

17. Mazzini PERGOLA. — **Rapidità di produzione dell'ictioveleno dalla sua sostanza generatrice e dell'istamina dall'istidina per opera dei batteri ictiotossigeni.**

Riassunto. — L'A. ricorda innanzi tutto che col nome di « ictioveleno » ha già in altre occasioni indicato un principio tossico, termo-resistente, rinvenuto in pesci allo stato fresco o conservati, e prodotto da batteri detti appunto « ictiotossigeni »;

richiama poi l'ipotesi da lui emessa fino dal 1938, secondo la quale l'ictioveleno e la sua sostanza generatrice sarebbero da identificarsi rispettivamente coll'istamina, o con sostanza istaminosimile, e coll'istidina;

e passa quindi a riferire ulteriori indagini, dalle quali risulta che la rapidità di produzione dell'ictioveleno dalla sua sostanza generatrice e dell'istamina dall'istidina, per opera dei batteri ictiotossigeni, sta in rapporto:

a) colla massa di batteri ictiotossigeni seminata: infatti in culture di 10 cc di brodo di pesce, o di soluzione al 5^o/₁₀₀ di istidina monoclorigrato in brodo nutritivo comune, o in acqua peptonata, la produzione rispettivamente di ictioveleno e di istamina a dose letale per il coniglio inoculato per via endovenosa con i 10 cc di cultura, ha luogo da 6 a 8 ore di permanenza delle culture a 37° C, se queste si seminano come d'ordinario, cioè con modica quantità di batteri ictiotossigeni, ha luogo, invece, da ore 1 a 2½, se le culture si seminano con dosi massive di batteri ictiotossigeni: 1 cc di liquido culturale per ogni cmq di agarcoltura rigogliosamente sviluppata;

b) sia colla quantità assoluta, sia colla concentrazione percentuale rispettivamente della sostanza generatrice dell'ictioveleno e della istidina presenti, e quindi disponibili, nelle relative culture;

c) colla costituzione del substrato culturale liquido.

Ricorrendo a culture con dosi massive di batteri ictiotossigeni, l'A. ha potuto apprezzare non di rado l'istidina nelle sue soluzioni fino alla concentrazione minima dell'1^o/₁₀₀ ed analogamente per l'ictioveleno ha potuto accertare, nella concentrazione della sua sostanza generatrice, un limite, al di sotto del quale le culture di batteri ictiotossigeni in brodo di pesce non esplicano più la loro particolare attività tossica negli animali da esperimento.

Résumé. — L'auteur commence par rappeler qu'il a déjà précédemment donné le nom de « ichtyovenin » à un principe toxique, thermorésistant, qu'il a trouvé chez les poissons frais ou conservés et qui est produit par des bactéries appelées justement « ichtyotoxigènes ».

Il rappelle ensuite l'hypothèse qu'il a déjà émise en 1938, selon laquelle l'ichtyovenin et sa substance génératrice s'identifient respectivement avec l'*histamine* ou avec des substances semblables et avec l'*histidine*.

Puis il expose des recherches ultérieures qui établissent que la rapidité de production de l'ichtyovenin par sa substance génératrice et celle de l'histamine par l'histidine, par le travail de bactéries ichtyotoxigènes, est en rapport :

a) avec la masse des bactéries ichtyotoxigènesensemencée : en effet dans une culture de 10 cc. de bouillon de poisson, ou dans une solution à 5‰ d'histidine monochlorhydrée dans un bouillon de culture ordinaire, ou dans de l'eau peptonée, la production respectivement d'ichtyovenin et d'histamine en dose mortelle pour le lapin inoculé par voie intraveineuse avec 10 cc. de culture a lieu après 6-8 heures de permanence des cultures à 37°C. quand celles-ci sontensemencées comme d'ordinaire, c'est-à-dire avec une quantité moyenne de bactéries ichtyotoxigènes; elle a lieu au contraire après 1-2½ heures, si la culture estensemencée avec des doses massives de bactéries ichtyotoxigènes: 1cc. de bouillon de culture pour chaque cm² de culture d'agar bien développée;

b) soit avec la quantité absolue, soit avec la concentration en pourcentage respectivement de la substance génératrice de l'ichtyovenin et de l'histidine présentes et par conséquent disponibles dans les cultures relatives;

c) avec la composition du substrat liquide de la culture.

