

38. Mazzini PERGOLA — L'ictioveleno è istamina.

Riassunto. — Per giungere all'identificazione dell'ictioveleno l'A. ha compiuto ulteriori indagini che hanno dato i seguenti risultati:

— il tasso massimo di ictioveleno e di istamina nelle culture di batteri ictiotossigeni in 9 cm³ di brodo di tonno, o di soluzione di istidina a varie concentrazioni in acqua peptonata, si riscontra a 3-4 giorni di permanenza delle culture stesse in termostato a 37°C;

— il contenuto di ictioveleno e di istamina nelle culture presenta una prima fase ascendente, durante la quale esso va aumentando fino a raggiungere il tasso massimo, ed una seconda fase discendente, durante la quale esso va diminuendo e finisce collo stabilizzarsi ad una certa quota abbastanza fissa;

— i batteri ictiotossigeni utilizzano meglio ed in più larga misura l'istidina contenuta naturalmente e normalmente nel brodo di tonno come sostanza generatrice dell'ictioveleno, che non l'istidina contenuta in dose all'incirca uguale nella sua soluzione in acqua peptonata;

— ictioveleno e istamina si producono anche nelle culture dei batteri ictiotossigeni in agar allestito con brodo di tonno ed in agar allestito col comune brodo nutritivo aggiunto di istidina;

— gli antistaminici di sintesi dispiegano azione protettiva e curativa di fronte all'ictioveleno come di fronte all'istamina;

— mediante indagini chimiche si è riconosciuta la presenza di istamina nelle culture di batteri ictiotossigeni in brodo di tonno;

— sull'intestino isolato di cavia l'ictioveleno si comporta come l'istamina.

Poichè i risultati sopra riferiti, unitamente a quelli delle altre indagini che hanno formato oggetto di precedenti studi, dimostrano che le caratteristiche dell'ictioveleno sono identiche, sotto tutti i riguardi, a quelle dell'istamina, l'A. conclude che *l'ictioveleno è istamina*.

Résumé. — Pour arriver à déterminer la composition de l'ichtyovenin, l'auteur a poursuivi ses recherches et a obtenu les résultats suivants:

— le taux maximum d'ichtyovenin et d'histamine dans les cultures de bactéries ichtyotoxigènes dans 9 cm³ de bouillon de thon ou de solutions d'histidine à des concentrations diverses en eau peptonée, se vérifie après trois ou quatre jours de permanence des cultures elles mêmes dans un thermostat à 37°C.;

— le contenu en ichtyovenin et en histamine des cultures, est ascendant dans une première phase pendant laquelle il augmente jusqu'à atteindre le taux maximum; suit une phase descendante pendant laquelle il diminue et finit par se stabiliser à une certaine valeur assez fixe;

— les bactéries ichtyotoxigènes utilisent mieux et en une plus grande mesure l'histidine contenue normalement et naturellement dans le bouillon de thon comme substance génératrice de l'ichtyovenin, plutôt que l'histidine contenue en dose presque égale dans sa solution d'eau peptonée;

— on produit de l'ichtyovenin et de l'histamine aussi dans les cultures de bactéries ichtyotoxigènes dans l'agar préparé avec du bouillon de thon et dans l'agar préparé avec le bouillon ordinaire nutritif en ajoutant de l'histidine;

— les anti-histaminiques de synthèse développent une action protectrice et curative par rapport à l'ichthyovenin comme par rapport à l'histamine;

— par des recherches chimiques on a reconnu la présence de l'histamine dans les cultures de bactéries ichtyotoxigènes dans le bouillon de thon;

— sur l'intestin isolé de cobaye, l'ichtyovenin se comporte comme l'histamine.

Puisque les résultats ci-dessus rapportés, ainsi que ceux des autres recherches qui ont été l'objet d'études précédentes, démontrent que les caractéristiques de l'ichtyovenin sont identiques, sous tous les rapports, à celles de l'histamine, l'auteur conclut que *l'ichtyovenin est de l'histamine*.

Summary. — The author has carried out further tests for the identification of ichthyotoxin; the following results have been obtained:

— the maximum quantities of both ichthyotoxin and histamine encountered in cultures of ichthyotoxigenic bacteria in 9 cm³ of tunny broth or histidine solutions at various concentrations in peptonated water are obtained after 3-4 days in the culture at the thermostatically controlled temperature of 37°;

— the content of both ichthyotoxin and histamine in the cultures passes through two phases, in the first of which it increases to reach a maximum value, and in the second of which it decreases, finally becoming stable at a quite well-marked level;

— the ichthyotoxigenic bacteria utilize histidine contained naturally in the tunny broth more extensively as a source of ichthyotoxin production than the histidine contained in roughly equal quantity in peptonated water solutions;

- ichthyotoxin and histamine are also produced in cultures of ichthyotoxigenic bacteria in agar prepared with tunny broth and in agar prepared with the ordinary nutritional broth with additions of histidine;
- synthetic antihistaminics display protective and curative action against ichthyotoxin similar to their action against histamine;
- the presence of histamine has been detected by chemical methods in cultures of ichthyotoxigenic bacteria in tunny broth;
- ichthyotoxin behaves like histamine in the isolated guinea-pig intestine.

