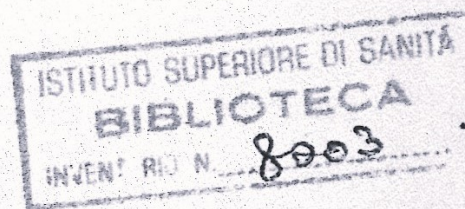


# RENDICONTI

## ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

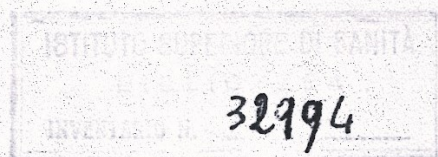


VOLUME X



ISTITUTO SUP. SANITÀ  
UFF. CONSIGNATARIO  
RIC. NE II CTG. - INV. N.

42387



ROMA: FONDAZIONE EMANUELE PATERNÒ  
VIALE REGINA MARGHERITA, 299 - ANNO 1947

**29. Brenno BABUDIERI – Controllo di attività di preparati di penicillina.**

L'importazione in Italia della penicillina anglosassone e la comparsa sul mercato di antibiotici di produzione nazionale, rendono urgente l'elaborazione di un metodo semplice e sufficientemente preciso, che permetta di controllare l'attività di tali prodotti.

Un tale metodo standard è inoltre di grande utilità nei molti laboratori scientifici dove attualmente le ricerche sulla penicillina e su altri antibiotici hanno larghissima diffusione.

Com'è noto, la penicillina si dosa in unità Oxford (U.O.) che secondo FLOREY e JENNINGS (<sup>1</sup>) corrispondono alla quantità di penicillina che aggiunta a 50 cc. di brodo riesce ad impedire in esso completamente lo sviluppo di un determinato ceppo di stafilococco aureo (ceppo Oxford).

Nell'ottobre del 1944 la Commissione permanente degli Standards della Società delle Nazioni, ha fissato a Londra l'unità internazionale di penicillina. Tale unità viene definita come l'attività specifica contenuta in 0,6 $\gamma$  di un campione standard internazionale di sale sodico puro di penicillina, conservato nel National Institute for Medical Research di Londra.

Essa corrisponde press'a poco all'originale unità Oxford.

E' noto invece che le unità usate nel dosaggio di altri antibiotici, quali la streptomicina e la streptotricina non hanno per ora riferimento ad un campione standard, e misurano la quantità minima di sostanza antibiotica sufficiente ad inibire la crescita di un determinato germe standard in 1 cc. di brodo.

Molti, e più o meno semplici e pratici sono i metodi elaborati dai vari AA. per procedere al dosaggio delle sostanze antibiotiche e non intendo enumerarli qui tutti. I più diffusi si possono però praticamente ridurre a due: il dosaggio mediante diluizioni scalari del prodotto in brodo, e il dosaggio su piastra di agar.

Il primo metodo è il più semplice. Si tratta di preparare una serie di provette contenenti una quantità misurata di brodo (in genere 5 cc.) e di aggiungere ad esso dosi scalari del prodotto in

esame. Si versa poi in ciascuna provetta una goccia di una cultura di 24 ore dello stafilococco Oxford e si mette ad incubare per 24 ore. Si determina quindi la quantità minima di antibiotico che ha inibito completamente la crescita del germe nella provetta. Tale quantità corrisponde a 1/10 U.O.

Questo metodo è molto semplice ma soggetto a facili cause di errore. In primo luogo riesce spesso difficile a stabilire se in una provetta il brodo è rimasto perfettamente limpido o se c'è già un inizio di intorbidamento, tanto che gli AA. anglosassoni ritengono generalmente che questo metodo comporti errori del 10 e anche del 20%.

Anche il metodo opacimetrico proposto da FOSTER (<sup>2</sup>) per ovviare a questo inconveniente, non dà sensibili vantaggi.

Inoltre alcuni antibiotici poco depurati possono dare di per sé un notevole intorbidamento del brodo, e quindi non si possono dosare con questo metodo.

Il dosaggio su piastre di agar è stato il primo ad essere impiegato da ABRAHAM e dagli altri collaboratori di Oxford, e, com'è noto, consiste nel piazzare sulla superficie di una piastra di agar germi, piccoli cilindri di vetro lunghi 1 cc. e di 5,4 mm. di diametro interno. Ciascun cilindro viene riempito con una soluzione del prodotto in esame, e la piastra viene quindi messa in termostato per 15-16 ore. Si determina poi sulla piastra il diametro della zona di inibizione. Questa, per una soluzione contenente 1 U.O. per cc., è di 2,4 cm.