En recourant à des cultures avec des doses massives de bactéries ichtyotoxigènes, l'auteur a pu repérer l'histidine dans ses diverses solutions jusqu'à la concentration minimum de 1‰ et, de même, pour l'ichtyovenin il a pu déterminer, dans la concentration de sa substance génératrice, une limite au dessous de laquelle les cultures de bactéries ichtyotoxigènes dans le bouillon de poisson n'expliquent plus leur particulière action toxique chez les animaux à expérience.

Summary. — The Author begins by reminding the reader that he has been using the term « *ichthyopoisson* » already for some time to de-

note a toxic thermo-resistant principle found in fresh or preserved fish and produced by « *ichthyotoxicogenic* » bacteria.

He then reminds the reader of the theory that he formulated already in 1938, according to which ichthyopoisin and the substance generating it are to be identified respectively in *histamine* (or a histamine-like substance) and in *histidine*;

He next proceeds to report on his further research from which it appears that the speed of the production of ichthyopoisin from its generating substance and of histamine from histidine, caused by ichthyotoxicogenic bacteria, is dependent from:

a) the mass of ichthyotoxicogenic bacteria planted: in fact, in 10 cc of culture in fish broth or in 5‰ solution of monochlorohydrate of histidine in common nourishing broth, or in peptonated water, the respective production of ichthyopoisin and histamine of a dose sufficiently large to be lethal to a rabbit inoculated intravenously (10 cc of culture) takes place after 6 to 8 hours of the culture being kept at 37°C., if the usual moderate quantity of bacteria is sown: only 1 to 2½ hours are required with heavy doses of ichthyotoxicogenic bacteria: 1 cc of culture for each square centimetre of splendidly developed agar culture;

b) both absolute quantity and respective percentage concentration of the ichthyotoxin generating substance and histidine present, and thus available, in the cultures under consideration;

c) constitution of cultural liquid substratum.

Taking recourse to heavy doses of ichthyotoxicogenic bacteria, the Author was able often to ascertain the presence of histidine in solutions up to a minimum concentration of 1‰ and, analogously, as regards ichthyopoisin, he was able to ascertain in the concentration of its generating substance a limit beneath which cultures of ichthyotoxicogenic bacteria in fish broth fail to exercise their particular toxic activity in the animals experimented with.

Zusammenfassung. — Verfasser beginnt den Leser daran zu erinnern, dass er den technischen Ausdruck « Fischgift » schon eine gewisse Zeit angewandt hat, um damit ein toxisches, wärmewiderständiges Prinzip zu kennzeichnen, welches man in frischen oder konservierten Fischen antrifft und das durch fischgiftherstellende Bakterien hervorgerufen wird.

Er erinnert den Leser dann weiterhin an die Theorie, die er im Jahre 1938 aufgestellt hat, derzufolge das Fischgift und seine produ-

zierende Substanz sich je in Histamin (oder eine Histamin-ähnliche Substanz) und Histidin feststellen lassen.

Er berichtet dann über seine weiteren Forschungen, derzufolge es scheint, dass die Rapidität in der Herstellung von Fischgift aus seiner produzierenden Substanz, wie auch die von Histamin aus Histidin, durch fischgifterzeugende Bakterien verursacht, von folgenden Umständen abhängt:

a) Anzahl der fischgifterzeugenden Bakterien, die kultiviert wurde: In der Tat, in einer 10 cc Kultur Fischbrühe oder in einer 5%igen Monochlorohydratlösung von Histidin in einem gemeinen Nährmittel oder in « *peptonated* » Wasser, erfolgt die jeweilige Bildung von Fischgift und Histamin einer genügend starken Dose zur Tötung eines Kaninchens, dem man eine intravenöse Injektion verabfolgt hat, nach 6 bis 8 Stunden, während der die Kultur einer Temperatur von 37° C. ausgesetzt wurde, solange die übliche einfache Bakterienanzahl in die Kultur eingepflanzt wurde. Auf der anderen Seite bedarf man nur 1 bis zu 2½. Stunden bei einer starken Dosis von fischgiftherstellenden einer Kultur von 1 cc eine jeden qcm einer äusserst gut entwickelten Agarkultur:

b) absolute Quantität und respektiver Prozentsatz einer Konzentrierung der fischgifterzeugenden Substanz wie auch das vorhandene Histidin, die beide in den beschriebenen Kulturen anzutreffen sind;

c) Bildung des flüssigen Kultursubstratums.

