



ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
CLINICA FISIOLÓGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

G. DI GERONIMO

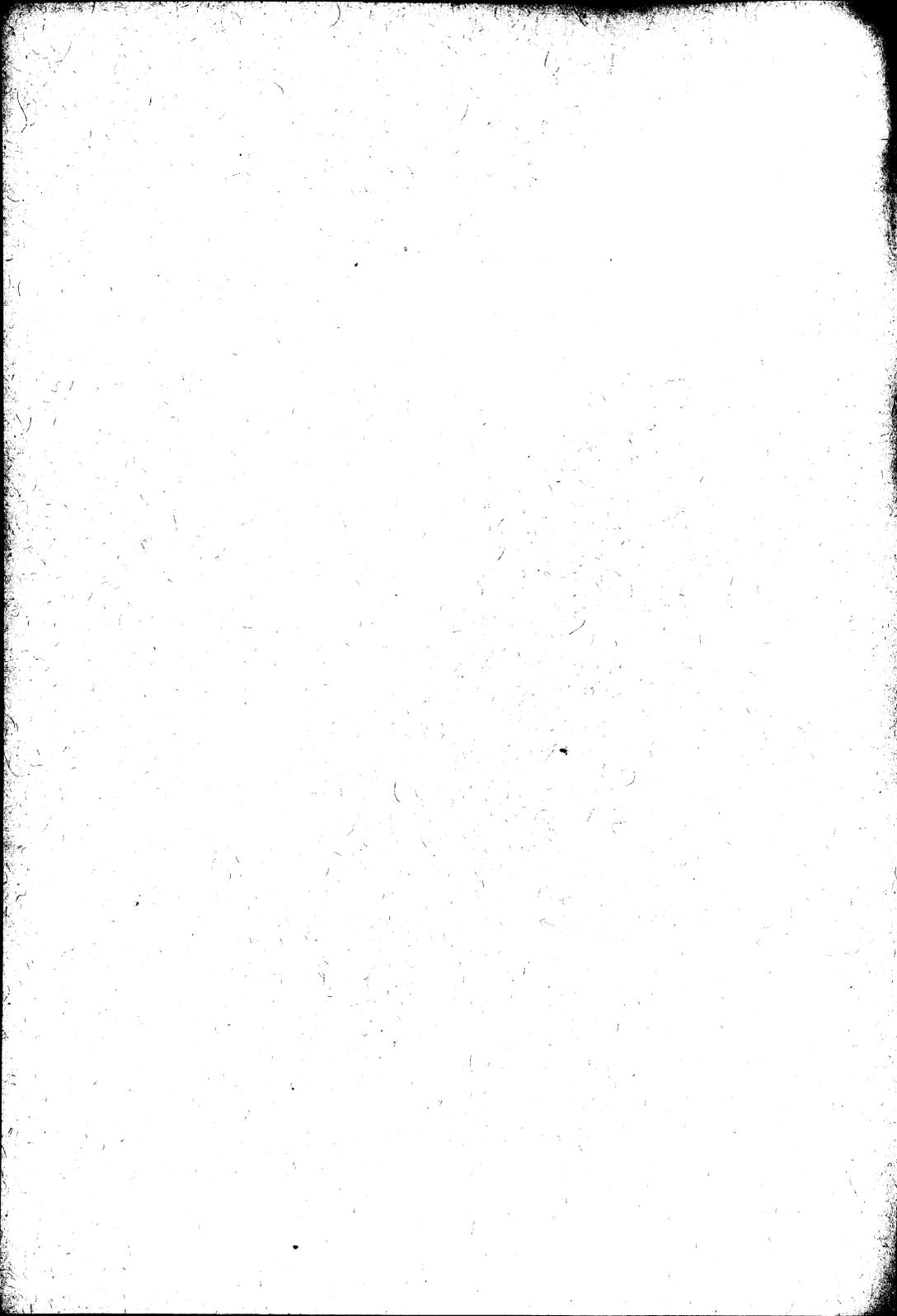
AZIONE
DELLA PARAMINOBENZENSULFAMIDE-PIRIDINA
SUL BACILLO DI KOCH « IN VITRO »

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
Anno V N. 1-2 Pag. 138-144



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Morosini, 17

1941-XIX



AZIONE DELLA PARAMINOBENZEN SULFAMIDE-PIRIDINA
SUL BACILLO DI KOCH « IN VITRO »

GIUSEPPE DI GERONIMO

La paraminofenilsulfonamide e i suoi derivati, dopo la scoperta del DOMAGH (1, 2, 3) usati nella cura di alcune malattie infettive sono oggi argomento di studio preferito dagli sperimentatori che cercano di precisarne meglio il meccanismo e l'ambito d'azione.

