

Studio sistematico di leptospire saprofite isolate in Brasile

IRENE SILVA (*)

Laboratori di Microbiologia

Riassunto. — Undici ceppi di leptospire acquicole isolati in Brasile dall'FA., sono stati studiati dal punto di vista sistematico. I ceppi sono stati confrontati tra di loro e con i ceppi di referenza di tutti i serotipi finora descritti nel « complesso biflexa », mediante prove di agglutinazione crociata e di adsorbimento delle agglutinine.

Sono stati classificati undici serotipi appartenenti a nove serogruppi. Cinque serogruppi e dieci serotipi sono di nuova costituzione.

Summary (*Systematic study of saprophytic leptospirae isolated in Brazil*). Eleven leptospira strains isolated from fresh water by the A., in Brazil, were studied with both the cross-agglutination and the antibody-absorption tests. They were compared among themselves as well as with all serotypes described up to date in the « biflexa complex ».

The strains were classified in nine serogroups, five of which are new, and in ten new serotypes. Only one strain belongs to an already known serotype.

In questi ultimi anni sono state effettuate numerose ricerche riguardanti la classificazione sierologica delle leptospire saprofite. Un notevole impulso a queste ricerche è stato dato da BABUDIERI & ARCHETTI (1948); BABUDIERI (1952, 1961, 1969); BABUDIERI & DYMOWSKA (1961); CASTELLANI PASTORIS *et al.* (1970); IVANOV & BABUDIERI (1971); NARDELLI & BABUDIERI (1972); CINCO & PETELIN (1970); CINCO & FAIDUTTI (1972). Questi AA. hanno potuto confermare che il complesso delle leptospire saprofite può essere suddiviso in serogruppi e serotipi, come è stato fatto per le leptospire patogene. Tali ricerche presentano un'importanza teorica e pratica, e la migliore conoscenza della costituzione antigenica di questi microorganismi potrà essere di notevole aiuto per il chiarimento di numerosi problemi ancora controversi.

(*) Borsista dei Laboratori di Microbiologia.

Scopo del presente lavoro è lo studio sistematico di alcuni ceppi di leptospire isolati da acque di superficie in Brasile.

Le prime notizie sull'isolamento di leptospire saprofiti in Brasile sono di DE ARAUJO (1930), che ha isolato due ceppi a Bahia. Ventidue anni dopo, BABUDIERY (1952) isolò il ceppo São Paulo dalle acque di questa città. Da allora, per quanto risulta, non vi sono nella letteratura altre citazioni in merito.

MATERIALI E METODI

I ceppi studiati sono stati isolati dall'A. nel 1969 da acque di superficie (corsi d'acqua, laghi, sorgenti) nelle zone urbane e suburbane della città di Salvador (Bahia).

L'isolamento è stato effettuato seminando 3 ml dei campioni d'acqua in terreno di ZUELZER (1923) ed incubando alla temperatura di 32°C. L'osservazione al paraboloide è stata eseguita ogni quattro giorni e protratta per quaranta giorni. Dalle colture risultate positive, sono stati prelevati 3-4 ml, diluiti con pari quantità di terreno base di Korthof e centrifugati a bassa velocità (3000 g/min) per 10 minuti. Il supernatante è stato filtrato per filtri Millipore di 0,45 μ e il filtrato seminato in piastre Petri contenenti terreno di COX & LARSON (1957). In questa maniera, è stato possibile isolare undici ceppi di leptospire, che sono stati indicati con i nomi dei luoghi di isolamento: Lucaia, Piatan, Jequitiaia, Canela, Pirajá, Abaeté, Garcia, Ondina, Nazaré, Sobradinho, e Tororó.

I ceppi sono stati mantenuti in terreno di Korthof modificato da BABUDIERY (1961).

