

LAVORI DELL'ISTITUTO D'IGIENE DI CAGLIARI

RICERCHE SU DI UN NUOVO ANTIBIOTICO

Prof. GIUSEPPE BROTZU



CAGLIARI - Tip. C. E. L. 1948

Ricerche su di un nuovo antibiotico

Prof. GIUSEPPE BROTZU

Studi su di un nuovo micete

Nel corso di studi diretti alla ricerca di germi dotati di potere antibiotico ho rivolto l'attenzione all'esame della flora microbica dell'acqua marina in vicinanza allo sbocco della fognatura, partendo dal presupposto che i processi di autodepurazione delle acque stesse fossero in qualche parte conseguenza anche di antagonismi batterici, e si potesse perciò sperare che esistessero nelle acque dei germi (miceti e schizomiceti), il cui studio desse, sotto tale punto di vista, dei risultati interessanti.

Il germe da noi studiato è precisamente uno delle numerose specie batteriche e micetiche di cui fu saggiato il potere antibiotico.

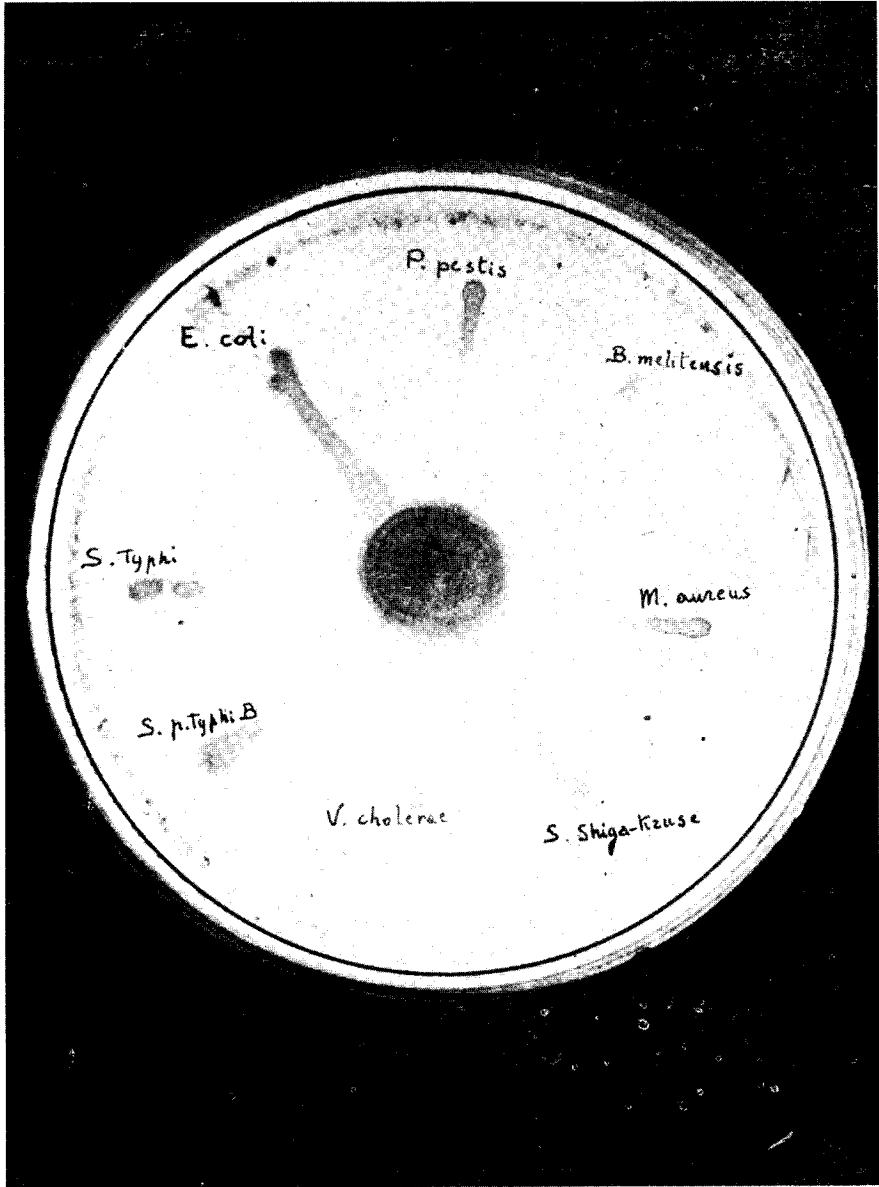
Esso fu isolato nel mese di luglio del 1945 da un campione di acqua prelevato dalle località anzidette, seminato su agar comune e fatto sviluppare a temperatura ambiente. A sviluppo completo le colonie di numerosissimi germi venivano isolate, e di ciascuna di esse si saggiava il potere antagonistico verso lo stafilococco aureo, l'ebertella typhi, il v. cholerae, il b. anthracis e la br. melitensis.