Era logico che un preparato che aveva dimostrato tanta efficacia in varie malattie infettive, venisse studiato anche nei riguardi della tubercolosi: in questo campo, per rimanere solo nell'osservazione del lato sperimentale del problema, si sono distinti gli studiosi americani che però non hanno avuto risultati univoci e concordanti nei numerosi esperimenti eseguiti.

DIETRICH (4) nel 1938 osservò che nelle cavie da lui infettate di tubercolosi una dose relativamente alta di protosol non solo non era riuscita a stroncare la malattia in atto, ma neanche a ridurne il progressivo sviluppo.

Tali risultati però, non concordano con quelli delle esperienze di RICH e FOLLIS (5) apparsi anch'essi nel 1938, su 50 cavie divise in tre gruppi, alle quali, somministravano dosi diverse, ma sempre cospicue, di sulfamide; essi notarono che nelle condizioni del loro esperimento, la sulfanilamide esercita un notevole effetto inibitorio sullo sviluppo delle lesioni tubercolari nelle cavie.

Inoltre, in due brevi note, SMITHBURN (6) conclude affermando di non aver osservato alcun effetto favorevole dalla somministrazione giornaliera di sulfamide, nella quantità di gr. 0,20, per via intraperitoneale; al contrario, poi, GREY, CAMPBELL e CULLEY (7) somministrando giornalmente nelle cavie, per via orale, gr. 0,10 di sulfamide, partendo tre giorni prima dell'avvenuta infezione, hanno notato un effetto inibitorio sullo sviluppo delle lesioni, mentre l'effetto è stato nullo allorchè l'infezione tubercolare era stata determinata 15-20 giorni prima dell'inizio del trattamento.

A risultati negativi sull'infezione tubercolare sperimentata nelle cavie giunsero anche KOLMER, RAIZIS e RULES (8) nonchè STEINBACH e DILLON (9).

Nello studio eseguito da COHN (10) per osservare l'effetto della sulfamide « in vitro » sulla sopravvivenza del bacillo tubercolare umano, fu trovato che dopo il contatto di volumi eguali di una soluzione satura del preparato, circa 1%, da 1 a 24 ore a 37 gradi e di una sospensione di 1/10.000 di mgr. di bacilli di Koch per centimetro cubico, non vi fu alcun effetto sulla vitalità del bacillo.

Anche BULLON e GUERNON (11) hanno studiato l'influenza della sulfanilomide sullo sviluppo del bacillo tubercolare « in vitro » e i suoi effetti sulla tubercolosi sperimentale delle cavie. La sulfanilamide era preparata alla di-

luizione di 0,50, 1 % e di poi portata alle diverse diluizioni seguenti 1 : 100 ; 1 : 000 ; 1 : 10.000 ; 1 : 25.000 ; 1 : 100.000. Dopo tre settimane, nelle colture trattate con le due prime concentrazioni di sulfamide, non si riscontrò alcuno sviluppo di germi ; nelle altre trattate con forti diluizioni, al contrario, si ebbe rigoglioso sviluppo di germi e dopo 6 settimane i risultati erano rimasti eguali, salvo con le colture trattate con sulfamide alla diluizione di 1/10.000 le quali, dopo questo periodo, mostrarono anch'esse uno sviluppo abbondante di bacilli tubercolari.

In una seconda serie di esperimenti, i detti AA. usarono sospensioni di bacilli di Koch più ricche di bacilli ; rimasero sterili in questa serie le colture trattate con soluzioni di sulfanilamide all'1/1.000, qualche sviluppo ai ritardi si ebbe nelle colture trattate con soluzione 1/5.000 e appena accenni di ridotto sviluppo con la soluzione all'1/10.000. Dagli stessi AA. fu compiuta una terza serie di esperienze, adoperando una sospensione scarsa di bacilli ; la sulfanilamide fu usata alla diluizione 1 : 1.000 ; 1 : 2.500 ; 1 : 5.000 ; 1 : 7.500 ; 1 : 10.000. Tutte le provette di controllo dimostrarono un notevole sviluppo di bacilli tubercolari, quella dell'esperimento con sulfanilamide 1 : 1.000 ; 1 : 2.500 ; 1 : 5.000, dopo tre settimane erano ancora completamente sterili ; alla distanza di sei settimane però, si notò anche in esse un discreto sviluppo di bacilli.

