

43. METODI BIOLOGICI DI CONTROLLO DEI MEDICAMENTI ANTIMALARICI.

La scoperta di Ehrlich e Guttman (1891), dell'efficacia terapeutica del bleu di metilene e di alcuni prodotti arsenicali che esercitavano una indubbia azione curativa sulla malaria, delineava la possibilità per la chemioterapia di scoprire nuovi e più efficaci prodotti contro la malaria.

Ma siccome le nostre conoscenze fra costituzione chimica ed attività terapeutica sono ancora oggi molto limitate, ne derivò che il chimico nella ricerca di prodotti antimalarici non poteva liberarsi da un tipo di lavoro empirico. Era quindi necessario che i microbiologi studiassero i testi necessari al saggio in serie dei prodotti che risultavano dalle quotidiane ricerche dei chimici che procedevano per tentativi in varie direzioni. Senza di ciò la chemioterapia sarebbe stata cieca e non avrebbe potuto procedere nel suo cammino.

Precedenti ricerche (Kopnaris, Marks, Sergent, Giemsa), avevano dimostrato che i prodotti che agivano contro i parassiti della malaria umana — eccettuati quelli arsenicali — agivano anche contro i parassiti della malaria aviaria, per cui fu possibile a Roehl di elaborare il suo metodo di controllo dei prodotti antimalarici, che segnò l'inizio di fruttuose ricerche nel campo della chemioterapia.

Roehl saggiò dapprima l'azione della chinina sul *P.praecox* (*relictum*). Egli inoculò per via intramuscolare parecchi canarini con questi parassiti ed osservò che apparivano nel sangue periferico 4-5 giorni dopo l'inoculazione.

Però se il canarino veniva trattato subito dopo l'inoculazione ogni giorno per sei giorni di seguito con una soluzione chininica somministrata per via gastrica mediante una piccola sonda, i parassiti apparivano dopo 10-12 giorni e qualche volta più tardi.

Roehl osservò questo ritardo nella comparsa dei parassiti usando soluzioni di chinina all'1:200-1:400 fino ad 1:800; adoperando invece soluzioni all'1:1600 i parassiti apparivano dopo il consueto periodo di incubazione di 4-5 giorni.

Partendo da queste ricerche preliminari Roehl elaborò il suo metodo che consiste nel determinare la quantità del medicamento che, somministrata per 6 giorni dopo l'inoculazione può ancora produrre un ritardo nella comparsa dei parassiti di almeno 10 giorni dall'inoculazione.

Prendendo come misura questo ritardo nel decorso dell'incubazione, si trattano i canarini inoculati con *P.praecox (relictum)* con soluzioni diverse del medicamento che si vuole studiare e si determina in quale soluzione l'efficacia cessa di manifestarsi. Contemporaneamente si stabilisce la quantità massima di medicamento tollerato dal canarino.

I canarini del peso medio di gr. 20 tollerano ancora una dose di cmc. 1 di una soluzione di cloridrato di chinina 1:200. Siccome la stessa quantità di una soluzione 1:800 è ancora efficace si dirà che *l'estensione di azione* della chinina è compresa fra queste due diluizioni.

Il rapporto fra la massima dose tollerata e la minima dose ancora attiva costituisce l'indice terapeutico per la chinina.

Medicamento	Concentrazione della dose massima tollerata	Estensione d'azione	Indice terapeutico
Cloridrato di chinina	1 : 200	1:200 a 1:800	1 : 4

Secondo Giemsa, l'indice di Roehl dà indicazioni sul margine di efficacia di un medicamento ma non sulla persistenza di questa efficacia, che non è trascurabile quando si voglia valutare il valore di un medicamento. La persistenza dell'efficacia si può desumere dalla durata dell'incubazione che però varia a seconda della dose impiegata e della velocità di eliminazione del medicamento; perciò è difficile desumere un criterio comparativo.

Pertanto la ricerca dell'indice di Roehl rimane il metodo classico per ricerche in serie dell'azione di un medicamento sui plasmodi malarici durante il ciclo vegetativo (asessuato).