These results, in conjunction with those reported in earlier papers, show that the characteristics of ichthyotoxin are identical in all respects with those of histamine. The author concludes that *ichthyotoxin is identical with histamine*.

Zusammenfassung. — Um zu einer Identifizierung des Ichthyotoxins zu gelangen, führte der Verfasser weitere Forschungen durch, die nachstehende Ergebnisse hatten:

- der Höchstgehalt von Ichthyotoxin und Histamin in Ichthyotoxin erzeugenden Bakterienkulturen in 9 cm³ Thunfischbrühe oder von Histidin-Lösungen verschiedener Konzentrationen in mit Pepton behandeltem Wasser wird nach drei- bis viertägigem Verbleib der Kulturen im Thermostat bei 37°C. erreicht;
- der Gehalt von Ichthyotoxin und Histamin in den Kulturen steigt zunächst an, bis das Maximum erreicht ist, um dann abzufallen und sich auf einem bestimmten, ziemlich gleichbleibenden Niveau zu halten;
- die Ichthyotoxin erzeugenden Bakterien benutzen als Erzeugungs-substanz für das Ichthyotoxin besser und in grösserem Umfang das natürliche, normalerweise in Thunfischbrühe vorhandene Histidin als das in etwa gleicher Menge vorhandene Histidin in einer Histidin-Peptonwasser-Lösung;
- Ichthyotoxin und Histamin bilden sich auch in Kulturen von Ichthyotoxin erzeugenden Bakterien in mit Thunfischbrühe zumereitetem Nährboden wie auch in dem mit gewöhnlicher Bouillon unter Hinzufügung von Histidin zubereitetem Nährboden;
- synthetische Antihistaminsubstanzen haben eine Schutz- und Heilwirkung gegen Ichthyotoxin wie auch gegen Histamin;
- mittels chemischer Untersuchungen wurde die Gegenwart von Histamin in Kulturen von Ichthyotoxin erzeugenden Bakterien in Thunfischbrühe festgestellt;

— im isolierten Darm des Versuchstiers verhält sich Ichthyotoxin ebenso wie Histamin.

Die vorstehenden Ergebnisse wie auch die Ergebnisse früherer Untersuchungen beweisen, dass Ichthyotoxin und Histamin in jeder Hinsicht gleiche Eigenschaften haben. Der Verfasser kommt daher zu dem Schluss, das *Ichthyotoxin und Histamin die gleiche Substanz sind*.

Oggetto della presente nota sono le indagini che completano i miei studi sull'ictioveleno (*) (¹⁻²) di cui mi hanno permesso di riconoscere l'identità coll'istamina, come ne avevo prospettata l'ipotesi fino dal 1938.

ULTERIORI INDAGINI SULLA PRODUZIONE DELL'ICTIOVELENO E DELL'ISTAMINA

Queste nuove indagini fanno seguito a quelle riportate nella mia precedente nota del 1954 sulla rapidità di produzione dell'ictioveleno e dell'istamina per opera dei batteri ictiotossigeni (**).

Ecco la metodica seguita:

In ordinari tubi da cultura tarati a 9 cm³ ho introdotto 9 cm³ di brodo di pesce (***), oppure 9 cm³ di soluzione in acqua peptonata (****) di istidina monocloridrato a varie concentrazioni, li ho sterilizzati, li ho seminati con una ansata normale di emulsione abbastanza, ma non ec-

(*) Ricordo che col nome di « ictioveleno » ho indicato, come ho già detto altre volte, un principio termoresistente, tossico per gli animali da esperimento (coniglio, cavia, cane, gatto, piccione) rinvenuto in un primo tempo in pesci conservati sott'olio, incriminati di aver provocato episodi di avvelenamenti alimentari.

(**) Come « ictiotossigeni » ho qualificato batteri che producono ictioveleno quando, per inquinamento naturale o artificiale, capitano a svilupparsi in pesci (tonno, sarde, acciughe, sgombrò) in sostanza e allo stato fresco, o conservati sott'olio o in liquido acquoso, oppure vengono seminati nell'estratto acquoso di detti pesci.

(***) Richiamo la preparazione di questo brodo: Pesce allo stato fresco o conservato, tritato a macchina, si unisce a parti uguali in peso con acqua distillata, si passa in autoclave ad una atmosfera per mezza ora o più secondo il volume complessivo della massa e si filtra: il filtrato, a cui si lascia la sua acidità naturale, è appunto il brodo di pesce.

