

3. Italo ARCHETTI. — L'azione della penicillina in vitro sulle leptospire.

Riassunto. — L'A. espone i risultati ottenuti studiando l'azione in vitro della penicillina su 15 ceppi di leptospire patogene, appartenenti a diversi tipi serologici e su 6 ceppi di leptospire acquicole.

Nell'ambito di uno stesso tipo si possono avere variazioni molto grandi, tali da giustificare anche l'insuccesso terapeutico, se condotto secondo le norme correnti.

La sensibilità alla penicillina dei ceppi acquicoli è generalmente di parecchio inferiore rispetto a quella dei ceppi patogeni.

Résumé. — L'A. expose les résultats obtenus en étudiant l'action in vitro de la pénicilline sur 15 souches de leptospire pathogènes, appartenant à divers types sérologiques, et sur 6 souches de leptospires aquicoles.

La sensibilité à la pénicilline des souches pathogènes n'est pas toujours la même, mais elle varie d'une souche à l'autre, bien que ce ne soit pas, en général, dans une mesure remarquable.

Dans les souches d'un même type sérologique on peut avoir des variations très grandes, de façon à justifier même un insuccès thérapeutique, si l'on s'est conformé à la conduite ordinaire du traitement.

La sensibilité à la pénicilline des souches aquicoles est, en général, notablement inférieure à celle des souches pathogènes.

Summary. — The A. reports the results obtained in investigating the action in vitro of penicillin on 15 strains of pathogenic *Leptospira*, belonging to different serological types, and on 6 strains of *Leptospira* aquicola.

The sensitiveness of pathogenic strains to penicillin is not always the same, but varies with the different strains, though generally to no great extent.

In strains of one and the same serological type very considerable variations may occur, so as to account even for a therapeutic failure, if the customary rules of treatment were adhered to.

The penicillin sensitiveness of aquicolous strains is generally somewhat inferior to that of pathogenic strains.

Zusammenfassung. — Der Verfasser legt die Ergebnisse dar, die er beim Studium der Wirkung in vitro des Penicillins auf 15 Stämme pathogener Leptospiren verschiedener serologischer Typen und auf 6 Stämme Wasserleptospiren erhalten hat.

Die Sensibilität der pathogenen Stämme gegen Penicillin ist nicht immer die selbe, sie ändert sich, bei den verschiedenen Stämmen, wenn auch im allgemeinen in unbedeutender Weise.

In ein und demselben Typus kann man sehr grosse Verschiedenheiten wahrnehmen, so dass auch ein therapeutischer Misserfolg gerechtfertigt sein kann, wenn nach den üblichen Regeln vorgegangen wurde.

Die Sensibilität der Wasserstämme gegen Penicillin ist im allgemeinen viel geringer als jene der pathogenen Stämme.

Inizialmente si riteneva [Abraham e coll. (1)] che le leptospire fossero insensibili alla penicillina: purtroppo il ceppo Jackson del tipo *L.ictero-haemorrhagiae*, usato dagli AA. e che si sarebbe dimostrato penicillino-resistente, è andato perduto.

Ormai è noto come la penicillina abbia un'azione antibiotica, che si manifesta sia in vivo come in vitro, sulle leptospire patogene.

Però non sempre gli effetti terapeutici del farmaco sono ugualmente buoni e gli AA. attribuiscono per lo più i risultati sfavorevoli ad un troppo tardivo intervento, quando ormai soprattutto le lesioni renali sono tali da non permettere un ripristino della funzione definitivamente lesa.

La possibilità che la diversa efficacia della cura penicillinica possa essere dovuta ad una diversa sensibilità all'antibiotico da parte del ceppo in causa, mi ha indotto ad eseguire in vitro alcune esperienze che potessero essere almeno di orientamento nell'interpretazione dei casi clinici curati.

Quando iniziai il mio lavoro, nella letteratura a me nota esisteva uno studio di Alston e Broom (2), che si erano occupati dell'argomento sperimentando l'azione della penicillina in vitro e nelle cavie infettate allo

(1) E. P. ABRAHAM e coll., Further observations on Penicillin, Lancet, 177-180 (1941).