Indem der Verfasser maximale Dosierungen von fischgifterzeugenden Bakterien anwandte, war er imstande, das Vorhandensein von Histidin in Lösungen bis zu einer minimalen Konzentrierung von 1%o nachzuweisen; er war weiterhin in ähnlicher Weise in der Lage, mit Bezug auf Fischgift, in der Konzentrierung der erzeugenden Substanz eine Grenze nachzuweisen, bei welcher Kulturen von fischgifterzeugenden Bakterien einer Fischbrühe aufhören, irren besondern toxischen Effekt auf die Versuchstiere auszuüben.

Col nome di « *ictioveleno* », ho indicato, come ho riferito in precedenti note, un principio termoresistente, tossico per gli animali da esperimento (coniglio, cavia, cane, gatto, piccione) rinvenuto in pesci — onde il nome di *ictioveleno* — conservati sott'olio, incriminati di

aver provocato nell'uomo episodi individuali o collettivi di avvelenamenti alimentari. E come « *ictiotossigeni* » ho qualificato i batteri che danno luogo appunto alla produzione di ictioveleno, quando, per inquinamento naturale o artificiale, vengono a svilupparsi in pesci (tonno, sarde, acciughe, sgombro) in sostanza e allo stato fresco, o conservati sott'olio, o in liquido acquoso, oppure nell'estratto acquoso di detti pesci, allestito a caldo, e che ho denominato « *brodo di pesce* » (*).

L'ictioveleno è dunque un principio di origine microbica, ma non è nè una esotossina, nè una endotossina, bensì ricorda piuttosto i veleni chimici minerali ad azione letale più o meno sollecita e intensa a seconda della dose somministrata e della via di somministrazione.

Già fino dal 1938 ho emesso l'ipotesi che l'ictioveleno e la sua sostanza generatrice siano da identificarsi l'uno coll'*istamina*, o con sostanza istaminosimile, l'altra coll'*istidina*, da cui per decarbossilazione — operata anche dai miei batteri ictiotossigeni — deriva appunto l'*istamina*. Su questa ipotesi mi riprometto di tornare appositamente in altra nota, ma qui intanto l'ho richiamata, per spiegare perchè le presenti indagini si riferiscano tanto all'ictioveleno che all'*istamina*.

I risultati, che verranno esposti, si sono ricavati da prove eseguite su un notevole numero di conigli, inoculati per via endovenosa, e di cavie, inoculate per via endotoracica all'emitorace destro, via questa, per la quale esse sono molto sensibili all'ictioveleno ed all'*istamina*. E se si ha la precauzione di introdurre nel torace l'ago della siringa soltanto per qualche millimetro, si può ritenere che l'iniezione risulti endopolmonare.

Il quadro fenomenologico provocato dall'ictioveleno e dall'*istamina* corrisponde all'incirca a quello dello shock anafilattico, che per la cavia consiste essenzialmente — come dice Burnet — in un attacco d'asma rapidamente mortale (**).

(*) Questo brodo di pesce si prepara nel seguente modo:

Triturato a macchina il pesce, lo 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 partendosi da pesce essiccato a bagnomaria e polverizzato, nel quale stato si conserva benissimo per molto tempo. Per allestirvi il brodo si unisce la polvere di pesce — nella voluta percentuale — all'acqua distillata, si passa in autoclave e si filtra. Secondo la percentuale di polvere usata, il filtrato risulta più o meno acido: se ne riduce — ove occorra — l'acidità mediante l'aggiunta di carbonato sodico, come si fa per il comune brodo culturale.

(**) Ecco quanto scrive Burnet: « La cavia ha degli anelli muscolari bene sviluppati tutt'attorno ai più piccoli bronchi, che conducono l'aria entro i suoi polmoni. La funzione di questi anelli muscolari non è ben chiara; il fatto è però che essi sono singolarmente sensibili all'*istamina*. Sotto la sua azione, essi si contraggono e bloccano il passaggio dell'aria dai grossi bronchi agli alveoli polmonari, così che la cavia muore per asfissia in pochi minuti ».