Questo brodo si può preparare anche con pesce essiccato fino a peso costante su bagnomaria bollente, che si unisce, dopo averlo tritato, ad acqua distillata, si passa in autoclave e si filtra. Secondo la percentuale di pesce essiccato usata, il filtrato risulta più o meno acido: se l'acidità è eccessiva, la si riduce, o si elimina, mediante aggiunta di soluzione di carbonato sodico.

(****) Questa acqua peptonata è così costituita: Peptone g 1 - Cloruro sodico g. 0,5 - Acqua distillata cm³ 100. Si fanno sciogliere a caldo i componenti e si filtra. Si porta la reazione del filtrato al punto neutro o a lieve alcalinità mediante soluzione di carbonato sodico.

cessivamente, densa di uno stesso germe ictiotossigeno e li ho posti in termostato a 37° C.

Per ovviare alla concentrazione che ictioveleno e istamina subiscono in queste culture in seguito alla loro più o meno prolungata permanenza in termostato ed al loro successivo riscaldamento in bagnomaria bollente in cui vengono passate per ucciderle, ho sempre riportato le culture stesse al primitivo volume di 9 cm³ con acqua distillata sterilizzata, prima di inocularle agli animali in esperimento.

Gli animali utilizzati sono state le cavie del peso di 250 g e le ho inoculate per via endopolmonare al torace destro.

Ho prescelto le cavie, perchè è noto che sono gli animali più sensibili all'istamina o, ciò che è lo stesso, all'ictioveleno che con essa — come vedremo — è da identificarsi ed ho preferito come via di inoculazione la via endopolmonare, perchè secondo BURNET (³) nelle cavie l'azione tossica dell'istamina si esplica essenzialmente mediante un attacco di asma che provoca la morte rapida degli animali per asfissia. Si comprende perciò come il principio tossico, introdotto direttamente proprio nell'organo maggiormente e più specificamente sensibile, debba esplicare al massimo grado la sua attività.

Per il giudizio sull'esito delle singole indagini, che per ogni cultura si sono estese a più cavie, mi sono attenuto al fenomeno più obiettivo quale è quello della morte sollecita degli animali, e tra i singoli valori numerici della dose minima risultata letale per ciascuna cavia ho calcolato la media, su cui appunto ho basato le osservazioni che andrò riferendo. Ma per maggiore chiarezza e semplicità della trattazione che segue, mi limiterò a rilevare le deduzioni generali ricavabili dai fatti osservati per ogni singolo argomento preso in esame, astenendomi dal citare i dati numerici indicanti le Dosi minime letali (D.m.l.) di ictioveleno e di istamina riscontrate nelle indagini eseguite in proposito. Ciò, perchè tali dati numerici non hanno valore assoluto e sono anzi suscettibili di variare spesso dall'uno all'altro soggetto capitato in esperimento, derivando essi da prove biologiche, sull'esito delle quali influiscono molteplici fattori — sia di natura biologica, sia anche di natura non biologica — non sempre agevolmente e sicuramente identificabili.

ICTIOVELENO — Le indagini sull'ictioveleno si sono praticate con culture di batteri ictiotossigeni:

- a) in brodo di tonno allo stato fresco;
- b) in brodo di tonno sott'olio;

c) in brodo allestito con tonno fresco previamente essiccato su bagnomaria bollente, e triturato (*).

Dal complesso di queste indagini si possono ricavare le seguenti deduzioni:

1) In tutte le suddette culture il quantitativo massimo di ictioveleno si riscontra a 3-4 giorni di loro permanenza a 37° C.

2) La tossicità delle culture, e quindi l'entità della loro D.m.l., varia a seconda del brodo in cui si è praticata la semina e cioè: le culture più tossiche risultano quelle in brodo a), un po' meno tossiche sono le culture in brodo b) e meno tossiche ancora sono le culture in brodo c).

La tossicità minore delle culture in brodo b) rispetto a quella delle culture in brodo a) è da attribuirsi probabilmente al fatto che nella elaborazione del tonno sott'olio il pesce viene sottoposto a vari trattamenti con acqua di mare e con salamoia, in cui infine si lascia cuocere per più ore. Non è da escludersi pertanto che in seguito a tali operazioni rimanga sottratta al tonno una parte della sua sostanza generatrice dell'ictioveleno, la quale perciò nel brodo di tonno sott'olio verrebbe a trovarsi in quantità minore che nel brodo di tonno fresco: di qui la conseguente minore produzione di ictioveleno. Ma per la tossicità ancora minore delle culture in brodo c), allestito, come si è detto, col medesimo tonno — previamente essiccato — del brodo a), non si può invocare una diminuzione della sostanza generatrice dell'ictioveleno per effetto del riscaldamento su bagnomaria bollente, perchè dai miei studi risulta che detta sostanza è termoresistente, e perciò ritengo che se ne possa ravvisare la ragione nella più facile e quindi più abbondante estrazione della sostanza generatrice dell'ictioveleno dal tonno fresco e dal tonno sott'olio che non dai medesimi materiali previamente essiccati.