CONTROLLO DELL'AZIONE DEI MEDICAMENTI SUI PLASMODI DURANTE IL CICLO VEGETATIVO.

Per infettare i canarini si uccide un canarino molto infetto recidendogli il collo con forbici sterili e si raccoglie il sangue in una capsula sterilizzata contenente 10 cmc. di soluzione fisiologica. Con la miscela così ottenuta si inoculano nei muscoli toracici dei canarini da infettare cmc. 0.2.

Trattandosi di ricerche comparative occorre normalmente usare sempre lo stesso ceppo di parassita poichè la resistenza ai medicamenti può variare da ceppo a ceppo della stessa specie.

A partire dal quinto giorno dall'inoculazione si esaminerà il sangue dei canarini trattati e dei controlli, mediante strisci di sangue ottenuti pungendo la vena ascellare.

Si esaminano di regola 20 campi per ogni preparato ed i risultati, riferiti a 20 campi, possono essere riassunti secondo lo schema seguente:

— Negativo; + 1-10 parassiti; + + 10-20 parassiti;
+ + + più di un parassita per campo.

La scoperta del *P.gallinaceum* (Brumpt, 1935), ha messo a nostra disposizione un altro plasmodio che in qualche circostanza può facilitare il controllo dell'attività terapeutica dei prodotti antimalarici.

Il *P.gallinaceum* può essere trasmesso ai polli di 4-6 mesi inoculando nei muscoli pettorali cmc. 0.2 di sangue, prelevato dalla vena ascellare di un pollo infetto, oppure mediante la puntura di *Aedes albopictus* che è un buon vettore di questo parassita.

Si può, come si procede per il *P.praecox* (*relictum*), inoculare i polli con una sospensione di sporozoi che si prepara in siero di sangue di pollo normale.

Il decorso dell'infezione varia a seconda dell'età dei polli, della via di inoculazione ed a seconda che si proceda all'inoculazione con sporozoi o con sangue proveniente da altro pollo infetto.

Come è noto i parassiti della malaria aviaria (*P.elongatum*, *P.gallinaceum*, *P.praecox* (*relictum*), *P.circumflexum*, *P.cathemerium*), possono svilupparsi nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale dove naturalmente si presentano senza pigmento. Questa fase di sviluppo è stata denominata da James *exo-eritrocitica* in controposto alla fase *eritrocitica* conosciuta.

Nel *P.gallinaceum* lo sviluppo *exo-eritrocitico* prevale nella prima settimana, dalla comparsa dei parassiti nel sangue periferico, nei polli inoculati con sporozoi, mentre prevale nella terza e quarta settimana nei polli inoculati con sangue.

Noi consideriamo lo sviluppo *exo-eritrocitico* dei parassiti della malaria aviaria come un relitto di un carattere primitivo anteriore alla differen-

ziazione di un intero gruppo di specie affini, che non è necessario per il mantenimento della specie.

Sperimentando con i prodotti antimalarici noti (*chinina*, *atebrin*, *plasmochina* e *certuna*), non abbiamo notato una manifesta azione terapeutica sui parassiti appartenenti al ciclo *exo-eritrocitico*, mentre agiscono sulla fase *eritrocitica* del parassita nel modo conosciuto per il *P.praecox* (*relictum*).

Si potrà pertanto ricorrere con successo al controllo dell'azione terapeutica dei medicamenti antimalarici sul *P.gallinaceum* nei polli inoculati con sangue infetto ed osservare lo sviluppo dei parassiti eritrocitici nelle due settimane successive alla inoculazione.

Siccome nei polli inoculati con sangue infetto l'incubazione è di circa 5-6 giorni noi diremo che un medicamento agisce sul *P.gallinaceum* se, somministrato per 6 giorni consecutivi, prolunga l'incubazione oltre 12 giorni dall'inoculazione.

Noi abbiamo controllato di recente alcuni medicamenti contemporaneamente nelle scimmie infette con *P.knowlesi*, nell'uomo infetto con *P.vivax* e nei polli infetti con *P.gallinaceum* (ciclo eritrocitico), giungendo a risultati concordi.