All'uopo su piastre d'agar si eseguiva uno striscio e dopo 3-4 giorni di sviluppo, si deponeva in vicinanza della zona di sviluppo un'ansata di brodo-cultura dei suaccennati germi. Si poteva così riconoscere in modo sommario l'eventuale esistenza di un principio antibiotico nell'agar della zona limitrofa a quella di sviluppo.

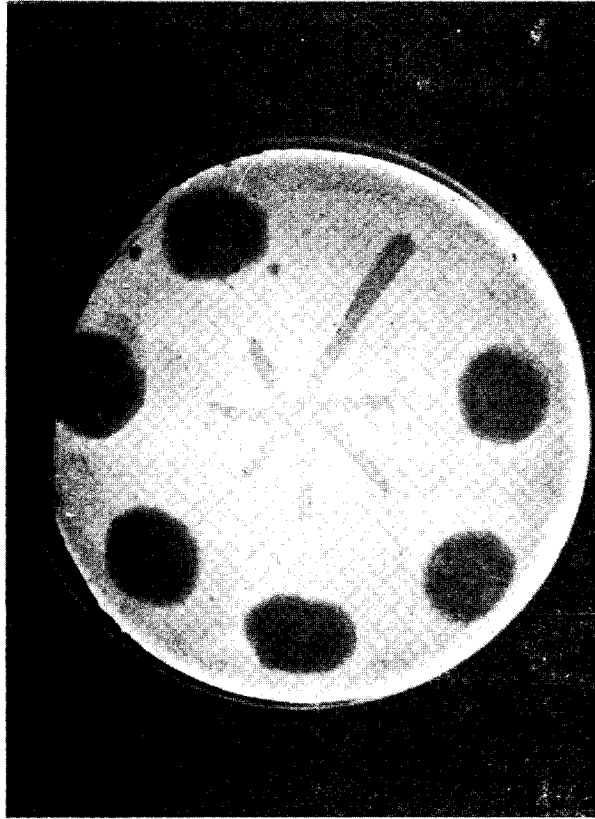
Seguendo questa tecnica assai semplice fu possibile studiare delle centinaia di germi, e scegliere tra di essi il nostro micete che fin dai primi isolamenti si mostrò dotato di particolari e spiccate attività inibenti.

Studio del germe

Le colonie in agar comune o su Agar Sabouraud di tre giorni di sviluppo hanno un diametro di cm. 0,7-0,8. Di colore bianco, risultano composte di una zona centrale più compatta costituita da un intreccio di ife circondata da un alone di filamenti a raggiera.



Colonia di tre giorni. Le diverse specie batteriche sono seminate con
ansa fino al limite della colonia micetica. Il tratto non sviluppato indica il
potere antibiotico verso le singole specie.



Colonia di tre giorni di micete. L'ebertella Typhi è stata seminata con ansa radialmente verso le singole colonie e fino al loro margine e per il controllo nello spazio tra due di queste.

Caratteri del principio antibiotico

Non è possibile dare, per ora, alcuna notizia sulla costituzione chimica del principio. E' solo possibile indicare alcune caratteristiche.

Resistenza al calore: In soluzione negli estratti o nella cultura il germe mostra una certa resistenza alla temperatura. Anche temperature di 100°, purchè solo per pochi minuti, non lo distruggono.

Resistenza al tempo: Non si sono potuti fare dei saggi su materiali allo stato secco. In soluzione di fosfato di Na il titolo battericida a temperatura di 4°-5° C va lentamente ma progressivamente diminuendo. A temperatura di 37° C la scomparsa del potere antibiotico è assai più rapida.

Rapporti tra principio antibiotico e Ph del terreno. La produzione del principio antibiotico è maggiore verso il 7°-8° giorno sui terreni con amido e idrati di C. Tale produzione coincide con il modificarsi del ph della cultura in cui si osserva inizialmente una diminuzione e poi lentamente un aumento del Ph.

