

27. Leonardo LILLO - Franco SCANGA - La penicillina nel trattamento della difterite sperimentale nella cavia,

Se, in base ai risultati delle ricerche già eseguite dagli Autori anglo-americani, si vuole formulare un giudizio sulla sensibilità in vitro del *Corynebacterium diphtheriae* all'azione della penicillina, si può senz'altro affermare che esso si rivela molto sensibile all'attività batteriostatica dell'antibiotico. Anche noi abbiamo voluto controllare questi risultati e, adoperando terreno all'uovo tellurito secondo PERGOLA, abbiamo ottenuto con il metodo degli strisci multipli (1) una manifesta zona di inibizione, sia con penicillina bruta normale, che diluita 1:10; ciò sta appunto ad indicare una buona sensibilità del batterio in esame.

Ma, passando dalle prove in vitro a quelle in vivo, quali potranno essere i risultati, dato che il *Cor. diphtheriae* secerne una potente esotossina verso la quale è risaputo che la penicillina non esercita la benchè minima azione? Dalla scarsa letteratura che abbiamo potuto consultare sull'argomento, non risulta chiaro se e quale valore la penicillina possa avere nella terapia della difterite; comunque è da tutti ammesso che il suo uso deve essere sempre associato al siero specifico poichè essa non ha alcun effetto sulla tossemia (2).

Alcuni dati clinici sembrano dimostrare l'efficacia del trattamento penicillinico nella fase acuta della malattia. E' probabile che essa concorra validamente a diminuire la carica batterica superficiale ed i fatti infiammatori locali, sempre però in stretta associazione con il siero specifico. Qualche autore ritiene l'uso della penicillina soprattutto importante nei casi di difterite grave; ma una cosa certa è che essa non può e non deve sostituire neanche in minima parte l'antitossina specifica.

In genere è ritenuto sufficiente il seguente dosaggio (3): 15 mila U.O. per via endomuscolare ogni tre ore fino a 60.000 U.O. complessivamente. Soprattutto in caso di difterite nasale (4) e faringea è consigliato unire al trattamento generale quello locale mediante applicazione di tamponi imbevuti in una soluzione di penicillina contenente 500-1000 U.O. per cm.

Si è tentata anche la sterilizzazione dei portatori difterici mediante l'uso della penicillina, ma i risultati ottenuti non sono molto soddisfacenti (5). Su 123 casi di difterite, verificatisi fra le truppe canadesi in Italia (6), in 76, dopo tre settimane di malattia, l'esame del tampone faringeo rivelò la presenza del b. difterico. Orbene si decise di iniziare il trattamento penicillinico in una parte di questi e precisamente in 47, i cui germi si erano dimostrati sensibili alla penicillina in vitro. Ad un primo gruppo di 22 pazienti furono iniettati per via endomuscolare ogni tre ore 15.000 U.O. per un totale di 600.000 U.O. La cultura dal tampone divenne negativa subito o al massimo entro il quarto giorno, ma in alcuni casi il risultato fu solo transitorio, in quanto dopo due giorni dalla fine del trattamento fu ritrovato il B. difterico.

In base a questi risultati il secondo gruppo di 22 casi fu trattato con maggiori quantità di penicillina, cioè 25.000 U.O. ogni tre ore e per un totale di 1.200.000 U.O. I risultati furono migliori, ma gli insuccessi non mancarono (28 %).

Comunque al momento attuale può affermarsi che non è stabilito con sufficiente esattezza il reale valore della penicillina, sia nella terapia della malattia, che nella sterilizzazione dei portatori; necessitano pertanto ulteriori lavori sperimentali (7) sia di laboratorio che di clinica umana.

Abbiamo voluto pertanto controllare con prove sperimentali sugli animali se ed in qual misura la penicillina influenzasse il decorso e l'esito della malattia. Abbiamo adoperato come animale da esperimento la cavia in quanto è risaputa la sua grande sensibilità verso l'infezione difterica. E' vero che la malattia sperimentale non riproduce fedelmente l'infezione umana, ma le conclusioni che si possono dedurre, sono, in senso lato, riportabili all'uomo. Come germe, abbiamo adoperato un *Corynebacterium diphtheriae* altamente virulento e tossico (*), proveniente da una cultura di 24 ore su terreno di Ramon modificato. Per preparare la sospensione batterica usavamo un provettone contenente palline di vetro sterili e 20 cmc. di soluzione fisiologica; in esso si passavano 20 ansate di b. di Loeffler e si agitava per 5 minuti in maniera da ottenere una

(*) Ringraziamo il Prof. Babudieri e la sig.na Paesani per il ceppo offertoci.

finissima sospensione contenente un'ansata di germi per cmc. La inoculazione delle cavie veniva fatta con cmc. 0,25 (cioè con 1/4 di ansata) per via sottocutanea, nella regione alta del torace, in maniera da lasciare ampio spazio per tutte le inoculazioni successive.