Per il giudizio sull'esito dei vari esperimenti mi sono attenuto al fenomeno il più obbiettivo, quale è quello della morte sollecita — di solito entro pochi minuti — degli animali in prova.

Poichè ictioveleno e istamina sono termoresistenti, le culture di batteri ictiotossigeni, colle quali ho praticato le varie indagini, sono state sempre previamente uccise tenendole per 1/2 - 1 ora in bagnomaria bollente.

Premesso quanto sopra, passo a riferire i singoli esperimenti.

1) Per indagare il grado di attività specifica di ciascuno dei miei batteri ictiotossigeni ho allestito tubi con 10 cc di brodo di pesce e tubi con 10 cc di comune brodo nutritivo, o di acqua peptonata (*) aggiunti del 5% di istidina monocloridrato. Vi ho seminato una ansata di emulsione piuttosto densa dei vari stipiti ictiotossigeni ed ho posto le culture in termostato a 37° C. Dopo periodi vari di tempo — progressivamente crescenti — di permanenza delle culture in termostato le ho uccise in bagnomaria bollente e ne ho inoculato i 10 cc per via endovenosa a conigli di g 1200-1500.

Ecco i risultati conclusivi di queste prove:

a) in linea generale tutti gli stipiti batterici ictiotossigeni si comportano all'incirca ugualmente e quindi sono da ritenersi dotati di un grado all'incirca uguale di attività specifica;

b) in quanto alla rapidità di produzione dell'ictioveleno e della istamina, per lo più soltanto le colture di almeno 7-8 ore risultano contenere nei loro 10 cc una quantità di principio attivo, sufficiente a provocare entro pochi minuti la morte del coniglio inoculato per via endovenosa;

c) per l'ictioveleno, poi, il brodo preparato con polvere di pesce — per es. di tonno fresco essiccato — usata nella proporzione del 10-15% può dare culture che uccidono il coniglio anche dopo soltanto 6 ore di termostato.

Mentre pertanto i 10 cc delle colture di meno di 6-8 ore non uccidono il coniglio, quelle, invece, lasciate in termostato oltre detto limite di tempo lo uccidono anche somministrate a dosi minori di 10 cc, perchè in esse va sempre più aumentando il contenuto in ictioveleno e in istamina, fino a raggiungere il quantitativo massimo, consentito dalla concentrazione delle loro relative sostanze generatrici.

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

II) La produzione di ictioveleno e di istamina è dunque — come sopra si è visto — abbastanza sollecitata già in condizioni ordinarie. Si può tuttavia accelerarla maggiormente ricorrendo ad un espediente suggeritomi dalla considerazione che ictioveleno ed istamina sono il prodotto di una particolare attività biochimica dispiegata dai singoli elementi batterici ictiotossigeni: ho ricercato quindi se aumentando notevolmente il quantitativo dei batteri che entrano in funzione già in primo tempo, ne risultasse accelerata la produzione di ictioveleno e di istamina, nel senso di ritrovare — sempre in 10 cc di coltura — tali principi attivi in dose letale per il coniglio, dopo permanenza della coltura stessa a 37° C per un tempo minore di 6-8 ore. Ed ecco come ho attuato l'esperimento:

Per l'ictioveleno: In provettoni di 20 millimetri di diametro, contenenti agar obliquo la cui superficie di semina era di circa 10 cmq, ho allestito colture di batteri ictiotossigeni. Dopo 2-3 giorni di permanenza in termostato a 37° C, quando cioè la patina batterica si era sviluppata rigogliosamente, ho aggiunto in ciascun provettone 10 cc di brodo di pesce — ossia 1 cc di liquido culturale per ogni cmq di superficie seminata — ed ho emulsionato nel brodo tutta la massa batterica.

Lasciata l'emulsione nel provettone stesso in cui era stata allestita, o travasatala in altro provettone, ho messo i tubi in termostato a 37° C, o in bagnomaria mantenuto alla temperatura di 37° C.

Ho passato subito in bagnomaria bollente i 10 cc di emulsione di un provettone per ucciderne i batteri e servire da controllo, e poi nello stesso modo ho trattato l'emulsione batterica degli altri tubi a periodi diversi — progressivamente crescenti — di tempo di permanenza a 37° C.