Ignoriamo finora se il ciclo *exo-eritrocitico* potrà essere utilizzato per saggiare medicamenti che abbiano azione terapeutica su qualche stadio di sviluppo dei parassiti della malaria umana.

Riproduco la tavola in cui sono disegnati i vari stadi di sviluppo del *P.gallinaceum*, eseguita da Giovannola che ha compiuto importanti ricerche in questo Istituto. (Tav. I).

CONTROLLO DEL POTERE GAMETICIDA.

Gualdi e Martirano (1900), dimostrarono che la chinina, così efficace contro le forme asessuate dei plasmodi della malaria, non aveva nessuna efficacia sui gametociti del *P.immaculatum*. Successivamente i fratelli Sergeant (1906), dimostrarono che la chinina non ha azione sui parassiti appartenenti al genere *Haemoproteus*, per cui fin dal 1908 si saggiò l'efficacia dei medicamenti anche su questo parassita.

Per la forma dei gametociti questi parassiti vennero denominati anche *Halteridium* col quale nome vengono generalmente indicati.

Il ciclo vegetativo (asessuato) dell'*Halteridium* ha luogo nelle cellule endoteliali del polmone, del fegato e di altri organi interni, mentre i

gametociti si sviluppano nei globuli rossi e quindi compaiono nel sangue periferico.

Durante i mesi estivo-autunnali si riscontrano in tutti i nostri passerii i gametociti di alteridio in quantità più o meno grande, per cui in questo periodo di tempo è possibile procedere al controllo del potere gameticida dei prodotti antimalarici su questi uccelli. Ma da gennaio a giugno, per un periodo di sei mesi, la comparsa dei gametociti di alteridio nel sangue periferico dei passerii diviene rara e saltuaria; è quindi necessario ricorrere ad altra specie di uccelli in cui i gametociti di alteridio siano presenti con maggiore costanza.

Viene allora usato l'*Huemoproteus oryzivorae*, che si riscontra costantemente nei fringuelli di Giava o di altri paesi dell'India.

Sia che si usi i passerii od i fringuelli di Giava, occorre determinare per 4 giorni il numero dei gametociti presenti nel sangue periferico riferito a 100 globuli rossi. Nel numerare i gametociti si tiene conto dello stadio di sviluppo: piccoli, medi, grandi. Si somministra quindi il medicamento con le stesse modalità usate nei canarini infetti da *P.praecox* (*relictum*) e si osserva ogni giorno se i gametociti diminuiscono o scompaiono; l'esame verrà protrato per dieci giorni dall'inizio del trattamento.

CONTROLLO DELL'AZIONE DEI MEDICAMENTI SUGLI SPOROZOITI.

Con i procedimenti che si descrivono si tende a vedere se un dato medicamento ha le proprietà di attaccare gli sporozoiti appena inoculati.

Ove fosse possibile trovare un medicamento dotato di simili proprietà si renderebbe possibile la profilassi causale della malaria, cioè la distruzione del parassita che è causa della malaria nell'uomo.

Per questo controllo si somministra il medicamento per via orale ad una serie di canarini — come di consueto — per 6 giorni di seguito. Il giorno seguente alla prima somministrazione del medicamento si inoculano i canarini per via endomuscolare con una sospensione di sporozoiti ottenuti mescolando ghiandole salivari infette da *P.praecox* (*relictum*) con siero di canarino normale.

Per la preparazione del siero si tagliano dapprima le penne del collo del canarino e dopo aver disinfettata la parte con alcool, si recide la testa con forbici sottili sterili. Si raccoglie il sangue in una capsula sterilizzata,

si versa in una provetta e si colloca in ghiacciaia finchè si osserva la separazione del siero che sarà poi facilitata dalla centrifugazione. Con 5 canarini si ottiene poco più di 1 cmc. di siero in cui vengono emulsionate 20 ghan-dole di *Culex* infette con *P.praecox (relictum)*. Questa sospensione viene diluita con 3 cmc. di soluzione fisiologica e quindi viene inoculata nei muscoli toracici dei canarini nella quantità di cmc. 0.2.