Comunque, il materiale che meglio si presta alla produzione dell'ictioveleno risulterebbe essere il pesce — nel nostro caso tonno — allo stato fresco. E poichè, come ho già riferito altrove, il quantitativo di ictioveleno che si produce nelle culture è anche in rapporto diretto colla con-

(*) Per queste indagini ho utilizzato oltre il tonno altri pesci (sgombro, sarde, acciughe) atti alla produzione dell'ictioveleno, ma poichè l'esito è stato all'incirca uguale in ogni caso, mi limiterò a riportare come prototipo le indagini che si riferiscono al tonno.

Il brodo c) è stato preparato collo stesso tonno del brodo a) ma previamente essiccato e triturato. E precisamente ecco come ho operato: 500 g di tonno fresco, essiccato fino a peso costante su bagnomaria bollente, si riducono a 170 g, ossia, si può dire, a 1/3. Perciò ho preso 50 g di questo tonno essiccato, corrispondenti a 150 g di tonno fresco, li ho aggiunti a 150 cm³ di acqua distillata, ho passato il tutto in autoclave a 1 atmosfera per mezza ora, ho filtrato ed il brodo così ottenuto, risultato marcatamente acido, l'ho reso neutro o lievemente alcalino con soluzione di carbonato sodico.

centrazione della sua sostanza generatrice nel substrato nutritivo, i risultati ottenuti dimostrano che la proporzione di tale sostanza sarebbe massima nel brodo di tonno fresco, minima nel brodo di tonno essiccato, intermedia nel brodo di tonno sott'olio.

3) Colla permanenza delle culture in termostato oltre i 3-4 giorni, l'ictioveleno non solo non aumenta più, ma anzi va alquanto diminuendo, e ne consegue che l'entità della D.m.l. delle culture stesse va aumentando. Il contenuto di ictioveleno nelle culture presenta dunque:

— una prima fase ascendente, durante la quale l'attività delle culture va gradatamente crescendo fino a raggiungere il massimo consentito dal relativo substrato nutritivo,

— una seconda fase discendente, durante la quale l'attività delle culture va gradatamente diminuendo e col trascorrere del tempo finisce collo stabilizzarsi ad una certa quota abbastanza fissa.

Il fenomeno della fase discendente non deve sorprendere, perchè è abbastanza diffuso nel campo dei principi attivi di diretta o indiretta origine batterica, come: tossine, antitossine, agglutinine ecc. E' noto infatti che allo scopo di evitare di imbattersi in diminuzioni, che in un primo tempo sono piuttosto notevoli e frequenti, e di raggiungere invece una certa stabilizzazione nell'attività di tali prodotti batterici, si suggerisce di lasciare a sè per qualche tempo il materiale che li contiene, ossia — come suol dirsi — di lasciarlo stagionare.

4) Merita infine di essere rilevata la notevole differenza che si riscontra tra l'entità della D.m.l. delle culture dopo un giorno di permanenza in termostato, e quella che si ritrova dopo due giorni: si ha uno sbalzo in diminuzione molto spiccato, dovuto alla aumentata tossicità delle culture, sbalzo che non si verifica mai più nei giorni successivi, nei quali invece le variazioni di entità della D.m.l. sono molto più limitatamente gradualmente sia in diminuzione in primo tempo, sia in aumento in secondo tempo.

L'interpretazione dello sbalzo sopra notato è agevole ricordando che, come ho dimostrato in altra nota, la produzione di ictioveleno — manifestazione vitale di ogni singolo elemento batterico ictiotossigeno — è, entro certi limiti, tanto più sollecitata ed abbondante, quanto maggiore è la massa batterica che entra in azione. Perciò, essendo lo sviluppo microbico dopo due giorni di termostato molto più intenso che non dopo un giorno, come si può constatare già alla semplice osservazione macroscopica — il che significa che la massa batterica ha subito uno sbalzo notevole in aumento — pure il contenuto in ictioveleno delle culture è allora

ben più elevato. Vi è inoltre da considerare che nelle culture di due giorni i batteri ictiotossigeni esplicano la loro attività specifica per un tempo più lungo — e precisamente doppio — che nelle culture di un giorno e pure questa circostanza contribuisce naturalmente a provocare l'aumento dell'ictioveleno.

Nei giorni successivi al secondo e fino a quello in cui il contenuto in ictioveleno raggiunge il suo massimo, le circostanze sopra accennate — entità della massa batterica ed età delle culture — continuano senza dubbio ad agire, ma in grado più limitato e quindi meno sensibile è la variazione in aumento dell'ictioveleno.