Per controllare la purezza dei ceppi, prima di iniziare lo studio sistematico di questi, è stato eseguito un discreto numero di passaggi culturali secondo i suggerimenti di BABUDIERY (1968). È stato anche accertato il loro comportamento in terreni alla 8-azoguanina (JOHNSON & ROGERS, 1964; FAGIOLO, 1969) e al bicarbonato di sodio (MAZZONELLI & CASTELLANI, 1968); il risultato è stato quello tipico delle leptospire saprofiti, con crescita abbondante e rapida.

Con ogni ceppo sono stati preparati sieri immuni nel coniglio. Lo studio sistematico dei ceppi è stato eseguito per mezzo di prove di agglutinazione crociata, cimentando i ceppi tra loro e con quelli di riferimento appartenenti a tutti i serotipi di leptospire in dotazione alla collezione del « WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory in Rome » (BABUDIERY, 1972). I ceppi con affinità antigeniche sono stati sottoposti alle prove di adsorbimento crociato. Gli adsorbimenti sono stati eseguiti in ogni caso 2-3 volte; talvolta anche 4-5. Queste prove sono state eseguite secondo le raccomandazioni del « WHO/FAO Leptospira Study Group » (WHO/FAO, 1959; WHO, 1967).

TABELLA 1

SIERI (Titoli)	CEPPI																
	1 - Lucania	2 - Piatan	3 - Jequitia	4 - Canela	40 - Bulgaria 6	41 - Fons	42 - Friuli 44	43 - Friuli 48	44 - AM 8	45 - Bifera CDC	46 - Parsatan	47 - M. Besemans	48 - Nomentano	49 - Ancona Porto	50 - Dindio	51 - No 184	52 - Kasachstanika 2
1 - 50.000	100	20	<1	<1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0
2 - 10.000	5	100	<1	<1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 - 50.000	<1	0	100	100	50	10	0	0	0	0	0	0	0	<1	0	0	0
4 - 50.000	1	0	20	100	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 - 10.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	<1	0	0	<1	0	0	0
6 - 50.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 - 100.000	0	<1	<1	<1	0	0	0	0	0	<1	0	0	0	0	0	0	0
8 - 50.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<1	2	0	0	0	0	0	0
9 - 100.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0
42 - 50.000	0	0	0	0													
43 - 50.000	0	0	<1	0													
44 - 50.000	0	0	0	0													
45 - 5.000	0	0	0	0													
46 - 10.000	0	0	<1	<1													
47 - 50.000	0	0	0	0													
48 - 10.000	0	5	0	0													
49 - 50.000	0	0	0	0													
50 - 10.000	0	0	0	0													
51 - 100.000	0	<1	0	0													
52 - 10.000	0	0	0	0													
53 - Muggia 10.000	0	0	0	0													

I risultati sono riportati in percentuali, consideri
 Con il ceppo Muggia è stata fatta la prova solita:

TABELLA 2

Prove di adsorbimento crociato delle agglutinine

Antisiero	Adsorbito con	Provato con i ceppi	
		Canela	Jequitaiá
Canela	Jequitaiá	10	0
Jequitaiá	Canela	0	10
Canela	Tororó	40	0
Tororó	Canela	0	40
Canela	Bulgaria 6	40	0
Bulgaria 6	Canela	0	40
Canela	Fons	20	0
Fons	Canela	0	20
Jequitaiá	Fons	20	0
Fons	Jequitaiá	0	40
Pirajá	Biflexa CDC	0	0
Biflexa CDC	Pirajá	0	80
Nazaré	N. 184	0	0
N. 184	Nazaré	0	2,5
Piatan	Lucaia	40	0
Lucaia	Piatan	0	80
Lucaia	Waz Holland	40	0
Waz Holland	Lucaia	0	40

I risultati sono espressi in percentuali, considerando = 100 il titolo del siero immune non adsorbito per ceppo omologo.

