico.

A. Giulioni

Sulla tecnica di trattamento?

S. Pascucci

Di norma, si lasciano le uova a 37°C e si immergono quindi a 4°C in una soluzione di Tilosina (dipping). L'inoculazione viene invece effettuata nell'albume attraverso il polo stretto dell'uovo.

C. Rossi

Vorrei conoscere da Pascucci alcuni dati relativi alla tossicità degli antibiotici a seconda della specie diversa, in quanto un prodotto innocuo per una specie può risultare tossico per un'altra; oppure alla tossicità legata alla via di somministrazione, come ad esempio per la neomicina nei polli. Talvolta le Case produttrici indicano la posologia (grammi/quintale) ma non accennano alle controindicazioni.

L. Nardelli

A completamento della domanda del Prof. Rossi vorrei chiedere se per ogni antibiotico si conosca il dosaggio massimo. Ad esempio, in Francia hanno tentato la terapia della brucellosi con tetraciclina ma, in un episodio, sono venuti a morte 10 capi su 20 trattati. Domando dunque se la letteratura fornisce i dosaggi massimi d'impiego degli antibiotici.

M. Venturoli

Penso che a questa domanda potrebbero rispondere Girardi o Carli.

C. Girardi

Non sono in grado di fornire una risposta esauriente. Ho fatto l'esempio della tilosina che, nel tacchino, può provocare quadri tossici ed anche mortali. Per mia opinione posso dire che, nei volatili ed anche per via parenterale, la gamma dei dosaggi possibili sia molto ampia. Ad esempio, l'ampicillina è suggerita in dose di 20-25 mg/kg ma qualcuno ha usato anche dosi pari a 60 mg/kg senza effetti non desiderati. In generale si può dire che esistono antibiotici dotati di tossicità selettiva elevata, come beta-lattamine e penicilline, per le quali praticamente non esiste una DL_{50}. Nella mia relazione sono ripor-

tati riferimenti precisi che indicano rischi di tossicità a livello nervoso e cardiaco. Nella letteratura sono certamente descritte le DL_{50}.

S. Carli

A quanto diceva Girardi c'è da aggiungere che mancano anche dati sulla mortalità nei grossi animali, bovini o equini, essendo la DL_{50} determinata sugli animali di laboratorio. Per mia esperienza posso dire che la Gentamicina usata nel vitello alla dose di 300 mg/kg e oltre provoca disturbi anche gravi ma non la morte degli animali. È tuttavia chiara l'impossibilità di valutare la DL_{50} nel vitello.

S. Pascucci

Vorrei aggiungere soltanto che il volatile possiede dei meccanismi di difesa forse legati alla rapida eliminazione degli antibiotici. Sappiamo infatti, almeno per alcuni di essi, che l'eliminazione è quattro volte più rapida rispetto ai mammiferi come avviene per le ampicilline.

G.C. Schito

Vorrei congratularmi con Sidoli, Pascucci e Prati per l'impostazione che hanno dato alle loro relazioni nelle quali si osserva un orientamento in linea con gli accertamenti di laboratorio. In realtà, nella pratica, la somministrazione di antibiotici può essere effettuata all'inizio secondo criteri di massima ma successivamente essa deve essere guidata secondo le indicazioni del laboratorio.

Qualche domanda più specifica vorrei porla al Prof. Pascucci e riguarda i dati da lui riferiti sulla resistenza. Sono stati in qualche modo tipizzati sierologicamente i ceppi di *E. coli?*

In caso contrario è possibile che alcuni di essi si ripetano e quindi le percentuali indicate siano soggette a revisione.

S. Pascucci

Non sono state fatte tipizzazioni sistematiche ma abbiamo constatato che la colisetticemia respiratoria nel tacchino è sostenuta dal sierotipo 078 nell'80-90% dei casi e che nel pollo ' sierotipi 02 e 078 comprendono più del 50% dei ceppi isolati.

G.C. Schito

In pratica si potrebbe quindi trattare di ceppi analoghi. Sarebbe possibile la tipizzazione fagica o quella sierologica per l'individuazione di gruppi omogenei.