(2) J. M. ALSTON e J. C. BROOM, The action of penicillin on leptospira and leptospiral infections in guinea-pigs, Brit. Med. J., 718-719 (1944).

scopo: gli AA. inglesi usarono 8 ceppi di *L.ictero-haemorrhagiae* (6 isolati da casi umani, 2 isolati da ratti) e 1 ceppo di *L.canicola* e concludono che l'aggiunta di 0,4 UO a 3,5 cm³ di terreno di coltura, seminato con una quantità di 0,25 cm³ di coltura abbondante, inibisce completamente la crescita di tutti i ceppi, mentre con concentrazioni minori di penicillina si ha una certa diversità nella sensibilità dei vari ceppi usati.

La penicillina, aggiunta nella concentrazione di 15 UO per 10 cm³ di coltura abbondante, non avrebbe apparentemente alcun effetto ed in quantità maggiori alle 40 UO si continuerebbero ad osservare leptospire viventi anche dopo 3 settimane a 24°.

Solo ora, a lavoro terminato, ho potuto consultare una pubblicazione di Petersen e Schmidt (³), i quali hanno condotto le medesime ricerche degli AA. inglesi, con più grande numero di ceppi e con maggiore precisione di dati, giungendo a questi risultati: i 17 ceppi studiati (di cui 12 di *L.ictero-haemorrhagiae*, 1 di *L.canicola*, 2 di *L.sejroe*, 2 di *L.saxkøbing*) sono sensibili alla penicillina e si ha completa inibizione alla loro crescita con una concentrazione di 0,25 p. D. U. (unità danese provvisoria che equivale a circa 1 1/3 UO) per cm³, ottenuta aggiungendo la penicillina a 3 cm³ di terreno Korthof, seminato con circa 3 milioni di leptospire per cm³ e tenuto ad una temperatura di 30°.

Una più alta concentrazione di penicillina sarebbe necessaria per ottenere lo stesso effetto in colture vecchie e abbondanti.

La sensibilità dei diversi ceppi alla penicillina sembrò essere quasi uguale, senza riguardo ai tipi serologici. Gli AA. scrivono che è possibile che ceppi isolati di recente siano generalmente un poco più resistenti dei ceppi vecchi.

Questi i dati veramente interessanti esistenti nella già abbastanza ricca letteratura sull'azione della penicillina e le leptospire patogene.

Ho condotto le mie ricerche in questo modo: dopo alcune prime prove di orientamento sull'azione della penicillina (penicillina americana della ditta Squibb e penicillina bruta prodotta nel nostro Istituto) in colture abbondanti, ricerche che mi comprovarono l'azione prevalentemente batteriostatica dell'antibiotico, aggiungevo quantità scalari di penicillina,

(³) B. PETERSEN e M. R. SCHMIDT, Effect of Penicillin on leptospirae in vitro and leptospirosis in guinea-pigs, Acta path. et microbiol. Scandin., 22, 462-474 (1945).

titolata in UO con il metodo proposto da Babudieri* (⁴), ad 1 cm³ di terreno Korthof. Seminavo il terreno con penicillina ed il controllo senza penicillina con 3 gocce di coltura abbondante — tenevo le provette in esame a 30° e dopo sette giorni esaminavo al paraboloide onde segnare i risultati.

Ho studiato la sensibilità alla penicillina dei seguenti 14 ceppi di leptospire patogene, cercando di sceglierli appartenenti ai diversi tipi serologici:

2 *L.ictero-haemorrhagiae* (Zaan, Bianchi I, isolate entrambe dall'uomo); 1 *L.canicola* (Alarik); 1 *L.gryppo-typhosa* (Moskau V); 1 *Autumnalis A* (Reitano); 1 *Autumnalis B* (Hebdomadis H); 2 *L.sejroe* (M 84, M 101); 1 *L.pyrogenes* (Rachmat); 1 *L.bataviae* var. *oryzeti* (Pavia I); 1 *L.australis A* (Baltico); 1 *L.australis B* (Zanoni); 2 *L.pomona* (Mezzano I); 1 *L.javanica* (Veldrat 46) ed inoltre di 6 ceppi di leptospire acquicole di varia provenienza (Wa Z, Vinzent, Parapatan, Aurisina, Nomentano, A M 6).