RISULTATI

Le prove di agglutinazione crociata (Tab. 1) dimostrano che tra i ceppi studiati pochi presentano tra loro affinità antigenica. Soltanto i ceppi Jequitaiia e Canela presentano un'evidente affinità, mentre il ceppo Tororó presenta una debole relazione con il primo e una affinità accentuata, però unidirezionale, con il secondo. Tra i ceppi Lucaia e Piatan esiste una relazione antigenica, sebbene non notevole. Gli altri ceppi, o non dimostrano alcuna affinità antigenica, o tale affinità è troppo scarsa per essere presa in considerazione. Le prove eseguite con l'ausilio dei ceppi standard di riferimento, stabiliscono, per 6 ceppi in esame, la loro appartenenza a serogruppi noti. I ceppi Canela e Jequitaiia sono risultati appartenere al serogruppo Pulpudeva; il ceppo Pirajá al serogruppo Codice; il ceppo Nazaré al serogruppo Kazackstanika I; i ceppi Lucaia e Piatan al serogruppo Holland. Per i restanti 5 ceppi, Abaeté, Garcia, Ondina, Sobradinho e Tororó, invece, è stato necessario creare dei nuovi serogruppi, non mostrando questi ceppi relazioni evidenti con nessuno dei ceppi standard appartenenti ai serotipi noti.

I risultati delle prove di adsorbimento crociato (Tab. 2), hanno permesso di giungere ad una sistematica dei ceppi a livello di serotipi. Si può notare che unicamente il ceppo Nazaré appartiene ad un serotipo noto, il kazackstanika I; gli altri ceppi costituiscono altrettanti nuovi serotipi.

Per concludere, si propone per i ceppi studiati la classificazione esposta nella Tab. 3.

TABELLA 3

Classificazione proposta per i ceppi studiati

Serogruppo	Serotipo	Ceppo
Holland	lucaia *	Lucaia
	piatan *	Piatan
Pulpudeva	jequitaiia *	Jequitaiia
	canela *	Canela
Codice	pirajá *	Pirajá
Abaeté *	abaeté *	Abaeté
Garcia *	garcia *	Garcia
Ondina *	ondina *	Ondina
Kazackstanika I	kazackstanika I	Nazaré
Sobradinho *	sobradinho *	Sobradinho
Tororó *	tororó *	Tororó

I serogruppi e serotipi nuovi sono contrassegnati con *

Questa ricerca conferma quanto precedentemente accennato e ribadito da vari AA. (BABUDIERI, 1952, 1969; IVANOV & BABUDIERI, 1971; NARDELLI & BABUDIERI, 1972; CINCO & PETELIN, 1970; CINCO & FAIDUTTI, 1972), e cioè la validità dello studio sistematico delle leptospire saprofitie in base agli stessi criteri seguiti per le leptospire parassite, e la possibilità di isolare ceppi appartenenti allo stesso serotipo in località notevolmente distanti; sarebbe questo il caso del ceppo Nazaré e del ceppo N. 184 isolato in Kazackstan (U.S.S.R.) nel 1940 da Krepkogorskaya.

Tranne quella sul ceppo São Paulo, isolato e studiato da BABUDIERI (1952, 1961), la presente ricerca di sistematica riguardante leptospire saprofitie, è l'unica che sia stata eseguita su ceppi isolati in località brasiliane.

Ricevuto l'11 luglio, 1974.

Accettato il 6 novembre, 1974.