Lo stesso esperimento ho praticato facendo uso di bottiglie di Roux, aventi una superficie di semina di 200 cmq.

Allestite le bottiglie con agar vi ho seminato i batteri ictiotossigeni e lasciata sviluppare abbondantemente la massa batterica in termostato, l'ho emulsionata in 200 cc di brodo di pesce: anche qui dunque 1 cc di liquido culturale per ogni cmq di superficie di semina.

Prelevati 10 cc dell'emulsione batterica non appena allestita e passati subito in bagnomaria bollente per ucciderne i batteri e servire da controllo, ho posto la bottiglia in termostato a 37° C. Periodicamente poi da essa ho via via prelevato 10 cc di emulsione batterica, che ho ucciso, passandola — al solito — in bagnomaria bollente.

Ed ecco quanto è risultato dal complesso di queste indagini, eseguite sia con i provettoni, sia colle bottiglie di Roux:

a) Alla prova di controllo, consistente nella inoculazione di 10 cc della emulsione batterica uccisa appena allestita, il coniglio non presenta

disturbi apprezzabili e sopravvive in condizioni apparentemente normali, dimostrando così che l'emulsione batterica di per sè non ha potere tossico ad azione sollecita come l'ictioveleno (*).

Le altre prove, eseguite esse pure nel coniglio coll'inoculazione endovenosa di 10 cc di emulsione batterica, mantenuta a 37° C per il tempo che di volta in volta sarà indicato, hanno dato i seguenti risultati:

b) Dopo 1/2 ora a 37° C: talvolta si manifestano disturbi piuttosto lievi, che ricordano — sia pure alquanto attenuati — i fenomeni incipienti dell'intossicazione da ictioveleno, ma ben presto l'animale si rimette e per il momento sopravvive.

c) Dopo 1 ora a 37° C: si riscontrano esiti diversi, in quanto:

— il coniglio può non presentare alcun disturbo;

— talora si osservano manifestazioni tossiche da ictioveleno anche piuttosto gravi, ma l'animale si rimette e sopravvive almeno per il momento;

— abbastanza spesso, invece, l'animale muore col quadro fenomenologico dell'intossicazione da ictioveleno;

— in qualche rarissimo caso, e probabilmente col concorso di particolari circostanze inerenti al soggetto capitato in esperimento, la comparsa di manifestazioni patologiche da ictioveleno si osserva con qualche ritardo (dopo 10-20 minuti dall'inoculazione) sotto forma di disturbi piuttosto lievi, che poi vanno gradatamente aggravandosi per 1-2 ore, fino a terminare colla morte dell'animale, ritardata così a qualche ora dall'inoculazione.

d) Dopo ore 1½ a 37° C: il coniglio di solito muore, presentando il quadro fenomenologico tipico dell'intossicazione da ictioveleno.

e) Dopo 2 ore a 37° C: il coniglio muore quasi costantemente per intossicazione da ictioveleno.

f) Dopo ore 2½ a 37° C: il coniglio muore costantemente per intossicazione da ictioveleno.

g) Protraendo la permanenza delle colture a 37° C oltre le ore 2½ si ha la morte del coniglio anche con dosi molto minori di 10 cc, perchè l'ictioveleno — come già si è detto che avviene nel caso preso

(*) Questi animali — al pari di altri delle prove successive, che non soccombono entro qualche minuto dall'inoculazione — muoiono spesso entro 24 ore. In tal caso però l'esito letale è da riportarsi non tanto all'ictioveleno, quanto piuttosto all'endotossina di cui i batteri ictiotossigeni sono forniti.

in considerazione nel paragrafo I) — va sempre più aumentando, fino a raggiungere il quantitativo massimo consentito dalla concentrazione della sua sostanza generatrice.

Da quanto sopra riferito si deduce dunque che portando a contatto col brodo di pesce — fin dal primo momento — dosi massive di batteri ictiotossigeni, si accelera notevolmente la produzione dell'ictioveleno, che in 10 cc di coltura raggiunge una dose sollecitamente letale per il coniglio talvolta già dopo 1 ora di permanenza a 37° C, più sicuramente dopo ore 1½-2 o — al massimo — 2½.