ISTAMINA. — Per le indagini relative all'istamina mi sono partito da soluzioni di istidina monocloridrato al 0,5% - 1% - 2% in acqua peptonata.

Poichè l'istidina monocloridrato acidifica i liquidi nei quali viene disciolta, non ho mancato di rendere le sue soluzioni neutre, o solo lievemente acide o lievemente alcaline, mediante aggiunta di carbonato sodico, affinchè fossero meglio atte a permettere la moltiplicazione batterica.

Come ho fatto per l'ictioveleno, anche per l'istamina esporrò le deduzioni generali che si possono ricavare dal complesso delle relative indagini:

1) Al pari che per l'ictioveleno, pure nelle culture di batteri ictiotossigeni allestite nelle varie concentrazioni di istidina, il più elevato contenuto di istamina si raggiunge a 3-4 giorni di loro permanenza in termostato.

2) L'entità della D.m.l. delle culture va diminuendo coll'aumentare del tasso di istidina e può quindi considerarsi — in linea generale — inversamente proporzionale ad esso. Ma non lo è in modo matematicamente esatto, in quanto in rapporto alla D.m.l. della cultura col 0,5% di istidina, la D.m.l. delle culture coll'1% e col 2%, cioè con dose doppia e quadrupla di istidina, non è rispettivamente 2 e 4 volte minore, ossia non è ridotta rispettivamente alla metà e ad un quarto, bensì è di entità molto minore. Ciò dipende dal fatto che in queste culture l'istidina non viene trasformata totalmente in istamina, ma solo parzialmente. Comunque, non vi è dubbio che aumentando la dose di istidina messa a disposizione dei batteri ictiotossigeni ne aumenta pure la quota utilizzata e si ha perciò una maggiore produzione di istamina.

La medesima osservazione ricordo di aver già fatta per le culture in brodo di pesce, nelle quali pure si riscontra che la sostanza generatrice dell'ictioveleno non è completamente utilizzata dai batteri ictiotossigeni

e che il quantitativo di ictioveleno che si produce sta in rapporto diretto, tra altri fattori, anche colla concentrazione della sua sostanza generatrice presente — e quindi disponibile — nelle culture stesse.

3) Lasciando ancora le culture in termostato oltre i 3-4 giorni, dopo cioè che hanno raggiunto il massimo contenuto di istamina, questa — come si è veduto avvenire per l'ictioveleno — va alquanto diminuendo, mentre per conseguenza l'entità della D.m.l. va aumentando. Al pari dell'ictioveleno, dunque, pure l'istamina, che si produce nelle culture con istidina, presenta nella sua concentrazione una prima fase ascendente ed una seconda fase discendente, per finire collo stabilizzarsi ad una certa quota abbastanza fissa.

4) In conformità di quanto si è osservato per le culture in brodo di tonno, pure per quelle in acqua peptonata aggiunta di istidina l'entità della D.m.l. dopo due giorni di termostato è molto diminuita rispetto a quella che era dopo un solo giorno, perchè si è elevata notevolmente la tossicità delle culture in seguito all'aumentato contenuto di istamina. Ciò avviene per i medesimi motivi — entità della massa batterica ed età delle culture — precedentemente addotti a proposito dell'ictioveleno.

CONFRONTO TRA LA CULTURA DEI BATTERI ICTIOTOSSIGENI IN BRODO DI TONNO E LA CULTURA IN ACQUA PEPTONATA AGGIUNTA DEL 0,7% DI ISTIDINA

Da alcuni dati sulla composizione chimica delle carni dei pesci ho calcolato che il contenuto in istidina del tonno si aggira, in cifra tonda, sul 0,7% (*). Mi è sembrato pertanto interessante confrontare la cultura dei batteri ictiotossigeni in brodo di tonno colla loro cultura nella semplice soluzione di istidina al 0,7% in acqua peptonata.

(*) Dal Trattato di Bertolini e Penso (*) e più precisamente dal Libro secondo — redatto da Penso — che riguarda i prodotti della pesca, a pag. 482, Tabella II, è riportata la composizione grezza di alcuni pesci. Per il tonno si ha per 100 g:

Acqua	.	.	.	.	.	.	.	53,81
Sostanze albuminoidi	.	.	.	.	.	.	.	28,26
» grasse	.	.	.	.	.	.	.	14,58
» minerali	.	.	.	.	.	.	.	1,35
Totale								100,00

A pag. 480, Tabella I, Penso riferisce inoltre che secondo Osborne e Jones, l'aminoacido istidina nei pesci rappresenta il 2,55% delle sostanze albuminoidi.