BIBLIOGRAFIA

- BABUDIERI, B., 1952. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **12**, 93.
 BABUDIERI, B., 1961. *Atti XI Congr. Soc. Ital. Microbiol.*
 BABUDIERI, B., 1961. *Bull. W.H.O.*, **24**, 45.
 BABUDIERI, B., 1968. *Bull. W.H.O.*, **39**, 939.
 BABUDIERI, B., 1969. *Arch. Inst. Razi*, **21**, 17.
 BABUDIERI, B., 1972. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **8**, 159.
 BABUDIERI, B. & I. ARGHETTI, 1948. *Ann. Pasteur*, **75**, 552.
 BABUDIERI, B. & Z. DYMOWSKA, 1961. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. I*, **182**, 129.
 CASTELLANI-PASTORIS, M., B. BABUDIERI & E. POLSTER, 1970. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **6**, 270.
 CINCO, M. & N. PETELIN, 1970. *Trop. Geogr. Med.*, **22**, 237.
 CINCO, M. & M. FAIDUTTI, 1972. *Experientia*, **28**, 598.
 COX, C. D., & A. D. LARSON, 1957. *J. Bacteriol.*, **73**, 587.
 DE ARAUJO, E., 1930. *Brasil Med.*, **44**, 1384.
 FAGIOLO, F., 1969. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Università degli Studi di Roma.
 IVANOV, I., B. BABUDIERI, 1971. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **7**, 91.
 JOHNSON, R. C. & P. ROGERS, 1964. *J. Bacteriol.*, **88**, 1618.
 MAZZONELLI, J. & M. CASTELLANI, 1968. *Veterinaria*, **4**, 1.
 NARDELLI, M. G. & B. BABUDIERI, 1972. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **8**, 114.
 WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses, 1959. *WHO. Techn. Rep. Ser.*, N. 169.
 WHO Expert Group on Current Problems in Leptospirosis Research, 1967. *WHO Techn. Rep. Ser.*, N. 380.
 ZUELZER, M., 1923. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. I*, **89**, 171.

**Alfa-carbossibenzil-penicillina bisodica (carbenicillina):
attività antimicrobica su stipiti di *Pseudomonas aeruginosa***

ANGELO NOTARRIGO e ANNA MARIA PATTI

Istituto di Igiene, Università di Catania

Riassunto. — È stata saggiata l'attività antimicrobica dell'alfa-carbossibenzil-penicillina bisodica (carbenicillina) su 45 stipiti di *Ps. aeruginosa*, 30 dei quali isolati nel corso di analisi batteriologiche e 15 appartenenti alla collezione internazionale. Le concentrazioni minime inibenti della carbenicillina sono state paragonate a quelle di gentamicina, colimicina, polimixina B. Anche se la concentrazione minima inibente della carbenicillina è in genere superiore a quella di colimicina e gentamicina questo antibiotico è da preferirsi perché privo di potere tossico anche se somministrato in dosi massicce.

Summary (*Disodium α -carboxybenzylpenicillin (carbenicillin): the antimicrobial activity against strains of *Pseudomonas aeruginosa**). — The activity of a new semisynthetic penicillin, disodium α -carboxybenzylpenicillin (carbenicillin) was determined against 45 strains of *Pseudomonas aeruginosa*. 30 strains of organism used in this study were obtained from cultures of patient specimens; 15 strains were obtained from international collection (Institut Pasteur, Paris).

The minimum inhibitory concentration (M.I.C.) was determined by two methods: 1) the method of serial dilutions of carbenicillin made with the broth; 2) the method of small papers with carbenicillin on Petri's disques.

The results were compared with the activity of polimixin B, colistin sulfate and gentamicin sulfate.

La penicillina è costituita da una miscela di diversi principi attivi che hanno in comune la struttura dell'acido 6-amino penicillanico ma che differiscono per la catena laterale acilica.

È possibile, modificando la composizione del terreno di coltura in cui si sviluppa il micete produttore di penicillina e particolarmente aggiungendo ad esso vari donatori di acili, ottenere tipi diversi di penicillina, provvisti di particolari caratteristiche. Se nel mezzo colturale mancano donatori della catena laterale acilica, il micete non produce penicillina ma un suo precursore, l'acido 6-amino-penicillanico.

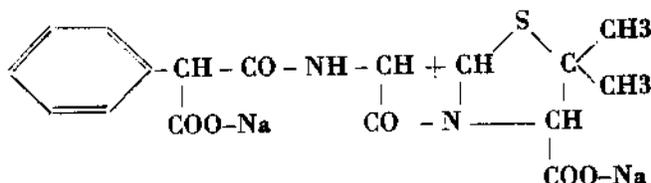
Questa scoperta, avvenuta nel 1960, ha aperto la strada alla produzione delle cosiddette penicilline semisintetiche. Infatti l'acido 6-amino-penicillanico può essere complessato, con procedimenti chimici, con numerosi acidi che non possono essere incorporati per biosintesi. Il numero delle penicilline semisintetiche è quindi teoricamente illimitato.