CONTROLLO BIOLOGICO SUI PARASSITI DELLA MALARIA NELLE SCIMMIE.

La scoperta del *P.knowlesi* (1932), ha aumentato le possibilità di una più esatta valutazione dell'efficacia dei medicinali antimalarici.

Il *Macacus rhesus* è particolarmente recettivo a questa specie parassitaria e senza nessun intervento terapeutico muore al primo attacco acuto che si manifesta di regola 6-8 giorni dopo l'inoculazione sottocutanea. Siccome il ciclo di sviluppo di questo parassita si svolge in 24 ore, ne deriva che in pochi giorni gran parte dei globuli rossi sono invasi. Noi procediamo alla somministrazione del medicamento quando si riscontrano il 10-20 % di globuli rossi parassitati e consideriamo come dose curativa quella quantità di medicamento che somministrata una volta sola previene l'attacco mortale e produce la scomparsa dei parassiti dal sangue periferico entro 3 giorni dalla somministrazione.

Col metodo di Roehl, noi determiniamo l'indice che esprime l'estensione d'azione dei medicinali, cioè il rapporto che intercede fra la massima dose tollerata e la minima dose *ancora attiva*.

Invece il nostro metodo di controllo sulle scimmie ci permette di dedurre l'indice terapeutico nel senso di Ehrlich, cioè il rapporto fra la dose massima tollerata e la *dose curativa*.

Per procedere a questo controllo si inoculano per via endomuscolare due scimmie per ogni diluizione del medicamento che si vuole controllare, più due scimmie per controllo. Si fa l'inoculazione per via endomuscolare con mezzo cmc. di sangue, diluito con soluzione di citrato di sodio, prelevato da un'altra scimmia infetta che presenti almeno un parassita per ogni campo microscopico. A partire dal quarto giorno dopo l'inoculazione si esamina ogni mattina il sangue di tutte le scimmie inoculate e quando si riscontra il numero indicato di parassiti — 10-20 % di globuli rossi parassitati — si procede al trattamento. Il medicamento si sommi-

nistra al mattino, appena conosciuti i risultati dell'esame del sangue, poichè nel pomeriggio si inizia la sporulazione ed aumenta il numero dei globuli rossi parassitati.

Per procedere al controllo dei medicinali antimalarici sul *P.knowlesi* nelle scimmie si terrà presente: 1) i medicinali antimalarici agiscono in modo diverso nei diversi stadi di sviluppo dei plasmodi; 2) i medicinali agiscono in modo crescente col progredire dello sviluppo dei parassiti nei globuli rossi; 3) le forme più sensibili ai medicinali sono quelle in cui si inizia la scissione della cromatina; 4) compiuta la suddivisione della cromatina e cominciate le trasformazioni che caratterizzano il processo di sporulazione, i medicinali spiegano una minore efficacia (²).

L'azione dei medicinali antimalarici sul *P.knowlesi* si potrà dedurre anche dalle mo-

dificazioni morfologiche che presentano i parassiti. Somministrando la chinina nella dose di 20 cg. per via intramuscolare al *Macacus rhesus*, sperimentalmente infetto con *P.knowlesi*, si osserva già nelle prime 12 ore che i parassiti si presentano sotto forma di corpi ameboidi dalle forme più svariate, ciò che si nota eccezionalmente prima del trattamento.

Nelle scimmie trattate con *atebrina* si osservano notevoli alterazioni del citoplasma, che appare rarefatto, vacuolizzato, a contorni irregolari. Il nucleo appare scolorito, il pigmento qualche volta è riunito in un solo ammasso.

Affinchè il ricercatore possa avere una guida nell'esame delle alterazioni morfologiche del *P.knowlesi* sottoposto al trattamento curativo, riproduco una tavola che riassume le ricerche del Dott. Mosna (³), eseguite in questo Istituto, sulla azione della chinina e dell'*atebrina* sul *P.knowlesi*. (Tav. II).