In base a questi dati il tasso di istidina per 100 g di tonno si ricava dalla seguente proporzione:

$$100 : 2,55 = 28,26 : X$$

da cui

$$X = \frac{28,26 \times 2,55}{100} = \frac{72,0630}{100} = 0,720630.$$

Allo scopo di evitare la frequente ripetizione di tutta la relativa dicitura indicherò colla lettera A) la cultura in brodo di tonno e colla lettera B) la cultura in acqua peptonata aggiunta del 0,7% di istidina, ed ecco i risultati di questa indagine:

Dopo un giorno di termostato lo sviluppo batterico è piuttosto scarso in ambedue le culture e la loro D.m.l. per cavie di 250 g è all'incirca uguale. Ma dopo due giorni di termostato lo sviluppo batterico è nettamente più intenso nella cultura A) che nella cultura B) ed allora pure la diminuzione di entità della D.m.l. è molto più sensibile per A) che per B). Ciò significa che in due giorni di permanenza a 37° C la tossicità della cultura A) aumenta in grado ben più elevato che la tossicità della cultura B), dimostrando così che la produzione di ictioveleno nell'una cultura è più abbondante che quella di istamina nell'altra, ossia, in altre parole, che i batteri ictiotossigeni utilizzano meglio ed in più larga misura l'istidina contenuta naturalmente e normalmente nel brodo di tonno, come sostanza generatrice dell'ictioveleno, che non l'istidina contenuta in dose all'incirca uguale nella sua soluzione in acqua peptonata.

Alla medesima conclusione si giunge proseguendo il confronto per i giorni successivi al secondo, in quanto l'entità delle D.m.l. della cultura A) è sempre inferiore a quella delle corrispondenti D.m.l. della cultura B).

La spiegazione di questa differenza tra le D.m.l. delle due culture ci è offerta da una osservazione già altrove da me riferita, secondo la quale sul quantitativo di ictioveleno o di istamina prodotto in un certo periodo di tempo dai batteri ictiotossigeni influisce, tra altri fattori, la costituzione del substrato in cui si fa la semina, nel senso che quanto più esso si presta alla conservazione dell'integrità dei batteri stessi, alla loro moltiplicazione e alla estrinsecazione delle loro attività biochimiche, tanto più rimane favorita la produzione del principio tossico. Poichè ai suddetti requisiti il brodo di tonno corrisponde meglio dell'acqua peptonata aggiunta del 0,7% di istidina, è ovvio che la concentrazione dell'ictioveleno nell'un substrato sia superiore a quella dell'istamina nell'altro.

PRODUZIONE DI ICTIOVELENO E DI ISTAMINA NELLE CULTURE IN AGAR

Oltre che in brodo di pesce l'ictioveleno si produce pure nel relativo agar. Partendomi dal brodo di tonno, vi ho preparato l'agar all'1,5%, che ho allestito a becco di flauto in tubi. Seminativi i batteri ictiotossigeni ho lasciato le culture in termostato fino ad ottenere sviluppo rigoglioso e le ho uccise passandole in bagnomaria bollente. Raccolto in

capsula di porcellana l'agar così liquefatto, l'ho essiccato su bagnomaria e lasciatolo raffreddare l'ho triturato e l'ho ripreso con acqua distillata. Il liquido privo di agar, ottenuto filtrando per carta, l'ho inoculato in opportune dosi a cavie per via endopolmonare ed a conigli per via endovenosa: gli animali sono morti rapidamente, presentando il solito quadro fenomenologico da intossicazione acuta per ictioveleno. L'estratto acquoso delle culture di batteri ictiotossigeni in agar preparato con brodo di tonno conteneva dunque ictioveleno.

Prove analoghe fatte — seguendo la stessa metodica — con agar allestito con soluzione di istidina al 0,7% in brodo nutritivo comune (*) hanno avuto esse pure esito letale rapido, dimostrando così che si era prodotta istamina.

Si può quindi concludere che l'agar contenente la sostanza generatrice dell'ictioveleno e l'agar contenente istidina si comportano ugualmente per quanto riguarda la produzione del principio tossico che uccide gli animali.

INDAGINI SULL'AZIONE PROTETTIVA E CURATIVA DEGLI ANTISTAMINICI DI SINTESI

Come è noto, i prodotti che vanno sotto il nome di *antistaminici di sintesi* hanno la proprietà di prevenire, e talvolta pure di reprimere, lo shock istaminico sperimentale e lo shock anafilattico (**).

Per riconoscere il comportamento dell'ictioveleno di fronte agli antistaminici ho praticato prove in cavie e conigli usando vari antistaminici,

(*) Ho usato per questa indagine l'ordinario brodo nutritivo, invece della semplice acqua peptonata, per ottenere sviluppo batterico più rigoglioso.