L'azione antibiotica della penicillina e dei suoi derivati si esplica a livello della sintesi dei materiali necessari per la produzione dello strato mucopolipeptidico della parete batterica, perciò la penicillina è inattiva sui germi in stato di riposo ed è invece battericida su quelli in fase di attiva proliferazione. Anche le penicilline semisintetiche agiscono con lo stesso meccanismo biologico a livello della parete cellulare dei batteri sensibili ed inoltre hanno un più ampio spettro batterico.

Fra le nuove penicilline semisintetiche recentemente è stata studiata la carbenicillina il cui nome chimico è alfa-carbossibenzil-penicillina bisodica. Questo composto ha uno spettro d'azione ampio sia verso i Gram negativi che verso quelli positivi. La carbenicillina è infatti attiva verso Streptococchi piogeni, Pneumococchi e Stafilococchi penicillinasi-negativi. Tra i Gram negativi il composto risulta attivo verso *E. coli*, *Salmonelle*, *Shigelle*, *Proteus mirabilis* ed *Haemofilus influenzae*.

Il vantaggio più importante di questo composto è l'azione inibente verso germi particolarmente resistenti agli antibiotici, quali i *Proteus* e soprattutto *Pseudomonas aeruginosa*. Sarebbe questa la prima penicillina attiva verso il *B. piociano*.

La formula di struttura è la seguente:



Il composto è facilmente solubile in acqua, dando una chiara soluzione neutra che anche dopo 24 ore a temperatura ambiente non mostra significativa diminuzione dell'attività ed è stabile in congelatore per almeno

7 giorni. In soluzione acida la carbenicillina è relativamente instabile: a pH 2 la sua attività si dimezza entro due ore a temperatura ambiente e in circa 30' a 37°C.

Come abbiamo già accennato, la sua prerogativa più importante è quella di essere uno dei pochissimi antibiotici attivi verso *Ps. aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa o B. piociano è com'è più comunemente chiamato, fu isolato per la prima volta da Gessart nel 1882 dal « pus blu ». È un germe largamente diffuso in natura e generalmente viene considerato un saprofito piuttosto che un vero patogeno; tuttavia, in particolari condizioni può essere responsabile di forme patologiche varie, determinando anche gravi infezioni che di solito si manifestano con maggiore frequenza in pazienti con ustioni estese o sottoposti ad indagini urologiche o affetti da leucemia.

Le infezioni da B. piociano rivestono un notevole interesse clinico in quanto questo germe è sensibile ad un numero limitato di antibiotici e sempre con maggiore frequenza si riscontrano ceppi resistenti anche a questi.

L'evoluzione della resistenza agli antibiotici dimostrata dal *Ps. aeruginosa* è stata studiata da Lutz in Francia. Questo Autore ha potuto osservare come gli antibiotici più efficaci siano la polimixina B e la colimicina, seguite dalla neomicina; il potere battericida della tetraciclina è scarso mentre del tutto inattiva è la penicillina, i cui derivati dimostrano invece una certa attività. Più o meno questo quadro sulla resistenza del piociano ai chemioterapici è comune anche in altri paesi.

Polimixina B, colimicina, gentamicina sono gli unici ancora attivi, ma c'è da tenere presente che sono anche estremamente tossici e debbono essere somministrati in dosi basse. Si può perciò comprendere l'interesse suscitato da questi nuovi prodotti sintetizzati in laboratorio, come la carbenicillina, completamente atossica.

ACRED & BROWN (1967) hanno riportato come la carbenicillina non presenti tossicità acuta in seguito a somministrazione per via sottocutanea, intramuscolare ed endovenosa a ratti e topi anche se somministrata per lunghi periodi di tempo.