Ph iniziale		7,2
dopo un giorno		6,8
	2 »	6,6
	3 »	6,6
	4 »	6,6
	5 »	6,7
	» 6 »	6,8
	» 7 »	7
	» 8 »	7,2
	» 9 »	7,4
	» 10 »	7,6
	» 11 »	7,8

La produzione del principio antibiotico che in agar sembra essere veramente notevole, incontra delle limitazioni nelle culture su mezzi liquidi. Le prime prove fatte su Czapek e su altri terreni sintetici dettero dei risultati del tutto insoddisfacenti; infatti la concentrazione del principio antibiotico era così bassa che la diluizione del liquido culturale, con cui si aveva inibizione dello sviluppo, non superava, in genere, l'1 a 10.

Rispondeva meglio il brodo comune con amido e glucosio all'1%. In questo terreno si raggiungevano verso il 4°-8° g. titoli 1:15 mentre nel brodo comune tale titolo era raggiunto verso il 10° e 13° g. Il contenuto in princ. antib. nelle culture tenute a temp. di 30° C. rapidamente declina fin quasi a scomparire.

Numerosi tentativi sono stati fatti allo scopo di migliorare tale produzione su terreno liquido.

Si è studiato l'azione di vari aminoacidi come istidina, leucina, glicocola, valina, degli acidi urico, glutaminico, tartarico.

Si sono provati brodi con estrato di orzo tallito, di lievito di birra, di germogli di grano, di piselli. Ma i risultati sono stati poco soddisfacenti, si è solo avuto un lieve vantaggio con l'aggiunta di ipoxantina, valina, cistina e acido glutaminico. Non è difficile scorgere un legame tra la formula delle ultime tre sostanze.

Selezione progressiva del micete con culture in agar. Attraverso pazienti isolamenti consecutivi di colonie ottenute su piastre si è pure potuto ottenere, dopo varie centinaia di culture in serie, degli stipiti che in br. glucosio-amido danno una produzione, verso

il 10° giorno, di principio antibiotico attivo fino alla diluizione 1:100.

Particolare degno di nota è che tali caratteristiche possono essere perse facilmente tenendo gli stipiti in terreno liquido a temperatura ambiente e anche a temperatura di 5° C.

Estrazione del principio antibiotico. L'estrazione del principio antibiotico è stata eseguita da cultura su agar e da cultura liquida.

Da cultura su agar si può estrarre il principio attivo. Abbiamo già ricordato che mettendo un pezzettino di agar di un punto adiacente ad una colonia di *Cephalosporium* in brodo, questo non lascia più sviluppare l'ebertella typhi. Ciò indica che il principio evidentemente si diffonde nel mestruo acquoso della cultura. Ma oltrechè con acqua si può estrarre il principio con alcool. L'agar di cultura di *Cephalosporium* in fiaschetta viene sminuzzato e sospeso in alcool a 95°. L'alcool, che si colora in giallo più o meno intenso, estrae il principio. Le culture sono attive specialmente tra il 5°-6° giorno, mentre le culture più giovani e più vecchie (oltre l'8°-10° giorno) non contengono quantità evidenziabili di principio. Evaporando l'alcool, a bassa temperatura nel vuoto si può concentrare il principio attivo.

L'estrazione dal liquido culturale è stata oggetto di lunghe indagini allo scopo di ottenere una purificazione del principio e una concentrazione in piccolo volume. Le difficoltà incontrate, stante la scarsa disponibilità di mezzi, sono state grandissime.

I metodi usati per la preparazione della penicillina sono stati impiegati ma i risultati sono stati poco soddisfacenti.

Cosicchè in ultimo si è preparato un concentrato evaporando rapidamente in corrente d'aria a circa 25° C il liquido culturale filtrato per cotone fino ad una concentrazione pari al decimo e precipitando quindi le sostanze proteiche con alcool etilico a 98 gradi nella proporzione di parti 1,5 su 1 di concentrato.

Dal liquido così ottenuto filtrato per cotone si fa distillare l'alcool mediante aspirazione nel vuoto e riscaldamento a 37°-40° C.

Il liquido ottenuto è di colorito giallo bruno con lieve fluorescenza. Esso contiene oltre il principio attivo certamente molte altre sostanze.

Esperienze cliniche con il liquido culturale

Con il liquido culturale direttamente si sono fatte delle esperienze su forme cliniche chirurgiche, sia stafilococciche che streptococciche, e particolarmente in vespai, flemoni ed ascessi, specialmente per inoculazione diretta nel fuocolaio infiammatorio.

a) In tutti i casi trattati nei quali era in atto un processo flogistico, in stadio infiltrativo od a raccolta ascessuale formata, già alla prima infiltrazione in seno ai tessuti flogosati nel 1° caso, ed all'iniezione nell'interno della cavità ascessuale nel 2° caso, ad un molesto senso di bruciore locale che durava, attenuandosi gradatamente, per qualche ora, seguiva la scomparsa del dolore tensivo, pulsante, proprio dei focolai flogistici.