(**) Riassumo come il più tipico, e schematizzandolo alquanto, il gravissimo e tumultuoso quadro fenomenologico provocato nel coniglio — analogo del resto a quello che si osserva nella cavia — da dosi letali non eccessive di ictioveleno e di istamina, somministrate per via circolatoria. Il coniglio, lasciato libero non appena espletata l'inoculazione, assume per il momento la sua consueta posizione di riposo. Ma ben presto si inizia la sindrome morbosa, nella quale si possono distinguere le seguenti due fasi:

Prima fase o di eccitazione, caratterizzata da disturbi motori e viscerali. I disturbi motori incominciano con disturbi dell'equilibrio, consistenti in tentennamento del capo e del tronco e proseguono spesso con violenti sbalzi incoordinati, o con una corsa sfrenata, per cui l'animale non riesce ad evitare di sbattere contro qualche ostacolo — mobili o pareti dell'ambiente — e cade disteso su un fianco in preda a convulsioni tonico-cloniche. I disturbi viscerali intervengono di solito contemporaneamente a quelli motori o poco dopo il loro inizio e consistono nella emissione di urina e di feci non diarroiche, che può ripetersi durante gli attacchi convulsivi. Nel coniglio non si verificano come in altri animali (per es. gatto, cane) accessi di vomito e scariche diarroiche.

Seconda fase o di depressione, caratterizzata da fenomeni di paralisi, da ipotermia e da abolizione del riflesso congiuntivale, espressione dell'avvenuta morte dell'animale.

che tutti hanno dato i medesimi risultati, ma ho finito coll'attenermi a quello ritenuto meno tossico, cioè al Neo-Antergan (N.p. metossibenzoilo N. dimetilaminoetil aminopiridina) studiato da BOVET e WALTHERT.

AZIONE PROTETTIVA DEL NEO-ANTERGAN. — A cavie di 200-350 g si inoculano per via sottocutanea, o endomuscolare, o endoperitoneale cm^3 1,5 di soluzione di Neo-Antergan al 4‰ in acqua distillata e dopo 20'-60' ossia quando il Neo-Antergan è stato certamente riassorbito, si somministrano per via sottocutanea, o endomuscolare, o endoperitoneale e perfino endopolmonare più dosi sicuramente letali di ictioveleno: gli animali non manifestano alcun disturbo obbiettivamente apprezzabile e sopravvivono.

Uguale esito favorevole, cioè la sopravvivenza degli animali senza disturbi, si riscontra in analoghe indagini praticate in conigli di 1.500-2.000 g, inoculati prima per via endomuscolare con 3 cm^3 della suddetta soluzione di Neo-Antergan e poi — dopo 20'-60' — con più dosi sicuramente letali di ictioveleno per via endomuscolare e perfino endovenosa.

Il Neo-Antergan dunque, al pari che contro l'istamina, protegge cavie e conigli contro l'azione tossica dell'ictioveleno anche somministrato per la via per la quale gli animali sono più sensibili.

AZIONE CURATIVA DEL NEO-ANTERGAN. — Per apprezzare questa azione si inoculano cavie per via sottocutanea, o endomuscolare, o endoperitoneale, o endopolmonare, e conigli per via sottocutanea, o endomuscolare, o endovenosa con una dose sicuramente letale di ictioveleno e quando, dopo qualche tempo — talvolta dopo pochi istanti — si notano negli animali sintomi di sofferenza, si somministrano per via sottocutanea, o endomuscolare, o endoperitoneale, cm^3 1,5 della solita soluzione di Neo-Antergan, se si tratta di cavie, e cm^3 3 se si tratta di conigli. Qualora l'intervento del Neo-Antergan sia tempestivo e non troppo tardivo, le manifestazioni morbose ben presto si attenuano e finiscono collo scomparire completamente, mentre gli animali si rimettono, tornando, almeno in apparenza, allo stato normale, e sopravvivono, altrimenti muoiono.

E' ovvio che l'insuccesso sia più frequente quando l'ictioveleno è stato somministrato per via endopolmonare nelle cavie e per via endovenosa nei conigli. Comunque, sebbene l'esito favorevole dell'esperimento non sia costante, i casi nei quali ciò si verifica sono più che sufficienti a dimostrare che il Neo-Antergan può esplicare azione curativa, somministrato dopo l'ictioveleno, al pari che dopo l'istamina.

INDAGINI CHIMICHE E INDAGINI SULL'INTESTINO ISOLATO DI CAVIA

Le indagini che seguono sono state praticate presso il Reparto di Chimica Terapeutica (Prof. D. BOVET) dell'Istituto Superiore di Sanità, dal Prof. G. B. MARINI-BETTOLO e dalla Dott.ssa M. MAROTTA (*).

INDAGINI CHIMICHE (Prof. G. B. MARINI-BETTOLO). — Il riconoscimento e la determinazione dell'istamina nelle culture sono stati effettuati secondo il metodo riportato da EGGERTH, LITWIN e DEUTSCH ⁽⁵⁾ che è basato sulla estrazione del terreno di cultura con cloroformio alcool amilico in ambiente alcalino e sulla successiva riestrazione della fase cloroformio-amilalcoolica con acido solforico.