BULLON e GUERRON saggiarono inoltre l'azione battericida della sulfacilamide sul bacillo tubercolare usando le solite diluizioni del farmaco su colture provenienti da liquido pleurico in cui era stata constatata la presenza di bacilli di Koch e non riscontrarono alcun'azione battericida dopo un periodo di incubazione di 144 ore alla temperatura di 37°. Nelle loro indagini sperimentali sul campo della tubercolosi provocata nelle cavie, BULLON e GUERNOY (12) hanno constatato un effetto inibitorio sullo sviluppo e l'andamento della malattia, confermando così le ricerche di RICH e FOLLIS.

COURMONT, MOREL e PÉRIER (13) studiarono l'azione di diversi derivati sulfamidici su colture omogenee di bacilli di Koch in brodo glicerinato, pervenendo alle seguenti conclusioni « i risultati sembrano interessanti in quanto i preparati sulfamidici non sono inattivi « in vitro » sul bacillo di Koch ; essi impediscono per diversi giorni ogni sviluppo apparente dei bacilli e le colture molto scarse oppure appena all'inizio alla fine di tre settimane non si sviluppano presentando un intorbidamento omogeneo, ma nei gruppi depositati al fondo e con germi a forma alterata ».

E per terminare riferiremo sull'importante lavoro sperimentale di CORPER, COHN e BOWER (14) del 1939, i cui risultati si possono così compendiare : la somministrazione di forti dosi di sulfanilamide per un lungo periodo di tempo, sia per via parenterale che per via enterale, iniziata prima o contempraneamente all'infezione con bacilli tubercolari umani, virulenti, ha esplicato solo una modesta azione contro l'infezione tubercolare.

Con queste ricerche ci siamo proposti di osservare se la paraminobenzen-sulfamide-piridina (tioseptale) incorporata nei terreni di cultura esercitasse o meno un'azione inibitrice sulla crescita del bacillo di Koch e se il contatto per un periodo di tempo più o meno prolungato di volumi eguali di soluzioni di sulfamide-piridina e di sospensioni di bacilli tubercolari attenuasse o impedisse lo sviluppo dei germi o modificasse i caratteri delle colture stesse. Quale terreno di coltura abbiamo adoperato quello solido di Petraghani, che presenta su tutti gli altri notevole superiorità come risulta da una numerosissima serie di lavori italiani e stranieri [DADDI (15)].

Poichè la sulfamide-piridina (gentilmente concessa dalla « Farmaceutica Italia » non era solubile in acqua, l'abbiamo sciolta a caldo alla temperatura di 60° in soluzione decinormale di acido cloridrico, aggiungendo poi altrettanta soluzione decinormale di soda avendo così una reazione neutra. In tal modo la soluzione di sulfamide-piridina aggiunta al terreno, ne lasciava inalterato il colore.

Così, una soluzione di 100 mgr. di sulfamide-piridina in 10 cc. di soluzione decinormale di acido cloridrico, neutralizzata con 10 cc. di soluzione normale decima di soda, preparata all'istante, veniva aggiunta al terreno di Petragrani normale (glicerinato al 3 %) al momento in cui si deve aggiungere il verde di malachite; per ogni 50 cc. di terreno si aggiungevano le dosi seguenti: mgr. 50 di sulfamido-piridina corrispondenti a 10 cc. della soluzione neutra predetta e successivamente mgr. 25, 10 e 5 corrispondenti rispettivamente a cc. 5, 2 1/2 e 1 dalla soluzione sulfamido-piridina.

Abbiamo, di proposito, preparato la soluzione di sulfamido-piridina alquanto concentrata (5 %) per evitare che il terreno di coltura potesse essere alterato dalla presenza di un'eccessiva quantità di liquido.

Il terreno di Petragrani addizionato con la sulfamide-piridina veniva ripartito in 5 provettoni per ogni dose del preparato ed in data 30 dicembre 1939 ogni provettone venne seminato con cc. 0,30 di una sospensione di una coltura fresca di b. di Koch su terreno Vallée contenente 1/10.000 di mgr. di germi per cc.