1 prova. E' una ricerca preliminare che è stato necessario praticare per sapere, dopo aver inoculato tutte le cavie con cmc. 0,25 di sospensione batterica, quale fosse la massima quantità di siero capace di non proteggere gli animali e quale la quantità capace di proteggerne solo 50%.

In verità l'esperimento riprodotto nella tavola n. 1 è stato preceduto da un altro, qui non riportato, in cui le cavie furono protette con 5-10-20-30 U. I. di siero specifico; ma, poichè nessuno degli animali trattati morì, ripetemmo la prova con dosi di siero minori.

I controlli sono morti dopo 24 ore. Nessuno degli animali è sopravvissuto con l'inoculazione di 1 e 2 U. I. di siero specifico: la morte, per quanto un po' ritardata in confronto ai controlli, si è avuta in tutti entro le 72 ore. Con l'inoculazione di 3 U. I. è sopravvissuto il 50% delle cavie, con 4 U. I. il 33%, con 5 U. I. sono sopravvissute tutte.

L'autopsia degli animali ha rivelato in ogni caso che la morte è avvenuta per grave intossicazione difterica; mentre però non sempre era rilevabile una manifesta emorragia o per lo meno congestione delle capsule surrenali, era invece sempre presente nella pleura e nel pericardio un versamento costituito da liquido limpido; rare volte esso è stato trovato nel peritoneo, dove in tal caso era leggermente emorragico. L'edema gelatinoso sottocutaneo al punto di inoculazione qualche volta era piuttosto scarso ed allora appariva più imponente il versamento nelle sierose. Nulla da rilevare nella milza; il fegato appariva in genere congesto; frequente nei polmoni qualche zona, non estesa, di epatizzazione; reni quasi sempre iperemici; piccole emorragie nella massa del pacchetto intestinale.

Negli animali sopravvissuti è comparsa in prima giornata una pastosità al punto d'inoculazione più o meno estesa, che nei giorni successivi ha assunto una maggiore consistenza; generalmente però è andata man mano diminuendo come estensione, riducendosi ad un piccolo infiltrato, senza arrivare quasi mai all'escara.

I PROVA - PROTEZIONE IMMEDIATA DELLE CAVIE CON IL SIERO SPECIFICO

Cavie	germi	siero	12h.	24h.	36h.	48h.	60h.	72h.	84h.	96h.	X ^a g.	Mortalità
1	0,25	Controlli		+								100 %
2				+								
3				+								
4	0,25	1 U.I.			+							100 %
5						+						
6							+					
7						+						
8						+						
9												
10	0,25	2 U.I.				+						100 %
11							+					
12							+					
13							+					
14						+						
15							+					
16	0,25	3 U.I.				+						50 %
17											V	
18								+				
19											V	
20												
21							+				V	
22	0,25	4 U.I.						+				33 %
23											V	
24							+					
25											V	
26											V	
27											V	
28	0,25	5 U.I.									V	0 %
29											V	
30											V	
31											V	
32											V	
33											V	

II PROVA - PROTEZIONE DELLE CAVIE CON SIERO SPECIFICO
DOPO 6H. DALL'INFEZIONE

Cavie	germi	siero (dopo 6h.)	12h.	24h.	36h.	48h.	60h.	72h.	84h.	96h.	Mortalità
1	0,25	Controlli		+							100 %
2					+						
3				+							
4	0,25	50 U.I.			+						100 %
5						+					
6					+						
7	0,25	200 U.I.				+					100 %
8					+						
9						+					
10	0,25	400 U.I.					+				100 %
11					+						
12					+						

Nella seconda prova eseguita abbiamo voluto vedere se, intervenendo con dosi generose di siero dopo 6 h. dall'avvenuta infezione delle cavie con b. difterico, fosse ancora possibile salvare gli animali.

Oltre i controlli, abbiamo complessivamente inoculate per questa prova 9 cavie che abbiamo infettate come al solito con cmc 0,25 di sospensione batterica; dopo un intervallo di 6 ore abbiamo inoculato un primo gruppo di 3 animali con 50 U. I. di siero; un secondo gruppo con 200 U. I. ed un terzo gruppo con 400 U. I. Gli animali sono tutti morti ugualmente con l'unica differenza, nei riguardi dei controlli, che la morte non è avvenuta entro le 36 h. come in questi, ma entro le 48-60 ore. Quindi la conclusione che si può trarre da questa prova è che l'intervallo intercorso fra l'inoculazione dei germi e quella del siero è stato sufficiente perchè si avesse una moltiplicazione dei bacilli ed una produzione di tossina tale da non rendere più possibile al siero di esplicare la sua azione terapeutica.