Dalla soluzione solforica poi si spostano le eventuali basi volatili per ebollizione dopo aver neutralizzato con carbonato sodico e aggiunto un eccesso di borace.

In queste soluzioni l'istamina è stata determinata con la diazoreazione (acido solfanilico diazotato) e anche per via biologica sugli organi isolati.

Concentrando le soluzioni precedenti, si ottiene un liquido, nel quale si precipita l'istamina allo stato di dipicrato con una soluzione metilica di acido picrico.

INDAGINI SULL'INTESTINO ISOLATO DI CAVIA (Dott. M. MAROTTA). — A queste indagini si riferiscono le allegate due grafiche, relative a due diversi campioni di ictioveleno.

Sono state eseguite delle prove sull'intestino isolato di cavia per osservare l'attività dei campioni in esame in confronto coll'attività dell'istamina.

La tecnica usata è la seguente: un pezzo di intestino di cavia, prelevato previa uccisione dell'animale, è immerso in un bagno contenente 25 cm³ di liquido nutritivo di Webster alla temperatura costante di 37°C ed è sospeso ad una leva isotonica che registra i movimenti su un apposito chimografo.

La prova test viene eseguita coll'istamina verso la quale l'intestino di cavia è molto sensibile; nel medesimo bagno viene introdotta con una siringa la quantità voluta del prodotto da esaminare. Dopo ogni contrazione segue il lavaggio dell'intestino che viene compiuto meccanicamente mediante un apposito congegno; tra una contrazione e l'altra si aspetta generalmente un tempo di due minuti.

(*) Al Prof. D. Bovet, al Prof. G. B. Marini-Bettòlo ed alla Dott. M. Marotta, che tanto gentilmente si sono prestati per le ricerche che mi interessavano, porgo qui pubblicamente i miei più sentiti ringraziamenti.

I due campioni A e B del prodotto da esaminare sono stati provati alla dose approssimativa di 10 e 20 cm³/l della soluzione diluita allo 1/1.000; la contrazione provocata dal campione B è più marcata di quella avuta con il campione A. La quantità media di istamina che risulta dalle varie determinazioni è approssimativamente di 5 mg/l per il campione A e di 10 mg/l per il campione B.

L'attività istaminica di tali campioni è stata anche confermata dal fatto che la dose di 1 mg/l di antistaminico, il Neo-Antergan, immediatamente precedente la dose di 0,002 cm³/l dei prodotti in esame, inibisce completamente l'azione di tali prodotti.

CONCLUSIONE

Colle indagini sopra riferite ho completato i miei studi — elencati nella bibliografia — sull'identificazione dell'ictioveleno.

In base al complesso dei risultati ottenuti l'ictioveleno dimostra di possedere caratteristiche identiche, sotto tutti i riguardi, a quelle dell'istamina: è quindi pienamente giustificata la conclusione definitiva che *l'ictioveleno è istamina*.

Da questa conclusione si deduce a sua volta che:

- i batteri detti « ictiotossigeni » sono da qualificarsi più chiaramente e più esattamente « istaminogeni »;
- la cosiddetta « sostanza generatrice dell'ictioveleno » è istidina;
- gli alimenti che contengono l'aminoacido istidina possono provocare intossicazioni istaminiche, qualora vengano invasi da batteri istaminogeni.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- ¹⁾ PERGOLA M. e COLLODI A. M.: Policlinico (Sezione Pratica), 17: 739 (1910).
- ²⁾ PERGOLA M.: Policlinico (Sezione Pratica), 19: 951 (1912); 21: 275 (1914); 23: 967 (1916); 34: 237 (1927); 43: 1318 (1936); 44: 2281 (1937); 45: 2186 (1938).
Bollettino della Sezione Italiana della Società Internazionale di Microbiologia, 1: 208 (1929); 5: 283 (1933); 9: 105 (1937).
Giornale di Batteriologia e Immunologia, 16: 49 (1936).
Rendiconti dell'Istituto di Sanità Pubblica, 1: 773 e 905 (1938).
Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità, 13: 571 (1950); 17: 135 (1954).
- ³⁾ BURNET F. M.: Biological Aspects of Infections Disease - Traduzione italiana dal titolo « Le malattie infettive », Giulio Einaudi, editore, 1950.
- ⁴⁾ BERTOLINI G. e PENSO G.: L'ispezione sanitaria degli animali da cortile, della selvaggina, delle carni conservate e dei prodotti della pesca - Roma, S.A. Tipografica Editrice Sallustiana, 1936.
- ⁵⁾ EGGERTH A. H., LITWIN R. J. e DEUTSCH J. V.: Journ. of Bacteriology, 37: 187 (1939).