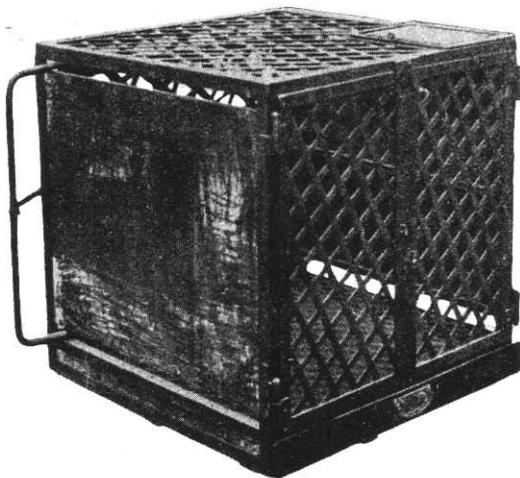


FIG. 1.

TRATTAMENTO DELLE SCIMMIE E PRELEVAMENTO DEL SANGUE.

A cagione della vivacità e della forza di questi animali occorre valersi di mezzi idonei per poter procedere alle operazioni necessarie senza molestia o danno per il personale. Si consiglia quindi di mantenere



FIG. 2.

queste scimmie in speciali gabbie che hanno una parete interna addossata alla parete posteriore facilmente spostabile in avanti, in modo che, quando si vuole, si possa immobilizzare l'animale tra la parete anteriore a questa parete spostabile (fig. 1).
Una sola preparatrice può così facilmente prelevare il sangue più volte al giorno per l'esame dei parassiti pungendo il lobulo dell'orecchio della scimmia senza che sia necessario di portarla fuori dalla gabbia.
Per la somministrazione dei preparati è necessario portare la scimmia fuori dalla gabbia; occorre allora avere l'accortezza di immobilizzare le zampe. La maniera più facile per immobilizzare una scimmia è di tenere con la mano destra i due arti superiori dell'animale dietro la schiena di questo e con la mano sinistra gli arti inferiori, come mostra la fig. 2. Un altro preparatore avvicina alla bocca della scimmia un piccolo bastoncino di legno, che l'animale morde immediatamente. Si ha allora cura di mantenerlo tra i denti della scimmia in modo da lasciare aperta la bocca. Si può introdurre quindi il medicamento da sperimentare con un semplice contagocce ma in questo modo non si è sicuri sull'esatta quantità che viene deglutita dall'animale. E più opportuno che il bastoncino che si mantiene tra i denti della

scimmia sia forato al centro, ed attraverso questo foro, si passa una sonda gastrica montata su una siringa che contiene il farmaco da provare.

Durante l'esperimento le scimmie debbono essere nutrite in modo uniforme. Ciascun giorno si può somministrare della frutta fresca (banane, mele), e delle zuppe di riso e pane.

Il passaggio del *P.knowlesi* da una scimmia all'altra per la conservazione del ceppo si effettua prelevando per mezzo di una siringa un cmc. di una soluzione di citrato di sodio, 4 cmc. di sangue dalla vena femorale di una scimmia infetta ed inoculando cmc. 0,5 di questa diluizione alle nuove scimmie per via endomuscolare.

POTERE TOSSICO.

L'esame della tossicità si può praticare sui canarini, sui ratti, sulle cavie e sulle scimmie.

Noi ci serviamo comunemente dei canarini e, quando un medicamento deve essere successivamente saggiato sull'uomo, si procede prima alla ricerca della tossicità sulle scimmie, poichè la tolleranza alle varie sostanze tossiche varia nelle diverse classi di animali e alle volte fra le varie specie appartenenti allo stesso genere.

Con questi procedimenti noi tendiamo a stabilire sui canarini la massima dose tollerata, che è necessario conoscere per stabilire l'indice terapeutico.

Alcuni preferiscono stabilire la minima dose letale considerando che nella determinazione della massima dose tollerata i fattori soggettivi possono essere causa di errore.

Nella ricerca degli indici terapeutici è preferibile conoscere la massima dose tollerata e ridurre la causa d'errore suddetto, estendendo la ricerca su molti canarini. D'altro canto per stabilire la massima dose tollerata occorre arrivare alla minima dose letale e perciò ciascuno può valersi di un dato o dell'altro.