Dopo queste due prime prove preliminari, abbiamo voluto sperimentare l'azione della penicillina da sola ed insieme con il siero specifico, iniziando il trattamento subito e dopo 6 h. dall'avvenuta infezione.

III PROVA - PROTEZIONE DELLE CAVIE CON SOLA PENICILLINA
INIZIANDO IMMEDIATAMENTE E DOPO 6H.

Cavie	germi	Penicillina (ogni 3h.)	12h.	24h.	36h.	48h.	60h.	72h.	84h.	96h.	Mortalità
1	0,25	Controlli		+							100 %
2				+							
3				+							
4	0,25	200 U.O.		+							100 %
5					+						
6				+							
7				+							
8					+						
9	0,25	300 U.O.				+					100 %
10				+							
11					+						
12					+						
13						+					
14	0,25	500 U.O.			+						100 %
15				+							
16					+						
17					+						
18						+					
19	0,25	500 U.O. (dopo 6h.)		+							100 %
20				+							
21				+							
22				+							
23					+						

La prova con penicillina sola è stata compiuta su 20 cavie, oltre tre come controllo.

Ad un primo gruppo di animali il trattamento penicillinico è stato iniziato subito dopo avvenuta l'inoculazione dei germi ed il medicamento è stato iniettato giorno e notte ogni 3 h. nella prima giornata e quindi ogni 4 h. nella seconda giornata; le dosi singole sono state di 200-300 e 500 U.O. per cavia, disciolte in soluzione fisiologica in maniera da aversi 1000 U. O. per cmc.

Tutti gli animali trattati sono morti con l'unica differenza nei riguardi dei controlli che, mentre questi non sopravvivevano oltre le 24 h., le cavie protette morivano fra le 36 e le 48 h. senza una apprezzabile differenza in rapporto al numero delle unità di penicillina inoculate.

Negli animali inoculati con il b. difterico e quindi protetti dopo 6 h. con penicillina, la differenza con i controlli diventava quasi nulla.

Pertanto questa prova rivela in maniera abbastanza evidente che la penicillina da sola non esercita alcuna apprezzabile azione nell'infezione difterica, neanche con dosi piuttosto alte: si pensi che 500 U. O. per cavia di 300 gr. corrispondono in proporzione a 100.000 U. O. per un uomo di 60 kg.

Pertanto abbiamo voluto controllare se, in associazione al siero specifico la penicillina dimostrasse una qualche azione coadiuvante che potesse migliorare i risultati terapeutici ottenuti con il solo siero.

Abbiamo diviso gli animali (IV prova) in 5 gruppi di 5 cavie ciascuno e, dopo averli infettati come al solito con cmc. 0,25 di sospensione batterica, li abbiamo protetti con quantità variabili di siero e di penicillina la quale veniva inoculata ogni 3 h. per il primo giorno e quindi ogni 4 h. per altri due giorni.

Le cavie inoculate con 2 U. I. di siero e con 300 e 500 U. O. di penicillina sono tutte morte come nella prima prova, in cui però la protezione degli animali era stata praticata con il solo siero: unica differenza è costituita dal fatto che qualche animale riesce a sopravvivere fino alla 72^a h., mentre le cavie trattate con il solo siero morirono tutte entro le 60 h. Le cavie inoculate con 3 U. I. di siero e con 300-500 U. O. di penicillina riescono a sopravvivere

quasi nell'identica proporzione delle cavia trattate con solo siero; si rileva però che la mortalità è un po' ritardata nel tempo.

Nessuna apprezzabile differenza invece si nota quando il trattamento con siero e penicillina è iniziato sei ore dopo l'infezione.

IV PROVA - PROTEZIONE DELLE CAVIE CON PENICILLINA E SIERO INIZIANDO IMMEDIATAMENTE E DOPO 6H.

Cavie	germi	Penicillina (ogni 3h.)	siero (ogni 24h.)	12h.	24h.	36h.	48h.	60h.	72h.	84h.	96h.	X ^a g.	Mortalità
1	0,25	Controlli			+								100 %
2						+							
3					+								
4	0,25	300 U.O.	2 U.I.				+						100 %
5									+				
6							+						
7							+						
8									+				
9	0,25	500 U.O.	2 U.I.					+					100 %
10							+						
11								+					
12								+					
13									+				
14	0,25	300 U.O.	3 U.I.									V	40 %
15												V	
16									+				
17								+					
18												V	
19	0,25	500 U.O.	3 U.I.						+				60 %
20												V	
21												V	
22									+				
23							+						
24	0,25	500 U.O. (dopo 6h.)	400 U.I. (dopo 6h.)				+						100 %
25						+							
26								+					
27							+						
28								+					

Nell'infezione difterica sperimentale della cavia la penicillina non rileva un'apprezzabile modifica sul decorso della malattia. Gli animali protetti con sola penicillina muoiono tutti; se trattati contemporaneamente con penicillina e siero, la mortalità si mantiene nell'identica proporzione degli animali protetti con solo siero, con la sola differenza che una parte delle cavie riesce a sopravvivere anche fino alla 60^a-72^a h. L'autopsia praticata su tutti gli animali morti ha rivelato ogni volta i segni propri della intossicazione difterica, con le stesse caratteristiche descritte al principio. Pertanto l'unico vantaggio apportato dalla penicillina è costituito dal lieve ritardo nella mortalità.