Per quello che riguarda il piociano una ricchissima letteratura ha messo in evidenza come questo nuovo antibiotico sia attivo su tutti i batteri Gram negativi e soprattutto sullo *Ps. aeruginosa*.

BODEY & TERREL (1967) hanno saggiato la carbenicillina su 143 ceppi di *Ps. aeruginosa* e per 99 di essi la concentrazione minima inibente è risultata compresa fra 200 e 300 µg/ml.

HERREL (1968) in un suo studio comparativo sull'effettiva validità della terapia antibiotica sul B. piociano riferisce che la carbenicillina di-

mostra una maggiore attività rispetto alla colimicina, gentamicina e polimixina B nella terapia delle infezioni da *B. piociano*.

LOWBURG (1967) riconoscendo la difficoltà del trattamento antibiotico delle infezioni da *B. piociano* ha sperimentato su animali ustionati l'efficacia dell'applicazione locale di nitrato d'argento, gentamicina e carbenicillina come terapia profilattica. La carbenicillina si è dimostrata attiva nel proteggere tutti i topi ustionati da infezioni setticemiche.

In vitro le concentrazioni minime inibenti (C.M.I.) della carbenicillina per i 200 ceppi di *Ps. aeruginosa* saggiati sono oscillate tra i 32 e 128 $\mu\text{g/ml}$. Come si può quindi notare, l'azione antibiotica della carbenicillina si dimostra indubbiamente interessante nella terapia delle infezioni cliniche da *B. piociano*.

Data la frequenza con cui anche da noi vengono isolati ceppi di *Ps. aeruginosa*, soprattutto da pazienti con infezioni urologiche, ci è sembrato opportuno eseguire uno studio sulla sensibilità del *B. piociano* a questo nuovo antibiotico, paragonandolo a quelli finora più usati cioè: gentamicina, colimicina, polimixina B.

MATERIALI E METODI

Ceppi usati.

Sono stati saggiati 45 stipiti di *Ps. aeruginosa*, 30 dei quali di recente isolamento e provenienti sia da infezioni umane delle vie urinarie sia da lesioni corneali (Tab. 1); gli altri 15 ceppi appartengono alla collezione internazionale e ci sono stati gentilmente forniti dall'Istituto Pasteur di Parigi; sono siglati da 0:1 a 0:15 con il numero del gruppo antigenico a cui appartengono.

Per i ceppi isolati nel corso di indagini batteriologiche venivano eseguite prove biochimico-metaboliche. Tutti i ceppi possedevano un pigmento, producevano acido dal glucosio, erano indolo-negativi e possedevano una ossidasi e una catalasi. È stata anche accertata la produzione di vari enzimi extracellulari quali emolisine, proteasi, lecitinasi.

Per saggiare *in vitro* l'attività della carbenicillina (il prodotto in polvere ci è stato fornito dalla Farmitalia) sono stati usati due metodi.

Metodo della diluizione in provetta.

Venivano eseguite diluizioni scalari di antibiotico in tubi di brodo in modo da ottenere concentrazioni di carbenicillina pari a 200 μg , 150 μg , 100 μg , 50 μg per ml di brodo. Il brodo veniva insemato con 0,1 ml della brodocoltura di 18 h in esame, diluita in modo da contenere 10^8 germi per ml.

Brodocolture di controllo venivano allestite con le stesse modalità ma senza antibiotico.

La concentrazione minima inibente (C.M.I.) veniva determinata dopo 20 h di incubazione a 37°C.