Vennero poi eseguiti per ogni gruppo predetto di provettoni due semine controllo, mettendosi nelle stesse condizioni sperimentali. Le letture dell'andamento delle esperienze venivano fatte ogni settimana. Abbiamo così osservato che mentre fin dalla seconda settimana i provettoni di controllo contenevano innumerevoli colonie, a patina, in quelli con sulfamide piridina mentre si osservavano numerose piccole colonie nei provettoni con la dose di sulfamide piridina di 5 mgr., il numero di esse andava a mano a mano riducendosi con le dosi maggiori. Dopo un mese, la notata differenza fra i controlli e i provettoni con sulfamide piridina era ancora più accentuata, pur avendosi un aumento del numero delle colonie sviluppate sul terreno sulfamido piridinico. Tale differenza era maggiore nei provettoni con dosi più forti di sulfamide.

Dopo due mesi dalla semina, mentre nei tubi controllo si notava un rigoglioso sviluppo di numerosissime colonie, nei provettoni con sulfamide lo sviluppo era abbondante, se pur minore che nei controlli, per la dose di 5 mgr.; colonie molto numerose si notavano anche per la dose di 10 mgr.; un minor numero per quella di 25 mgr. e uno scarso numero per la dose di 50 mgr. (v. tabella n. 1 a pag. seg.).

Poichè si era così osservato che la sulfamide piridina, aggiunta al terreno di Petragrani ritardava la crescita del b. di Koch e ne diminuiva, progressivamente con l'aumentare delle dosi, il numero delle colonie, abbiamo voluto vedere se con dosi ancora più forti di sulfamide piridina si potesse arrivare ad ottenere un'inibizione completa dello sviluppo del b. di Koch. A tale scopo abbiamo istituito un'altra esperienza aggiungendo ad ogni dose di 50 cc. di terreno Petragrani rispettivamente dosi di 75, 100, 125 e 150 mgr., di sulfamide piridina, sciolti con le modalità anzidette.

In data 1° marzo 1940 abbiamo seminato, con una sospensione di una coltura fresca di b. di Koch Vallée contenente 1/10.000 di mgr. per cc. e terreni di Petragrani addizionati con queste più forti dosi di sulfamido piridina, portando in ogni provettone cc. 0,30 della sospensione.

Oltre alla semina di controllo eseguita nel precedente esperimento, ne venivano eseguite delle altre su terreno di Petragrani cui era stato aggiunto,

al posto della soluzione sulfamide piridinica, un'eguale quantità di solvente neutralizzato dalla soluzione stessa.

Le letture dell'andamento di questa seconda prova venivano fatte settimanalmente. Si è potuto osservare che mentre i provettoni di controllo fin dalla seconda settimana dimostravano la presenza di numerosissime piccole colonie, queste erano scarsissime in quei provettoni in cui erano stati ripartiti i 75 mgr. di sulfamide e completamente sterili i provettoni con dosi maggiori del preparato. Al termine di due mesi i risultati definitivi davano la presenza di numerosissime colonie a patina nelle prove di controllo, la crescita di scarse colonie sul terreno con 75 mgr. di sulfamide piridina e nessun sviluppo nei provettoni con dosi di sulfamido piridina da 100 mgr. in su.

Con quest'altra esperienza veniva così dimostrato che la sulfamide piridina aggiunta ai terreni di coltura di Petragrani nella dose di almeno 100 mgr. per 50 cc. di terreno impedisce lo sviluppo del b. di Koch (v. tabella 1).

Contemporaneamente al primo esperimento tendente a studiare l'andamento dello sviluppo del b. di Koch sul terreno solido sulfamidopiridinico, ne eseguiamo altri, al fine di vedere se dopo il contatto per un periodo di tempo vario con la soluzione di sulfamide piridina, i b. di Koch prendessero la proprietà di svilupparsi « in vitro ».

Così, preparata come precedentemente detto, una soluzione di sulfamide piridina in modo da aversi mezzo milligrammo del preparato in cc. 0,30 di soluzione e allestita una sospensione omogenea di una coltura fresca di b. di Koch su terreno Vallée, in modo da averne un decimillesimo di milligrammo in cc. 0,30 di sospensione, si univano volumi eguali alle due preparazioni e questo complesso veniva seminato nella quantità di cc. 0,60 in 5 provettoni di terreno di Petragrani dopo 3, 6, 9, 12, 15, 21, 24 e 48 ore dall'inizio del contatto.

Venivano eseguite per ogni gruppo di provettoni due semine controllo, aggiungendo al posto della soluzione di sulfamide piridina cc. 0,30 d'acqua distillata.