Di regola si somministra il medicamento per via orale con la sonda gastrica. Occorre però tener presente che malgrado tutte le precauzioni il canarino può rigettare una piccola quantità di liquido.

Per quanto riguarda il metodo dell'iniezione sottocutanea o intramuscolare, si consideri che il medicamento può fissarsi nei tessuti ed il lento assorbimento può indurci in errore nella valutazione della tossicità.

Praticamente il controllo si esegue somministrando a gruppi di almeno due canarini diverse soluzioni del medicamento in esame per 6 giorni di seguito.

E' raccomandabile di usare soluzioni tali da poter somministrare la quantità voluta di medicamento in un mezzo cmc.

Durante il trattamento i canarini verranno quotidianamente osservati e si terrà conto dell'aspetto dei canarini subito dopo il trattamento e dopo



FIG. 3.

Giemsa ha costruito un piccolo apparecchio che serve a fissare il canarino in modo che l'operazione possa essere compiuta da un solo preparatore. (Fig. 4).

VALUTAZIONE DEI RISULTATI.

Ci viene richiesto molte volte se i risultati da noi conseguiti studiando l'efficacia terapeutica dei medicinali sui parassiti della malaria aviaria o delle scimmie, si possono riferire all'uomo.

qualche giorno, soprattutto del variare del peso: il canarino può divenire molto magro, può presentarsi con le piume arruffate, può apparire traballante, manifestare delle convulsioni e morire.

La somministrazione dei medicinali per via gastrica si effettua con un sottile catetere, montato su di una siringa da cmc. 1 che s'introduce attraverso l'esofago del canarino fino allo stomaco. Un preparatore tiene fermo il canarino in modo che il collo sia teso, mentre un altro divarica colle pinze il becco ed introduce il catetere. (Fig. 3).

Basterà ricordare che uno stesso medicamento non ha la stessa efficacia verso le tre specie di parassiti che determinano la malaria umana per intuire che le nostre ricerche sui parassiti della malaria aviaria hanno un'importanza che deve essere opportunamente valutata. Le ricerche compiute finora sull'azione terapeutica dei prodotti antimalarici negli animali e

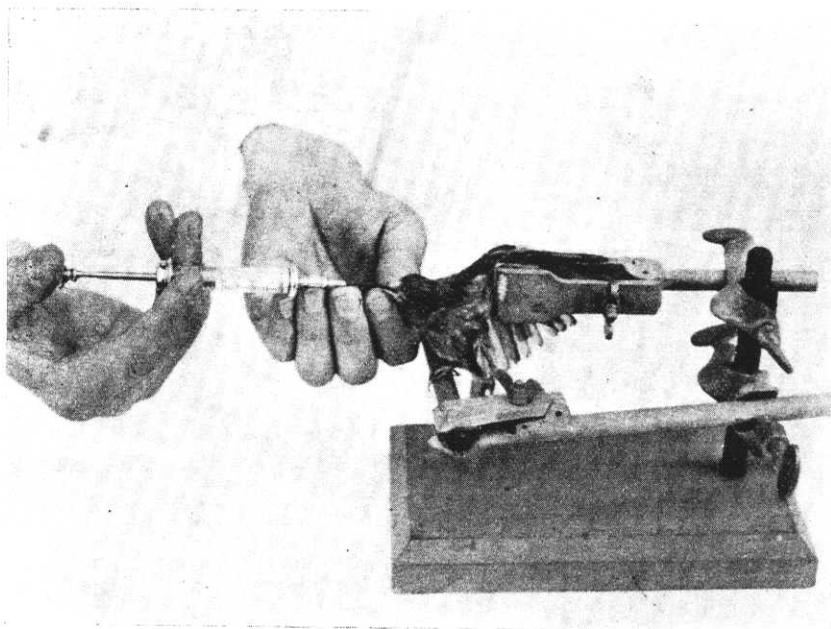


FIG. 4.

nell'uomo, hanno dimostrato una concordanza di risultati che ci consente di dedurre un giudizio approssimativo sui medicamenti in esame.