Prima di riportare i singoli risultati, accennerò brevemente ad alcune osservazioni che ho potuto fare nel corso delle molteplici prove eseguite ripetutamente per ogni ceppo, onde accertare con la maggiore precisione possibile i dati ricercati.

Innanzitutto l'efficacia della penicillina purificata e della penicillina bruta si equivalgono, così che adoperai quasi sempre la nostra penicillina.

L'azione della penicillina è frequentemente nettissima ad una certa concentrazione, per cui si passa quasi improvvisamente da colture abbondanti a colture con relativamente pochi elementi vivi: si direbbe che la soglia di inibizione del farmaco abbia un valore molto preciso per cui al di sotto di questo i microrganismi non risentono della presenza dell'antibiotico, mentre oltre di esso l'azione è chiara ed evidente; è meno netto invece il passaggio da questa soglia al valore di inibizione assoluta.

Non sempre, ma abbastanza spesso, mi è sembrato di notare che la penicillina in concentrazioni molto basse, abbia una certa qual azione

(⁴) B. BABUDIERI, Controllo di attività dei preparati di penicillina, Ann. d'Igiene, 56, 289-297 (1946).

probiotica, che si rileva dalla maggiore abbondanza della coltura rispetto a quella del controllo.

Quando l'azione antibiotica della penicillina è prossima alla inibizione completa, l'esame al paraboloide può anche essere negativo e allora eseguivo delle subcolture in terreno normale onde accertare la presenza di leptospire viventi, considerando come valori di inibizione assoluta solamente quelli in cui le subcolture risultavano negative.

Espongo in una tabella i dati ottenuti, ponendo nella prima colonna i valori di concentrazione della penicillina che permettono ancora un abbondante sviluppo delle colture; mentre nella seconda sono i valori della concentrazione che inibisce completamente la vita delle leptospire.

Ceppi studiati	Quantità di penicillina per cc, con la quale il ceppo cresce ancora bene	Quantità di penicillina per cc, che inibisce completamente lo sviluppo delle leptospire
Zaan	0,003	0,015
Bianchi I	0,002	0,015
Alarik	0,006	0,05
Moskau V	0,025	0,04
Reitano	0,006	0,008 .
Hebdomadis H	0,014	0,1
M 84	0,5	1,6
M 101	0,004	0,016
Rachmat. . . .	0,003	0,03
Pavia I	0,006	0,013
Baltico	0,02-0,03	0,06
Zanoni	0,015-0,03	0,13
Mezzano I	0,014	0,042
Veldrat 46	0,014-0,035	0,046
Wa Z	0,3	0,54
Vinzent	0,003	0,012
Parapatan	0,14	0,3
Aurisina. . . .	0,2	0,3
Nomentano	0,01	0,12
A M 6	0,13	0,25

Un semplice sguardo ai valori riportati nella tabella, è sufficiente per rilevare i risultati che esporrò succintamente.

Vari ceppi di leptospire patogene, anche appartenendo a diversi tipi serologici, hanno una sensibilità uguale o quasi di fronte alla penicillina (Zaan, Bianchi I, M 101, Pavia I in un gruppo; Alarik, Moskau V, Baltico, Mezzano I, Veldrat 46 in un altro).

La sensibilità alla penicillina non è quindi sempre la stessa, ma cambia secondo i ceppi che si esaminano e se si fa eccezione per il ceppo M 84, di cui dirò subito, varia da un minimo di 0,008 UO per cm³ necessarie per

avere l'inibizione del ceppo Reitano ad un massimo di 0,13 UO per cm³ per il ceppo Zanoni.