TABELLA I

Provenienza di 30 stipti di *Pseudomonas aeruginosa* saggiati con alfa-carbossibenzil-penicillina bisodica (carbenicillina)

Stipti N.	Provenienza
1	Cheratite
2	Infezione vie urinarie
3	Infezione vie urinarie
4	Cheratite
5	Infezione vie urinarie
6	Pionefrosi
7	Infezione vie urinarie
8	Infezione vie urinarie
9	Pionefrosi
10	Infezione vie urinarie
11	Infezione vie urinarie
12	Infezione vie urinarie
13	Infezione vie urinarie
14	Infezione vie urinarie
15	Infezione vie urinarie
16	Infezione vie urinarie
17	Infezione vie urinarie
18	Infezione vie urinarie
19	Infezione vie urinarie
20	Infezione vie urinarie
21	Infezione vie urinarie
22	Infezione vie urinarie
23	Infezione vie urinarie
24	Infezione vie urinarie
25	Diarrea infantile
26	Infezione vie urinarie
27	Infezione vie urinarie
28	Infezione vie urinarie
29	Diarrea infantile
30	Infezione vie urinarie

Tutti gli stipti sono stati isolati da pazienti residenti a Catania.

Metodo dei dischetti.

Dischetti di carta bibula sono stati imbibiti con soluzioni scalari di carbenicillina in modo da ottenere concentrazioni di 200 μg , 100 μg , 50 μg per dischetto. L'antibiotico veniva diluito in acqua distillata sterile e calcolato in modo da ottenere tali quantità nel volume di 0,02 ml. I dischetti con tali concentrazioni venivano poi posti su piastre di agar su cui erano stati distribuiti 0,2 cc delle brodoculture di 18 h diluite a 10^{-2} , dei vari ceppi in esame.

Contemporaneamente sono stati aggiunti ad ogni piastra di Petri dischi di gentamicina con 25 μg , colimicina con 10 μg e polimixina B con 300 μg - 100 μg . Tali antibiogrammi sono stati ad incubare per 24 h a 37°C.

RISULTATI

Metodo della diluizione.

La C.M.I. veniva determinata dopo 20 h di incubazione a 37°C. Si poteva chiaramente osservare che per la maggior parte dei ceppi la C.M.I. risultava essere 100 μg , in quanto a questa concentrazione non si aveva sviluppo microbico.

I ceppi appartenenti alla collezione internazionale si dimostravano estremamente sensibili anche alle basse concentrazioni di carbenicillina; infatti, l'ultima provetta che presentava intorbidamento dopo 20 h di incubazione a 37°C era quella contenente 25 μg di carbenicillina.

La C.M.I. era quindi per questi ceppi di 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Gli stipiti di recente isolamento da infezioni umane erano più resistenti. Infatti, fino alla concentrazione di 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ si aveva un normale intorbidamento del brodo. Alla concentrazione di 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ invece non si osservava più crescita, fatta eccezione per i ceppi 9, 14, 15.

Tranne che per questi ultimi, la C.M.I. era pertanto 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mentre per i ceppi 9, 14, 15 la C.M.I. era di 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Il ceppo 4 e il ceppo 21 si dimostravano invece totalmente resistenti anche alle concentrazioni di 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, infatti si sviluppavano normalmente a tutte le concentrazioni dell'antibiotico con produzione di pellicola e di abbondante pigmento.

Metodo dei dischetti.

Le piastre di agar triptosio su cui erano aggiunti dischetti imbibiti con concentrazioni diverse della sostanza in esame, dopo 24 h di incubazione davano i seguenti risultati.

Attorno ai dischetti contenenti 200 μg di carbenicillina l'alone di inibizione risultava evidente per tutti i ceppi tranne il 4 e il 21. Attorno ai dischetti con 100 μg si aveva anche un discreto alone di inibizione ma già i ceppi resistenti salivano a 6. A 50 μg di carbenicillina i ceppi resistenti erano 17 e nessun alone raggiungeva i 20 mm di diametro.

L'alone attorno ai dischetti contenenti 100 μg di carbenicillina era paragonabile a quello ottenuto con i dischetti di gentamicina con 25 μg e colimicina con 10 μg e notevolmente superiore a quelli ottenuti con polymixina B con 300 e con 100 μg .

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tab. 2.