S. Pascucci

Noi non facciamo tipizzazione fagica.

G.C. Schito

Al Prof. Venturoli vorrei chiedere qualche informazione in più sulle infezioni croniche. Ho sentito dire che in questi casi i germi assumono una latenza metabolica il che complica :1 trattamento delle infezioni croniche rispetto a quelle acute.

Inoltre vorrei commentare brevemente i concetti del sinergismo. Quelli riferiti sono stati riportati da Jawetz ma, per quanto concerne la patologia umana, sono ampiamente dibattuti e dibattibili e forse anche in fase di evoluzione. Ad esempio, se si seguono i concetti di Jawetz alla lettera la terapia delle meningiti si basa su un controsenso in quanto, nel lattante, nel bambino e nell'adulto, la terapía è costituita da una associazione di Cloramfenicolo e Ampicillina. In realtà, quando c'è infiammazione, Ampicillina e Cloramfenicolo penetrano insieme e molto rapidamente mentre, quando l'infiammazione regredisce, penetra e continua ad agire solo il Cloramfenicolo. *In vitro,* qualcuno potrebbe affermare che questa è un'eresia. Ciò non è vero anche perché molti sinergismi non si confermano *in vivo* salvo il caso

di alcune molecole che sono state anche citate: il cotrimossazolo, la carbenicillina con un aminoglicosidico come la gentamicina. In alcuni casi e per certe infezioni è vero che non esiste sinergismo ma, francamente, non è vero in assoluto. Apprezzo d'altra parte che sia stato sottolineato come le assocaizioni date per sinergismo a dose fissa siano completamente da sconsigliare.

M. VENTUROLI

Ho riferito le opinioni di Jawetz ricavate dai lavori del '70 e '75 sulle latenze metaboliche nelle infezioni croniche. Tale ipotesi si potrebbe però discutere ed ipotizzare che, invece della latenza metabolica, siano in gioco delle barriere che l'antibiotico deve superare.

G.C. SCHITO

Nelle infezioni croniche il germe è spesso in sede endocellulare il che richiede meccanismi di penetrazione assai diversi rispetto alle infezioni acute.

M. VENTUROLI

Direi che questo è un argomento nel quale il « probabilmente » impera.

F. SCATOZZA

Nel corso di questa discussione si è parlato di DL_{50} ed a me sembra che lo stesso antibiotico possa essere batteriostatico o battericida a seconda della concentrazione. Nel caso tipico dei Gram negativi, la batteriocidia costituisce un aspetto positivo o negativo? In altri termini è preferibile ottenere la batteriostasi o la lisi? Nel secondo caso però non si dovrebbe più parlare di tossicità intrinseca dell'antibiotico ma indotta dalla lisi batterica con assorbimento di endotossine.

M. VENTUROLI

È fuori discussione che, ad esempio nella salmonellosi, si verificano casi di mortalità a seguito della terapia. Si può al riguardo discutere se essa sia dovuta al farmaco oppure alla malattia. È certo che il fenomeno va considerato se si tiene conto che l'antibiotico può provocare lisi massiva in corso di una infiammazione nella quale la sintomatologia, specie nervosa, è legata alla elaborazione di endotossina. Non ritengo tuttavia che questo rischio sia provato.

G.C. SCHITO

Vorrei ancora sottolineare che non tutti gli antibiotici battericidi sono litici. È vero che penicillina e cefalosporine sono litiche nel loro meccanismo d'azione ma è anche vero che tutti gli aminoglicosidi, pur essendo battericidi, non svolgono un'azione di lisi. Di conseguenza il contenuto della cellula batterica non viene riversato all'esterno. Esistono però anche casi particolari come quelli degli epatitici, a riassorbimento intestinale molto alterato, in cui anche i farmaci non battericidi per azione litica provocano shock settici da Gram negativi, estremamente gravi.