Riportando questi risultati, ottenuti sull'animale, all'infezione difterica dell'uomo, è logico pensare che la penicillina, in unione sempre con il siero specifico, possa esplicare un'azione favorevole sul decorso della malattia, per l'attività batteriostatica dell'antibiotico sui bacilli difterici. Senonchè noi pensiamo che nell'uomo bisogna tenere anche conto di un altro fattore che ha la sua importanza nella lotta che s'istituisce tra germi e penicillina. E' risaputo infatti che la localizzazione del bacillo difterico nell'uomo comporta la formazione di pseudomembrane fibrinose che poggiano su tessuto non più vivo e sano, ma in disfacimento necrotico, con trombosi dei vasi, per l'azione della potente esotossina difterica. In queste pseudomembrane i germi si moltiplicano rigogliosi, e la penicillina, che rimane pur sempre legata al veicolo ematico, incontra serie e persistenti difficoltà a superare questa barriera di necrosi per poter esplicare la sua azione batteriostatica sui germi. Se invece si interviene con la penicillina all'inizio del processo infettivo quando ancora le pseudomembrane sono in formazione e non si è ancora avuto il tempo di istituirsi una vera e propria barriera di necrosi, è presumibile che la penicillina espliciti una migliore e più apprezzabile azione terapeutica, in quanto essa potrà arrivare con maggiore facilità a contatto con i germi infettanti ed esplicarvi la sua azione prima che questi possono divenire inattaccabili all'interno delle pseudomembrane.

Quanto all'indicazione data da alcuni AA. sull'uso della penicillina in pazienti con difterite grave, si può pensare che in questi casi la sua azione, oltre che sui bacilli difterici, si espliciti anche su altri germi d'invasione concomitante (stafilococco-streptococco), sui quali essa può meglio esercitare la sua azione batteriostatica.

CONCLUSIONI

In base ai nostri risultati sperimentali ed alle osservazioni fatte, riteniamo di poter formulare le seguenti conclusioni sull'uso della penicillina nell'infezione difterica:

1°) Il trattamento penicillinico non esclude in nessun caso l'uso contemporaneo del siero specifico: nessuna cavia si è riusciti a salvare con la somministrazione di sola penicillina anche in dosi generose;

2°) l'associazione della penicillina al siero comporta un aumento della resistenza delle cavie che si rivela con una sopravvivenza di più lunga durata, nei confronti degli animali controllo;

3°) l'intervento con penicillina e siero dev'essere iniziato molto precocemente: nessuna cavia si salva iniziando il trattamento dopo 6 h. dall'infezione.

RIASSUNTO

Gli AA. hanno esaminato l'azione esplicata dalla penicillina da sola ed in associazione al siero specifico nell'infezione difterica sperimentale della cavia. I risultati ottenuti confermano l'utilità della cura penicillinica precoce come coadiuvante della sieroterapia.

Roma - Istituto Superiore di Sanità Laboratorio di batteriologia

BIBLIOGRAFIA

- 1) SCANGA F.: *Il controllo della sensibilità dei germi verso la penicillina*. Rendiconti Ist. Sup. San. (in corso di stampa).
- 2) TURNER R. W. D.: *Medical uses of penicillin*. Proc. Congr. C.M.F. Army Surgeons, 1, 139, 1945.
- 3) PANTALEONI M.: *La penicillina e gli antibiotici*. Ediz. Italiane, Roma 1945.
- 4) THRIFT J.: *Persistent nasal diphtheria treated with penicillin*. Med. Bull. N.A.T.O., 1945.
- 5) BERMAN e SPITZ: *Treatment of diphtheria carriers with penicillin*. Bull. of U.S.A. Medical Dep.; 4, 8, 1945.
- 6) BAGNALL A. W. e BAIN A. F.: *Use of penicillin in the carrier stage of partial diphtheria - Interim report of its use in a group of 47 cases*. Proc. Conf. Army Physicians C.M.F., Roma, 107, 1945.
- 7) PAMPIGLIONE G.: *Penicillina*. U.S.I.S., Roma, 1945.