In tal modo noi possiamo rapidamente eliminare tutti i medicamenti che non dimostrano un'azione terapeutica e procedere ad ulteriori ricerche nelle scimmie e nell'uomo per quei medicamenti che le ricerche sulla malaria aviaria rivelò efficaci.

Questi metodi di controllo hanno quindi un'importanza considerevole poichè ci consentono una rapida *analisi qualitativa* delle proprietà terapeutiche di un medicamento.

CONTROLLO BIOLOGICO DEI MEDICAMENTI NELLA MALARIA UMANA.

Naturalmente il controllo biologico dei medicinali nella malaria umana è quello che ci permette il più sicuro giudizio.

Dobbiamo però tenere presente che i medicinali finora conosciuti non presentano la stessa efficacia contro il *P.vivax*, il *P.malariae* ed il *P.immaculatum*, per cui le conclusioni delle nostre ricerche si riferiscono alla specie parassitaria sottoposta all'azione del medicamento. Occorre inoltre considerare che i medicinali conosciuti agiscono in modo differente nei differenti stadi di sviluppo dello stesso parassita. Così la chinina agisce contro gli schizonti del *P.immaculatum* ma non contro i gametociti ed a sua volta la *certuna* agisce contro i gametociti di *P.immaculatum* ma possiede scarsa azione sugli schizonti, e agisce solo per 24 ore sui gametociti di *P.vivax*.

Si consideri inoltre che ogni specie parassitaria comprende più varietà che presentano un diverso grado di resistenza ai medicinali.

Dovendo quindi controllare un medicamento, si indicherà a quale specie ed a quale varietà appartiene il ceppo usato. Si consideri inoltre che l'infezione malarica eccita le reazioni protettive dell'organismo che acquista un vario grado di immunità a seconda delle specie parassitarie e della durata dell'infezione. Per cui mentre nel trattamento del primo attacco dobbiamo fare assegnamento solo sui medicinali antimalarici, invece nelle recidive, all'azione dei medicinali si aggiunge l'azione protettiva acquisita dall'organismo.

Ne deriva così che l'azione della chinina è completamente differente quando venga somministrata al principio, a metà, o negli ultimi giorni di una serie di attacchi febbrili. Non è poi possibile effettuare il controllo dei medicinali sulle febbri recidive, poichè spesso guariscono senza alcun trattamento e si potrebbe ascrivere all'azione del medicamento ciò che è un semplice prodotto dell'immunità acquisita.

E' difficile poter precisare nei malati che provengono da zone malariche quando comparve il primo attacco ed il numero degli attacchi suc-

cessivi perciò è impossibile poter fare ricerche comparative ed esatte su questi gruppi di malati.

Solo dopo l'introduzione della malarioterapia è stato possibile studiare l'efficacia terapeutica dei medicamenti in codizioni ben controllate; naturalmente in questo caso cercheremo di avvicinarci alle condizioni naturali, provocando l'infezione per mezzo della puntura di zanzare infette.

Il controllo dei medicamenti antimalarici nella malaria umana può essere praticato allo scopo di determinare: *a*) se il preparato è dotato di proprietà contro gli sporozoit; *b*) l'efficacia del medicamento nella cura degli attacchi febbrili; *c*) l'azione del medicamento sui gametociti.

Per determinare se il medicamento è dotato di proprietà contro gli sporozoit si somministra la dose voluta per sei giorni di seguito ad un gruppo di almeno due paralitici. Nel secondo giorno in cui viene somministrato il medicamento, si applicherà un ugual numero di zanzare su i due paralitici trattati e su altri due paralitici che saranno tenuti per controllo senza alcun trattamento. Poichè un medicamento che possiede un'azione contro gli sporozoit, deve agire nelle più gravi condizioni naturali di endemicità, ne deriva che i paralitici in esame dovranno essere punti da un gruppo di almeno dieci zanzare. Si tenga presente che il medicamento può prolungare l'incubazione di molti mesi quando si tratta di infezioni da *P.vivax*, per cui non è consentito un giudizio che dopo un anno di osservazione.