I risultati avuti dagli esperimenti sono stati riuniti nella tabella n. 2 in cui abbiamo riportato, per brevità, i dati riferentisi alle letture dopo 21 giorni e dopo 2 mesi. Osservando la suddetta tabella si può notare che un certo grado di inibizione si è avuta in modo trascurabile nei provettoni con semine dopo contatti più lunghi di sospensione di b. di Koch e di soluzione sulfamide piridinica al 5‰; più che sul numero delle colonie è stata richiamata la nostra attenzione sul diverso tipo delle colonie stesse che si osservavano nei provettoni. Mentre nei controlli il nostro ceppo Vallée cresceva come al solito dando colonie S. nei provettoni seminati con i b. di Koch che erano stati in contatto con sulfamide piridina, e ciò tanto più quanto più a lungo era stato il contatto stesso, lo sviluppo andava acquistando sempre più manifesto il carattere R, osservandosi grosse colonie isolate, rilevate sul terreno, a margini frastagliati con superficie rugosa. In altre parole, per effetto della sulfamide piridina il ceppo andava perdendo le sue caratteristiche colturali del tipo bovino, per acquistare quelle del tipo umano.

I risultati avuti dagli esperimenti portano a questa considerazioni conclusive :

1° la sulfamide piridina aggiunta in piccole dosi al terreno di coltura di Petragrani per il b. di Koch ne riduce lo sviluppo, e ne impedisce del tutto la crescita alla dose di almeno 100 mgr. per 50 cc. ;

TABELLA N. 1.

Sviluppo del *B. di Koch* su terreno di Petraggiani addizionato con dosi crescenti di soluzione neutra di sulfamide-piridina al 5‰.

DOSE	LETTURA	
	dopo 21 giorni	dopo 60 giorni
5 mgr.	++++	+++++
10 "	+++	++++
25 "	++	+++
50 "	+	+
controllo con solvente	++++	+++++
75 mgr.	+	+
100 "	—	—
125 "	—	—
150 "	—	—
controllo con solvente	+++++	+++++

TABELLA N. 2.

Sviluppo del *B. di Koch* su terreno di Petraggiani dopo contatto per tempi diversi con soluzione neutra di sulfamide-piridina alla dose di 1/2 mgr. per cc. 0.30.

DURATA DEL CONTATTO	LETTURA	
	dopo 21 giorni	dopo 60 giorni
3 h.	++++	+++++
6 "	++++	+++++
9 "	++++	+++++
12 "	+++	++++
15 "	+++	++++
21 "	+++	+++
24 "	+++	+++
48 "	+++	+++
Controllo con H ₂ O	+++++	+++++
Controllo con solvente	+++++	+++++

Valore delle crocette:

- ++++ = tutta la superficie delle provette coperta da patina spessa.
- ++++ = 4/5 della superficie delle provette.
- +++ = 3/5 " " " "
- ++ = 2/5 " " " "
- + = 1/5 " " " "

2° il contatto di una sospensione di b. di Koch con diluizioni di sulfamide piridina per 3, 6, 9, 12, 15, 21, 24 e 48 ore, nella dose di mezzo milligrammo di sulfamido piridina per un decimillesimo di milligrammo di b. di Koch produce solo una lieve riduzione del numero delle colonie che si sviluppano nei provettoni seminati. E da notare tuttavia che le colonie originatesi dalle sospensioni che erano state in contatto con la sulfamide piridina, mostravano evidenti caratteri R.

RIASSUNTO

L'A. ha studiato l'azione « in vitro » della paraminobenzen-piridina (tioseptale, sul bacillo di Koch osservando che :

- 1) la sulfamide piridina, aggiunta in piccole dosi al terreno di cultura di Petragrani per il b. di Koch, ne riduce lo sviluppo e ne impedisce del tutto la crescita alla dose di almeno 100 mgr. per 50 cc. di terreno ;
- 2) il contatto di una sospensione di b. di Koch con una diluizione di sulfamido piridina per 3, 6, 12, 15, 21, 24 e 48 ore, nella dose di mezzo milligrammo di sulfamido piridina per un decimillesimo di milligrammo di b. di Koch, produce solo una lieve riduzione del numero delle colonie che si sviluppano nei provettoni seminati ;
- 3) le colonie originatesi dalle sospensioni che erano state in contatto con la sulfamidopiridina, mostrano evidenti caratteri R.