Questi metodi o altri metodi simili, vengono largamente impiegati e in genere con buoni risultati. Sono però più indaginosi di quello in brodo, e la preparazione e la posa dei cilindretti di vetro sono abbastanza spesso causa d'inesattezze ed errori. Ho ritenuto perciò più opportuno ricorrere, standardizzandolo, al metodo che CALLERIO (<sup>3</sup>) ha di recente descritto in « Clinica Nuova » e che è stato del resto usato in Italia anche da DAVOLI e collaboratori (<sup>4</sup>).

Per praticare tale controllo occorre poter disporre di:

piastre di vetro sterili, a fondo piano, di 9,1 cm. di diametro interno;

provettoni contenenti 15 cm. di agar al 2 % a pH = 7,4;

soluzione tampone sterile di fosfati a  $\text{pH}=7,4$  (2 cc. di soluz. M/15 di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 8 cc. di soluz. M/15 di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ );

una cultura in brodo, di 24 ore, dello stafilococco aureo « Oxford »;

un cilindro metallico ad orlo tagliente, di 7 mm. di diametro esterno (1);

un vaccinostilo montato su di una penna;

pipette graduate da 0,10 e 1 cc.

Il controllo del prodotto in esame viene praticato come segue :

Si scioglie l'agar a bagnomaria e lo si raffredda poi a  $40^\circ$ .

Si versa sul fondo della piastra 1/2 cc. di brodocultura di 24 ore del ceppo « Oxford ».

Si versa nella piastra l'agar sciolto a  $40^\circ$  e con adatti movimenti impressi alla piastra, lo si mescola in modo omogeneo con la brodocultura.

Si lascia quindi solidificare l'agar deponendo la piastra su di un piano perfettamente orizzontale.

Dopo alcune ore, si praticano, col cilindro metallico sterilizzato alla fiamma, a distanze regolari, alcuni fori nell'agar, evitando di farli al centro della piastra, perchè lì il fondo è quasi sempre un po' sollevato e quindi lo spessore dell'agar più ridotto.

In genere si possono praticare 5 o 6 fori per piastra.

Con il vaccinostile, sterilizzato alla fiamma, si allontanano facilmente i dischetti di agar determinati dal cilindro. Risultano così 5 o 6 piccoli pozzetti.

---

(1) A questo scopo si potrebbe usare un comune foratappi. Questo presenta però l'inconveniente che l'orlo è assottigliato a spese della parete esterna, sì che in sezione ha la forma di un tronco di cono a base superiore. Perciò, quando lo si infigge nell'agar tende ad allargare il foro che pratica, determinando con facilità piccole fratture dell'agar, dannose ai fini della prova. Ho ritenuto perciò opportuno far costruire un cilindro in cui l'assottigliamento dell'orlo si ottiene a spese della parete interna, evitando così l'inconveniente di cui sopra.

Con il preparato antibiotico in esame si prepara una serie di diluizioni scalari, servendosi, come diluente, della soluzione tampone.

In ogni pozzetto si versano 0,05 cc. di diluizione.

La capsula viene quindi tenuta a 37° per 24 ore, dopo di che si procede alla lettura del risultato. Sul fondo opaco, costituito dall'agar-germi spiccano molto bene, attorno ad ogni pozzetto, i trasparenti aloni di inibizione.

Il diametro di tali aloni è proporzionale all'attività dello sostanza antibiotica. Tale proporzione non è già una funzione aritmetica, come erroneamente afferma MOHS (5), ma bensì una funzione logaritmica, come tra gli altri hanno rilevato anche DAVOLI e collaboratori (4).

Ho voluto determinare una curva di attività della penicillina, servendomi come indicatore del diametro dell'alone d'inibizione, per vedere se tale metodo permette un dosaggio sufficientemente esatto dell'attività di un antibiotico.

Mi sono servito a questo scopo di 6 campioni di penicillina, di attività nota, in parte del commercio, in parte di mia preparazione.