Se consideriamo che colla semina di batteri ictiotossigeni a dosi non massive occorrono dalle 6 alle 8 ore di permanenza della coltura a 37° C, affinché 10 cc di essa uccidano sollecitamente il coniglio, si può concludere che colla semina di dosi massive si raggiunge il medesimo risultato in un periodo di tempo molto minore.

Il periodo di ore 1-2½ è il limite estremo di rapidità raggiungibile nella produzione dell'ictioveleno, per quanto riguarda l'influenza della massa batterica seminata in primo tempo. Ed invero aumentando, per esempio, del doppio o del quadruplo la proporzione della massa batterica ictiotossigena in rapporto al quantitativo di brodo di pesce messo a contatto con essa — come si ha, versando nelle bottiglie di Roux a 200 cmq di superficie di semina, cc 100 o cc 50, invece di cc 200, di brodo di pesce — la produzione dell'ictioveleno non ne risulta nè aumentata, nè ulteriormente accelerata, ma anzi viene piuttosto diminuita e rallentata.

Questo esito ci induce ad ammettere che la rapidità di produzione dell'ictioveleno — e conseguentemente il quantitativo che esso raggiunge in un dato periodo di tempo — oltre che, entro certi limiti, colla massa batterica ictiotossigena seminata, sta in rapporto pure colla quantità — considerata nel suo valore assoluto e non nel suo tasso percentuale — della relativa sostanza generatrice presente, e quindi disponibile, nella coltura. Se infatti, come si è detto, si introducono nelle solite bottiglie di Roux cc 100 o 50, anzichè 200, di brodo di pesce, la concentrazione percentuale della sostanza generatrice è sempre la stessa, ma la sua quantità complessiva, che viene a trovarsi nelle culture, si riduce, evidentemente, alla metà o alla quarta parte (*).

(*) Per esempio: supponiamo che un certo brodo di pesce contenga il 0,50% di sostanza generatrice dell'ictioveleno: se ne prendiamo 200 cc, vi troviamo g 1 di detta sostanza generatrice, se, invece, ne prendiamo 100 o 50 cc, il tasso percentuale della sostanza generatrice è sempre uguale, cioè del 0,50%, ma la sua quantità complessiva è rispettivamente di g 0,50 e di g 0,25, ossia la metà e la quarta parte della quantità che ne esiste in 200 cc di quel dato brodo di pesce.

Alla medesima conclusione si giunge facendo colture — a parità di tutte le altre condizioni — in brodo di pesce integro, cioè non diluito, e nello stesso brodo diluito, per esempio, a $1/2$ - $1/4$ - $1/8$: la produzione di ictioveleno, sollecita ed abbondante, di solito, nel brodo integro, appare tanto meno sollecita ed abbondante, quanto più diluito è il brodo originario, ossia quanto minore è nella coltura il contenuto assoluto di sostanza generatrice dell'ictioveleno, sostanza che nel caso qui considerato si ridurrebbe appunto a $1/2$ - $1/4$ - $1/8$ di quella che esisteva nel brodo integro.

Per l'istamina: I risultati ottenuti per l'ictioveleno si hanno pure per la produzione di istamina dall'istidina, della quale si può conoscere esattamente il quantitativo esistente nel mezzo culturale.

Attenendomi alle stesse modalità indicate a proposito dell'ictioveleno, ho allestito colture di batteri ictiotossigeni in provettoni con agar obliquo, di 10 cmq di superficie seminativa, oppure in bottiglie di Roux a 200 cmq di superficie di semina. Come substrato culturale liquido ho usato la soluzione di istidina monocloridrato al 4 e al 5 ‰ in acqua peptonata, o in brodo comune. Mettendo a contatto liquido culturale e batteri ictiotossigeni a dosi massive, e cioè nella solita proporzione di 1 cc del primo per ogni cmq di coltura dei secondi, si ottiene già in ore 1-1½ di permanenza a 37° C una quantità di istamina, sufficiente a provocare, abbastanza spesso, la morte sollecita del coniglio inoculato per via endovenosa con 10 cc di coltura uccisa a bagnomaria bollente. Tale esito, invece, si ottiene più tardivamente, se il liquido culturale è in proporzione di 1 cc per una massa batterica di 2 o 4 cmq di coltura, oppure l'istidina è in concentrazione sensibilmente minore del 4 o 5 ‰.