F. MONTI

Ci siamo occupati di questo argomento in diverse altre occasioni ed abbiamo prospettato lo slogan che la terapia antibiotica è un male necessario. In questa ottica tale terapia dovrebbe essere valutata caso per caso. In rapporto alle diverse specie animali trattate in questa sede abbiamo riscontrato prevalentemente tre settori clinici di applicazione e precisamente: affezioni dell'apparato respiratorio, digerente e mammario. In quest'ultimo ambito si può fare un discorso a parte nel senso che il trattamento antibiotico viene attuato in presenza di una sintomatologia oggettiva, limitando le operazioni di profilassi al momento dell'asciutta e su questo punto esistono delle linee di condotta ben definite.

Dove esiste qualche difficoltà applicativa, essendo molto largo

l'uso degli antibiotici, è nel settore delle malattie respiratorie ed enteriche. La mia esperienza si riferisce ai giovani bovini e riguarda l'esigenza di fronteggiare negli allevamenti c.d. industriali situazioni d'emergenza in rapporto al cospicuo numero degli animali colpiti. A malattia conclamata, l'allevatore sa bene che, dovendo procedere ad una terapia, va incontro a notevoli spese, che vengono tuttavia necessariamente affrontate per limitare i danni. Ne consegue che per evitare questi inconvenienti bisognerebbe attuare la tecnologia di allevamento in modo tale da ridurre al minimo le richieste di intervento attraverso l'attuazione di una profilassi ambientale. Vale a dire controllo di tutti i fattori che possono condizionare l'insorgenza di queste malattie: dalla umidità, alla ventilazione, al microclima, alla carica microbica ambientale, dalle accurate disinfezioni alle vaccinazioni mirate ecc.

Un'altra considerazione, che nasce da quanto ha detto il Prof. Schito, si riferisce alla nozione dei germi opportunisti, largamente rappresentati nella patologia umana ma che certamente esistono anche in medicina veterinaria. È chiaro che la terapia antibiotica è un'arma molto potente nelle mani del veterinario, ma il suo uso indiscriminato può determinare delle situazioni gravi che forse stanno emergendo anche in medicina bovina. Quindi all'opportunità dell'intervento con antibiotici bisogna aggiungere la conoscenza dei potenziali inconvenienti.

Un'ulteriore questione riguarda l'esecuzione della terapia antibiotica in medicina veterinaria in rapporto non tanto al dosaggio quanto alla cadenza degli interventi. Ho sentito Prati prospettare l'opportunità di somministrare il Cloramfenicolo quattro volte nella giornata, vale a dire ogni sei ore « quando si può ». Bisogna però ricordare che, nell'attuazione pratica della terapia antibiotica, sugli animali « in campo », è già tanto se si riesce a fare un intervento nella giornata; ben difficilmente nella routine quotidiana veterinaria si può fare di più. In tal caso la dose che dovrebbe essere ripartita in quattro volte nella giornata, viene ad essere somministrata in una sola volta con un unico intervento. Tornano qui in campo quei concetti di terapia discontinua o intermittente, su cui ci siamo più volte soffermati in altra occasione e sui quali i pareri, anche dei medici presenti, potrebbero essere discordi.

G.C. Schito

Nella medicina umana sta emergendo la possibilità della terapia antivirale. Ora vedo che le infezioni da virus costituiscono un problema anche in veterinaria. Mi domando se si fa qualche cosa anche per le infezioni degli animali.

M. Venturoli

Il problema riguarda i costi e la disponibilità di quantitativi adeguati.

S. Pascucci

Qualcosa è forse stato fatto nel campo degli animali d'affezione.

L. Nardelli

Quello che abbiamo spostato sono i tempi di mortalità, il che in veterinaria è peggio.

M. Venturoli

Altri vogliono intervenire nella discussione? Allora chiedo al Prof. Nardelli di prendersi la responsabilità di chiudere i lavori.

L. Nardelli

Il miglior modo di chiudere è di sottolineare l'interesse generale che hanno suscitato gli argomenti trattati. Conclusioni non mi sento di trarne. Abbiamo detto che la terapia antibiotica è un'arma efficace se usata correttamente ma, in caso contrario, può determinare gravi inconvenienti. Questa è la mia conclusione sostanziale.

Anche a nome della Fondazione ringrazio tutti gli intervenuti.

Finito di stampare
da La Nuova Cartografica - Brescia
nel marzo 1981