Ho allestito con tali campioni numerose diluizioni e con queste ho praticato 225 determinazioni. Utilizzando la formula di Student:

$$R = A \pm (m + m_1)$$

$$\text{dove} \quad m = \frac{\sqrt{\frac{\sum (x^2)}{n-1}}}{\sqrt{n}} \quad \text{e} \quad m_1 = \frac{m}{\sqrt{2n}}$$

(R = risultato vero

A = media aritmetica delle osservazioni

m = errore medio probabile

m<sub>1</sub> = errore medio probabile degli errori medi

n = numero delle osservazioni

x = distacco delle singole osservazioni da A.).

ho ottenuto i seguenti risultati:

| U.O.<br>per cc. | A<br>(in cm.) |       | m + m <sub>1</sub><br>(in cm.) |
|-----------------|---------------|-------|--------------------------------|
| 0,05            | 0,85          | $\pm$ |                                |
| 0,075           | 1,10          | $\pm$ | 0,035                          |
| 0,1             | 1,23          | $\pm$ | 0,012                          |
| 0,16            | 1,55          | $\pm$ | 0,016                          |
| 0,2             | 1,66          | $\pm$ | 0,030                          |
| 0,25            | 1,80          | $\pm$ | 0,014                          |
| 0,3             | 1,91          | $\pm$ | 0,038                          |
| 0,4             | 2,01          | $\pm$ | 0,043                          |
| 0,5             | 2,15          | $\pm$ | 0,127                          |
| 0,6             | 2,275         | $\pm$ | 0,039                          |
| 0,75            | 2,37          | $\pm$ | 0,023                          |
| 0,8             | 2,43          | $\pm$ | 0,023                          |
| 1,0             | 2,54          | $\pm$ | 0,029                          |
| 1,2             | 2,69          | $\pm$ | 0,054                          |
| 1,5             | 2,75          | $\pm$ | 0,055                          |
| 1,6             | 2,79          | $\pm$ | 0,064                          |
| 2,0             | 2,89          | $\pm$ | 0,036                          |
| 2,4             | 2,99          | $\pm$ | 0,026                          |
| 3,0             | 3,075         | $\pm$ | 0,040                          |
| 3,15            | 3,19          | $\pm$ | 0,130                          |
| 4,0             | 3,16          | $\pm$ | 0,060                          |
| 4,5             | 3,27          | $\pm$ | 0,124                          |
| 5,0             | 3,22          | $\pm$ | 0,171                          |

Tali dati mi hanno permesso di tracciare la curva qui riprodotta, in cui la linea continua sta ad indicare la media aritmetica delle determinazioni e le linee punteggiate il limite superiore e quello inferiore dell'errore medio probabile (fig. 1).

Riportando invece i dati su carta a divisione logaritmica in senso orizzontale è possibile delineare una retta che non esce dai confini dell'errore probabile e che ci permette di determinare, en-

tro certi limiti, il valore in unità di un -antibiotico, qualora si conosca il diametro dell'alone di inibizione che esso determina nell'agar-germi (fig. 2).

Tale determinazione si può praticamente fare fino al limite massimo di 3 U. per cc.; oltre a questo valore l'errore medio pro-