E qui cade in acconcio rilevare che la sollecita produzione di istamina *in vitro* ripete, in certo qual modo, quanto si verifica *in vivo* — non escluso l'uomo — in occasione di quelle manifestazioni morbose, qualificate come anafilattiche o allergiche, per le quali si attribuisce appunto molta importanza alla più o meno improvvisa produzione di istamina.

III) Una qualche influenza sulla rapidità di produzione dell'istamina dall'istidina e quindi sulla quantità di istamina prodotta in un certo periodo di tempo — ciò che per analogia si può estendere pure alla produzione di ictioveleno nel brodo di pesce — è da riconoscersi anche alla costituzione del liquido culturale, nel senso che quanto più il substrato si presta alla conservazione dell'integrità dei batteri, alla loro moltiplicazione e alla estrinsecazione delle loro attività biochimiche, tanto più favorisce la produzione di istamina e rispettivamente di ictio-

veleno. Ciò appunto è quanto dimostra l'apposito esperimento praticato usando come substrato di cultura la soluzione di istidina monocloridrato al 5‰ in acqua distillata, in soluzione fisiologica di cloruro sodico, in acqua peptonata ed in brodo di carne bovina. Attenendosi alla solita proporzione di 1 cc di liquido culturale per 1 cmq di patina batterica, la dose letale di istamina per gli animali da esperimento si trova più sollecitamente nelle culture allestite colla soluzione di istidina in brodo di carne o in acqua peptonata, che non nelle culture allestite con istidina sciolta in soluzione fisiologica o in acqua distillata.

IV) Accertato il vantaggio di usare dosi massive di batteri ictiotossigeni per accelerare la produzione dell'ictioveleno e dell'istamina, sono ricorso a questo espediente per ricercare la dose minima di istidina monocloridrato, rivelabile colla sua trasformazione in istamina, e successivo apprezzamento di questa mediante la solita prova biologica nel coniglio o nella cavia.

In casi eccezionalissimi e certo con il concorso di particolari circostanze — non facilmente identificabili — inerenti al soggetto capitato in esperimento, mi è riuscito apprezzare la proporzione del 0,5‰ di istidina monocloridrato, ma la proporzione minima non tanto eccezionalmente apprezzabile è quella dell'1‰.

Qualcosa di analogo si verifica pure per l'ictioveleno, nel senso che anche per questo, nella concentrazione della sua sostanza generatrice esiste un limite, al di sotto del quale la prova biologica nel coniglio o nella cavia non rivela più ictioveleno nelle relative culture di batteri ictiotossigeni. Ciò, evidentemente, significa che in tali culture l'ictioveleno o non si è formato, o per lo meno non vi ha raggiunto una dose sufficiente a provocare la morte degli animali in prova. Riporto in proposito un esempio: brodo allestito col 13% di polvere di tonno fresco essiccato, si diluisce variamente e si semina con batteri ictiotossigeni. Per il caso a cui mi riferisco, è risultato che fino alla diluizione corrispondente ad un brodo col 3,25% di polvere di tonno, l'ictioveleno era apprezzabile, al di sotto di questo limite non lo era più.

Sulla rapidità di produzione dell'istamina e dell'ictioveleno influisce, dunque, pure la concentrazione percentuale rispettivamente dell'istidina e della sostanza generatrice dell'ictioveleno nelle relative culture.

BIBLIOGRAFIA

- BURNET F. M. : Biological Aspects of Infections Disease. Traduzione italiana dal titolo « Le malattie infettive », Giulio Einaudi, editore, 1950.
- PERGOLA M. e COLLODI A. M. : Il Policlinico, Sez. pratica, 17, 739, 1910.
- PERGOLA M. : Il Policlinico, Sez. pratica, 19, 951, 1912; 21, 275, 1914; 23, 967, 1916; 34, 237, 1927; 43, 1318, 1936; 44, 2281, 1937.
- Bollettino della Sez. Italiana della Società Internazionale di Microbiologia, 1, 208, 1929; 5, 283, 1933; 9, 103, 1937.
- Giornale di Batteriologia e Immunologia, 16, 49, 1936.
- Rendiconti dell'Istituto di Sanità Pubblica, 1, 903, 1938.
-