Il dolore quando ricompariva, il che non avveniva mai prima di 12-24 h. se era mancata la seconda somministrazione, non raggiungeva mai l'intensità precedente al trattamento.

b) Alla scomparsa del dolore tensivo, pulsante, in sede flogistica si è costantemente accompagnata una sensazione di benessere generale.

c) La febbre, eccettuato qualche caso nel quale ha avuto un comportamento particolare ha sempre ceduto alla prima somministrazione, talvolta addirittura per crisi.

d) Di notevole interesse sono i rilievi fatti a carico dei focolai flogistici, che all'evidenza dimostrano l'efficacia del preparato in esame.

Già alla prima inoculazione nelle raccolte ascessuali segue la de-ensione: calore, rossore, e turgore scompaiono nelle prime 24 h, di pari passo, come sopra ho già detto, con la scomparsa del dolore e della lesa funzione; con la cessazione del dolore soggettivo si verifica anche quella del dolore provocato.

La regressione, l'arresto addirittura nell'evoluzione dei fenomeni flogistici, è più che evidente nello stadio infiltrativo: in questi casi all'infiltrazione in seno ai tessuti flogosati è seguita la guarigione.

e) Ad avvalorare l'esattezza dei rilievi clinici concorre il risultato degli esami batteriologici.

In tutti i casi studiati, eccezione fatta di alcuni, già dopo le prime due o tre inoculazioni, il materiale prelevato è risultato batteriologicamente sterile.

Un'applicazione particolare è stata fatta in un caso di tigna tricofitica e in un cherion mediante impacchi con feltri miceliali formati nella cultura del micete. Nel primo caso si ottenne una guarigione in 40 giorni e nel secondo in soli 20 giorni.

Esperienze cliniche con estratti di liquido culturale

Il liquido culturale concentrato al 10 %, secondo la tecnica suindicata, è stato preparato per uso generale anzichè locale e lo si è inoculato per via endovenosa, intramuscolare e per via rettale.

Il liquido specie per via endovenosa produce una reazione febbrile.

le notevole per cui non lo si può regolarmente adoperare in tal modo. La reazione febbrile è minore per via intramuscolare, ma tali iniezioni riescono per molti (non per tutti) dolorose e sono mal tollerate. Per via rettale è generalmente ben tollerato ma l'assorbimento è verosimilmente limitato negli adulti.

Questo estratto è stato adoperato, naturalmente con certa difficoltà dovuta ai predetti inconvenienti, in casi di tifo, di paratifo A, di paratifo B e di Brucellosi.

I risultati si possono così riassumere:

1) Le condizioni generali del malato risentono in genere di un miglioramento notevole, che si rileva particolarmente nei casi di infezione ebertiana.

2) La febbre per l'effetto piretogeno del prodotto dovuto con tutta probabilità non all'antibiotico contenuto, ma alle notevoli impurità che certo presenta (tant'è che vi sono differenze da preparazione a preparazione malgrado lo stesso contenuto in principio antibiotico), aumenta nei primi tre-quattro giorni, poi presenta qualche oscillazione e quindi sospendendo il farmaco cade tra il 4^o-6^o giorno.

Talvolta la caduta si è verificata in 24 ore, mentre invece in casi gravi di tifo con complicazioni varie sono occorsi 7-8 giorni.

3) Nelle infezioni brucellari, sospendendo troppo presto il trattamento si è verificato talvolta un ritorno febbrile.

4) Non si sono mai avuti, oltre quelli segnalati, altri inconvenienti degni di nota.

CONCLUSIONI

Sembra da quanto è stato riferito che questo princ. antibiotico prodotto dal cephalosporium acremonium possa avere un'applicazione assai larga.

La sua attività in vitro contro lo stafilococco, lo streptococco, il b. anthracis, l'ebertella typhi, il v. cholerae, il b. pestis, la br. melitensis, e le esperienze in vivo sull'uomo, anche se limitate per difficoltà estrattive del principio antibiotico sull'inf. stafilococcica e streptococcica, sulla tifoide, e le brucellosi fanno presumere favorevolmente.

Si è voluto riferire quanto sopra nella speranza che altri istituti meglio dotati di mezzi possano giungere ad un progresso maggiore nella selezione del micete, preparazioni culturali dell'antibiotico, ed estrazione di esso.