DETERMINAZIONE DELL'EFFICACIA DI UN MEDICAMENTO NEL TRATTAMENTO DELL'ATTACCO FEBBRILE.

Noi sappiamo che somministrando 30 cgc. di chinina fra il terzo ed il quarto attacco febbrile di un'infezione primitiva da *P.vivax* si ottiene l'interruzione momentanea degli attacchi febbrili e la scomparsa temporanea dei parassiti dal sangue periferico.

Dovendo saggiare un medicamento non conosciuto si cerca di trovare la dose che provochi lo stesso effetto di gr. 0.3 di chinina. Se non si potrà ricorrere al trattamento della malaria indotta a scopo terapeutico si potrà ricorrere al trattamento di malati che contrassero l'infezione naturalmente.

Noi siamo consapevoli delle difficoltà di organizzare ricerche terapeutiche nella malaria naturale; si potrà ridurre l'errore, derivante dall'ignoranza sullo stato immunitario dell'individuo, scegliendo gruppi di età omogenei ed abbastanza vasti, non inferiori a 50 individui, in modo da consentire un giudizio comparativo abbastanza esatto con l'efficacia terapeutica della chinina.

CONTROLLO DELL'AZIONE DEI MEDICAMENTI SUI GAMETOTICI.

Considerando che i gametociti di *P.immaculatum* sono resistenti alla chinina, noi abbiamo preso come misura l'azione del medicamento contro i gametociti di questa specie di plasmodi.

Dapprima si cercava la dose minima necessaria per far scomparire i gametociti di *P.immaculatum* dal sangue periferico. Successivamente si vide che un medicamento poteva sterilizzare i gametociti di *P.immaculatum* e renderli così inabili alla fecondazione, pur rimanendo vitali in cospicua quantità nel sangue periferico. Perciò il controllo dell'attività di un medicamento contro i gametociti comprende:

a) esame del sangue per controllare il numero e la vitalità dei gametociti;

b) applicazione di gruppi di almeno 50 anofeli sui pazienti prima del trattamento e per sei giorni consecutivi.

Con queste ricerche noi cerchiamo di stabilire la dose minima che somministrata una volta sola è capace di sterilizzare i gametociti di *P.immaculatum* e per quanto tempo dura l'azione del medicamento. Per esempio cg. 6 di *certuna* sterilizzano i gametociti di *P.immaculatum* per sei giorni di seguito; invece la stessa dose di *certuna* sterilizza i gametociti di *P.vivax* per sole 24 ore.

Di regola noi esaminiamo a fresco ogni giorno il sangue dei pazienti prima e dopo il trattamento per osservare se i microgametociti continuano o no a flagellare. Spesso si osserva che i gametociti si arrotondano ma non flagellano; ciò è un primo indizio dell'azione del medicamento. Qualche volta abbiamo osservato assenza di flagellazione, mentre invece si sviluppò l'infezione negli anofeli che punsero il paziente nello stesso momento in

cui venne osservato il sangue. Ciò dipende dal fatto che non tutti i gametociti subiscono l'azione del medicamento nello stesso tempo ed in modo uniforme, e, a cagione della piccola quantità di sangue che noi esaminiamo, ci sfugge l'osservazione di qualche microgametocito dotato ancora della facoltà di produrre gameti.

Le ricerche suddette eseguite da noi su vari medicamenti hanno condotto a precisarne l'azione e le dosi con esattezza che veniva sempre confermata dal controllo nel campo pratico eseguito su vasta scala.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Malariologia.

BIBLIOGRAFIA

(¹) ROEHL V., « Die Wirkung des Plasmochins auf die Vogel malaria », Beih. zum Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., 30, 3, 11 (1926).

(²) DE SANT'ANA QUEIROZ J., « Sull'azione dei medicamenti nelle varie fasi di sviluppo dei parassiti malarici », Riv. di Parassitol., 2, 1, 13 (1938).

(³) MOSNA E., « L'azione della chinina e dell'atebrina sul *Plasmodium knowlesi* », Riv. di Malariol., 15, 1, 2 (1936).