RÉSUMÉ

L'auteur a étudié l'action « in vitro » de la paramino-benzen-piridine (tioseptale) sur le bacille de Koch et a observé que :

- 1) La sulfamide-piridine, ajoutée en petites doses au terrain de culture de Petragrani pour le bacille de Koch, en réduit le développement et en empêche absolument la croissance à une dose d'au moins 200 mgr. par 50 cc. de terrain.
- 2) Le contact d'une suspension de bacilles de Koch avec une dilution de sulfamido-piridine pendant 3, 6, 12, 15, 21, 24, 48 heures, dans une dose d'un demi milligramme de sulfamido-piridine par 1/10.000 de milligramme de bacille de Koch, produit seulement une légère réduction du nombre de colonies qui se développent dans les éprouvettes ensemencées.
- 3) Les colonies qui naissent des suspensions, qui avaient été en contact avec la sulfamido-piridine, montrent des caractères R. assez évidents.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. untersuchte die Wirkung « in vitro » des Paraminobenzenpiridins (Tioseptale) auf die Kochbazillen und beobachtete dass :

- 1) Das, Petragranis Kochbazillennährboden in kleinen Dosen beigemischte Sulfamidpiridin die Entwicklung der Bazillen beschränke und deren Wachstum, bei einer Mindestdosis von 100 Milligramm auf 50 ccm. Nährboden, völlig verhindere.
- 2) Die 3, 6, 12, 15, 21, 24, und 48 stundelange Berührung einer Kochbazillenaufschwemmung mit einer Sulfamidverdünnung in einer Dosis von 1 Milligramm Sulfamidpiridin auf ein zehntausendtmilligramm Kochbazillen, verursachte bloss eine geringe Verminderung der Zahl der Kolonien die sich in den besäten Reagensgläsern entwickeln.
- 3) Die, aus des mit Sulfamidpiridin in Berührung gewesenen, Aufschwemmungen hervorgegangenen Kolonien zeigen deutliche Merkmale einer Reaktion.

SUMMARY

The author has studied the action « in vitro » of the paraminobenzopyridine (tio-septal) on the Koch bacillus, observing that :

1) Sulfapyridin, added in small doses to the Petragnani culture medium for the Koch bacillus, reduces its development and completely prevents the growth of the dose by at least 100 mgr. for 50 cc. of culture medium.

2) The contact of a suspension of the Koch bacillus with a dilution of sulfapyridin for 3, 6, 12, 15, 21, 24 and 48 hours, in a dose of one-half milligramme of sulfapyridin to one-tenthousandth of a milligramme of Koch bacillus, produces only a slight reduction of the number of colonies that develop in the test-tubes.

3) The colonies originating in the suspensions that had been in contact with the sulfapyridin show evident R. characteristics.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DOMAGK. — « Deut. Med. Wschr. », 7, 251, 1935.
- (2) ID. — « Klin. Wschr. », 41, 1585, 1936.
- (3) ID. — « Klin. Wschr. », 41, 1412, 1937.
- (4) DIETRICH. — « Americ. Rev. Tuberc. », 1938, 38, 388.
- (5) RICH e FOLLIS. — « Bull. Joh. Hopk. Hosp. », 1938, 6, 77.
- (6) SMITHBURN. — « Proc. Soc. Exp. Biol. e Med. », 1938, 38, 574.
- (7) GREEG, CAMPBELL, CULLEY. — « Proc. Soc. Exp. Biol. e Med. », 1938, 39, 22.
- (8) KOLMER, RAIZISS, RULE. — « Proc. Soc. Exp. Biol. e Med. », 1938, 39, 581.
- (9) STEIMBACH e DILLON. — In NAIER e STEIMBACH. « Americ. Rev. Tub. », 1939, 4, 470.
- (10) COHN. — « Journ. Bacter. », 1934, 27, 517.
- (11) BULLON e GUERNON. — « The Journ. Trhorac. Surgery », *dic.* 1938.
- (12) ID. — « The Journ. Trhorac. Surgery », *dic.* 1938.
- (13) COURMONT, MOREL, PERIER. — « Comp. Ren. Soc. Bio. », 1938, 3, 663.
- (14) CORPER, COHN e BÖWER. — « Americ. Rev. Tuberc. », 1939, 4, 452.
- (15) DADDI. — Il bacillo di Koch. Ed. Cappelli, Bologna.



59662