Vi possono essere alcuni ceppi, appartenenti anche allo stesso tipo serologico, particolarmente resistenti all'azione dell'antibiotico. Così è per il ceppo M 84 del tipo Sejroe: mentre il ceppo M 101 non presenta nulla di eccezionale rispetto agli altri, il ceppo M 84 è notevolmente meno sensibile alla penicillina. Infatti per ottenere l'inibizione completa allo sviluppo è necessaria una quantità di penicillina 100 volte superiore a quella che occorre per il ceppo affine M 101.

La possibilità dell'esistenza in natura di ceppi scarsamente penicillinosensibili, sarebbe confermata dalla osservazione clinica: infatti non tutti i casi di leptospirosi curati con la penicillina nel modo abituale guariscono.

E' ovvio che ciò può dipendere da altri motivi, però è anche da tenere presente la possibilità surricordata.

Per ciò che si riferisce più particolarmente ai miei risultati, ricorderò che Marini ⁽⁵⁾ riferisce un caso infausto, sostenuto da una leptospira del tipo Sejroe ed in cui la cura penicillinica non ha portato alcun giovamento.

Le leptospire acquicole sono pure sensibili alla penicillina, però in grado generalmente minore di quanto non lo siano le patogene. Anche fra i ceppi acquicoli vi è una certa diversità di comportamento di fronte all'azione della penicillina.

Ho voluto provare a rendere maggiormente resistenti alla penicillina alcuni ceppi di leptospire patogene e in parte ci sono riuscito, però solo con il ceppo Zanoni: infatti, mentre questo ceppo viene completamente inibito da 0,13 UO per cm³, ho potuto ottenere gradualmente che crescesse anche in presenza di 2,25 UO per cm³. Avrei voluto osservare il comportamento di questa penicillino-resistenza acquisita, ma il ceppo mi si è inquinato e non ho potuto continuare le osservazioni.

Per ciò che riguarda i miei risultati, rispetto a quelli ottenuti dai precedenti AA., si nota una diversità nei valori: diversità che è minore per il valore riferito da Alston e Broom (0,11 UO per cm³ inibiscono completamente tutti i ceppi studiati), maggiore per quello riportato da Petersen e Schmidt (0,33 UO per cm³ per avere l'inibizione completa). Ri-

(5) B. MARINI, La penicillina nel morbo di Weil, questi Rendiconti.

tengo però che questa differenza sia dovuta in parte ai diversi ceppi usati per lo studio, ma soprattutto ai diversi metodi di dosaggio delle unità penicilliniche.

Mentre il presente lavoro era già in corso di stampa ho letto i risultati ottenuti da Wylie J. A. H. e Vincent E. [The sensitivity of organisms of the genus *Leptospira* to penicillin and streptomycin, J. of Path. and Bacter., 59, 247-254 (1947)], i quali quasi contemporaneamente a me e presso a poco guidati dai medesimi concetti hanno condotto le loro ricerche studiando fra l'altro la sensibilità in vitro alla penicillina di 29 ceppi di leptospire patogene, appartenenti ai varii tipi. Essi osservarono che vi è una certa variazione nella sensibilità all'antibiotico fra le diverse specie, ma che in genere la maggior parte di esse viene inibita da una quantità di 0,5 UO per cm³.

Vi sono però ceppi che crescono abbastanza bene anche a concentrazioni molto più alte (10 UO per cm³), come il ceppo samarang e il ceppo di *L. ictero-haemorrhagiae* Buckland, dimostrando così una variabilità anche notevole di resistenza pure fra ceppi appartenenti allo stesso tipo.

Nella determinazione più precisa della concentrazione limite di penicillina inibente in modo completo la crescita delle leptospire di 8 ceppi diversi, gli AA. stabilirono valori che vanno da un massimo di 0,5 U O per cm³ per un ceppo del tipo *canicola*, ad un minimo di 0,05 U O per un ceppo del tipo *ictero-haemorrhagiae*. Un solo ceppo avirulento di quest'ultimo tipo (Wijnberg) non viene inibito nemmeno da 0,5 U O.

I risultati degli AA. inglesi confermano quelli da me ottenuti: solamente i valori da me ricavati sono in generale inferiori a quelli riferiti da loro.

Roma. - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di batteriologia. 18 agosto 1947.