CONCLUSIONI

L'attività della carbenicillina verso lo *Ps. aeruginosa* risulta pertanto piuttosto elevata soprattutto se confrontata con altri antibiotici, però la sua C.M.I. è notevolmente superiore a quella della gentamicina con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e colimicina con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tuttavia, dal punto di vista terapeutico i vantaggi sono notevoli dato che la carbenicillina è priva di effetti tossici e quindi questo farmaco può essere somministrato a dosaggi sufficienti a raggiungere il livello serico necessario a inibire il germe. Il farmaco viene poi escreto in alte concentrazioni dal rene.

L'impiego della carbenicillina offre delle particolarità favorevoli rispetto alla colimicina e alla gentamicina che risultano, non a caso, limitatamente utilizzate oggi perché caratterizzate da notevole azione nefrotossica se adoperate a dosaggi elevati.

La carbenicillina risolve, almeno per il momento, il problema della terapia antibiotica per il *B. piociano* dimostratosi resistente a cefaloridina, meticillina, penicillina, ampicillina, nalixina, cloranfenicolo, nitrofurantoina e sulfamidici.

Già Richmond e coll. del Dipartimento di Batteriologia della Università di Bristol in Inghilterra hanno isolato alcuni ceppi di *B. piociano* resistenti alla carbenicillina, resistenza dovuta all'enzima β -lattaminasi, specifico e sintetizzato dal germe sotto il controllo genetico del fattore R. Questo enzima, una volta che il fattore R viene trasferito a *E. coli*, conferisce a questo ultimo un alto grado di resistenza a tutte le penicilline. Il fattore R di resistenza alla carbenicillina nel *B. piociano* è stato messo in evidenza finora soltanto in due laboratori, uno presso l'Accident Hospital di Birmingham e l'altro presso l'Università di Glasgow. Non è da escludere che con il tempo si avrà una notevole selezione di ceppi resistenti anche a quest'ultimo antibiotico che per il momento sembra risolvere il problema della terapia delle infezioni da *B. piociano*.

TABELLA 2

Concentrazioni minime inibenti (C.M.I.) della carbenicillina determinate con il metodo dei dischetti in piastre di agar tripticoso su 45 stipti di *Pseudomonas aeruginosa*, e paragonate a quelle di gentamicina, colimicina e polimixina B

ANTIBIOTICO	Concentrazione	GRANDEZZA DELL'ALONE DI INIBIZIONE					TOTALE
		+++	++	+	—		
Carbenicillina	200 µg	* 21 (46,66%)	22 (48,11%)	—	2 (4,4%)	45	
Carbenicillina	100 µg	9 (20%)	30 (66,66%)	1 (2,22%)	5 (11,11%)	45	
Carbenicillina	50 µg	—	11 (24,44%)	17 (37,77%)	17 (37,77%)	45	
Gentamicina	25 µg	4 (8,11%)	28 (62,22%)	5 (11,11%)	8 (17,77%)	45	
Colimicina	10 µg	7 (15,55%)	35 (77,77%)	—	3 (6,66%)	45	
Polimixina B	300 µg	—	21 (46,66%)	18 (40%)	6 (63,33%)	45	
Polimixina B	100 µg	—	1 (2,22%)	21 (46,66%)	23 (51,11%)	45	

+++ = alone da 30 — 21 mm.

++ = alone da 20 — 11 mm.

+ = alone da 10 — 7 mm.

— = nessun alone di inibizione.

* n. di stipti presentanti l'alone di inibizione.

Il problema della multiresistenza offerto da questo germe non è pertanto risolto ma si è fatto soltanto un passo avanti verso ulteriori e più fruttuose ricerche.

Ricevuto il 22 luglio 1974.

Accettato il 25 settembre 1974.

BIBLIOGRAFIA

- ACRED, P. & D. M. BROWN, 1967. *Proc. V. Int. Congr. Chemother.*, Vienna, 273.
- BODEY, G. P. & L. M. TERREL, 1967. In vitro activities of Carbenicillin against *Pseudomonas pyocyanea.* *Lancet*, ii, 1289.
- HERREL, W. E., 1968. *Clin. Med.*, 75, 53.