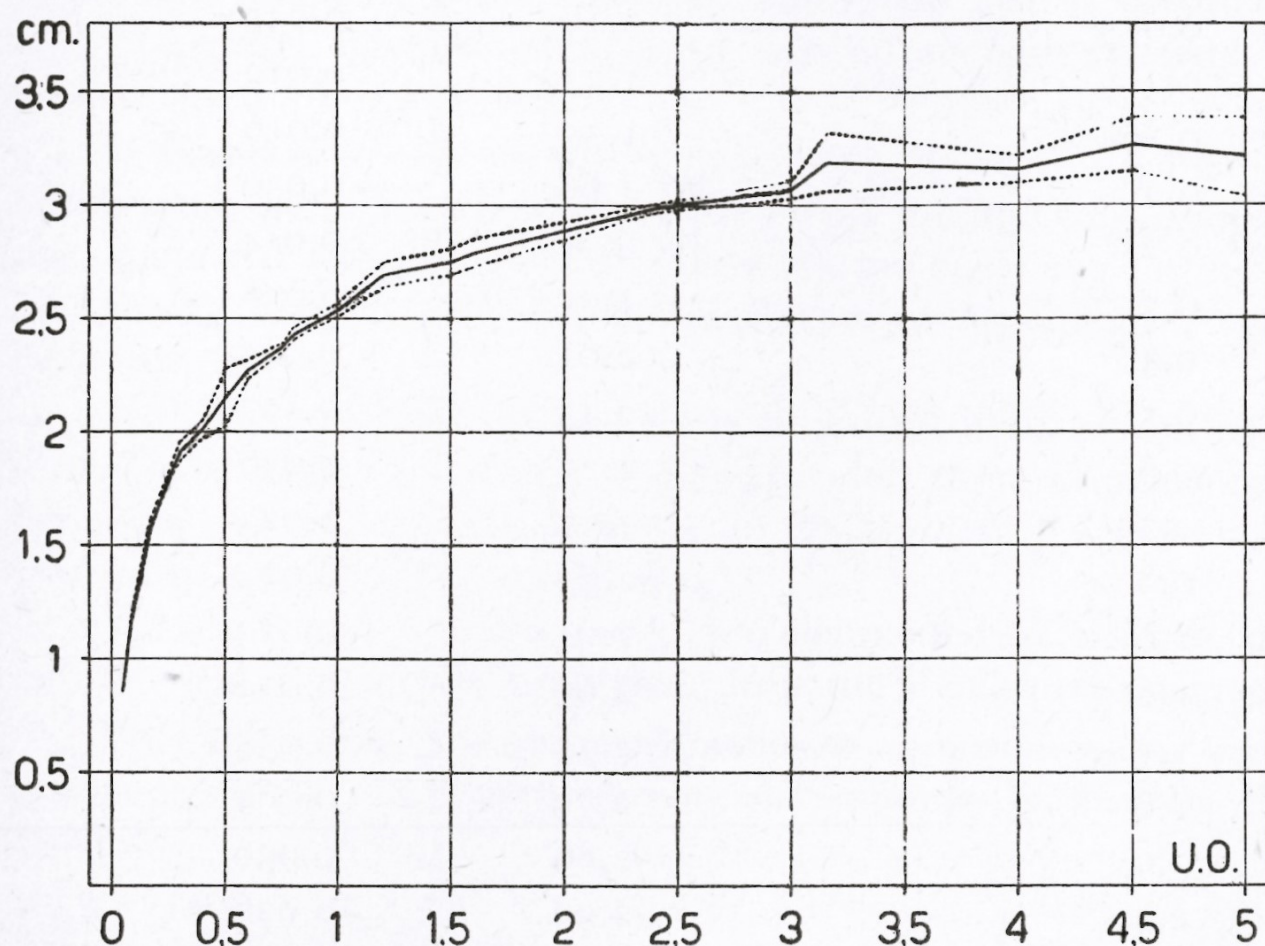


Fig. 1

babile assume un valore tale da rendere malsicura la determinazione esatta del potere antibiotico.

Non si sono avute differenze degne di nota dall'usc dei vari campioni di penicillina usati, alcuni dei quali erano altamente purificati, altri bruti. Dallo studio del grafico si può agevolmente dedurre la formula che determina i rapporti intercorrenti fra il diametro dell'aera di inibizione e il valore in U. O. della penicillina in esame.

La formula è la seguente :

$$D = K \log U + A$$

dove  $D$  = diametro dell'area di inibizione

$U$  = U. O. per cc. della diluizione

$A$  = valore sperimentale di  $D$  per un determinato valore di  $U$

Dal grafico si deduce che:

Per  $U = 1$  ,  $D = A$  cioè  $A = 2,53$

Prendendo ora un valore di  $U$  diverso da 1, a esempio, 2, abbiamo:

$$2,92 = K \log 2 + 2,53$$

$$0,39 = K 0,301$$

$$K = \frac{0,39}{0,301} = 1,29$$

Da ciò si deduce che:

$$S = 10^{\frac{D - 2,53}{1,29}}$$

In complesso ritengo che tale metodo di dosaggio, più semplice di quello originale di Abraham e collaboratori, possa trovare utile impiego nel dosaggio della penicillina e degli altri antibiotici.

In pratica, dovendosi per lo più dosare soluzioni il cui contenuto in unità è per lo meno approssimativamente noto, si preparerà una diluizione tale che contenga da 0,075 a 3 U. O. per cc. Si allestirà poi una piastra di agar-germi praticando in essa 5 fori. In due di questi si verseranno 0,05 cc. di una soluzione nota di penicillina contenente 1 U. O. per cc., come controllo, negli altri tre si verseranno 0,05 cc. della soluzione in esame. Dopo 24 ore si determinerà con un compasso il valore dei diametri delle singole aree d'inibizione. Si calcolerà quindi il valore  $R$ . di tale diametro e portando tale valore sulla retta standard tracciata sulla carta logaritmica, si leggerà agevolmente sulle ascisse il contenuto in UO del campione in esame.

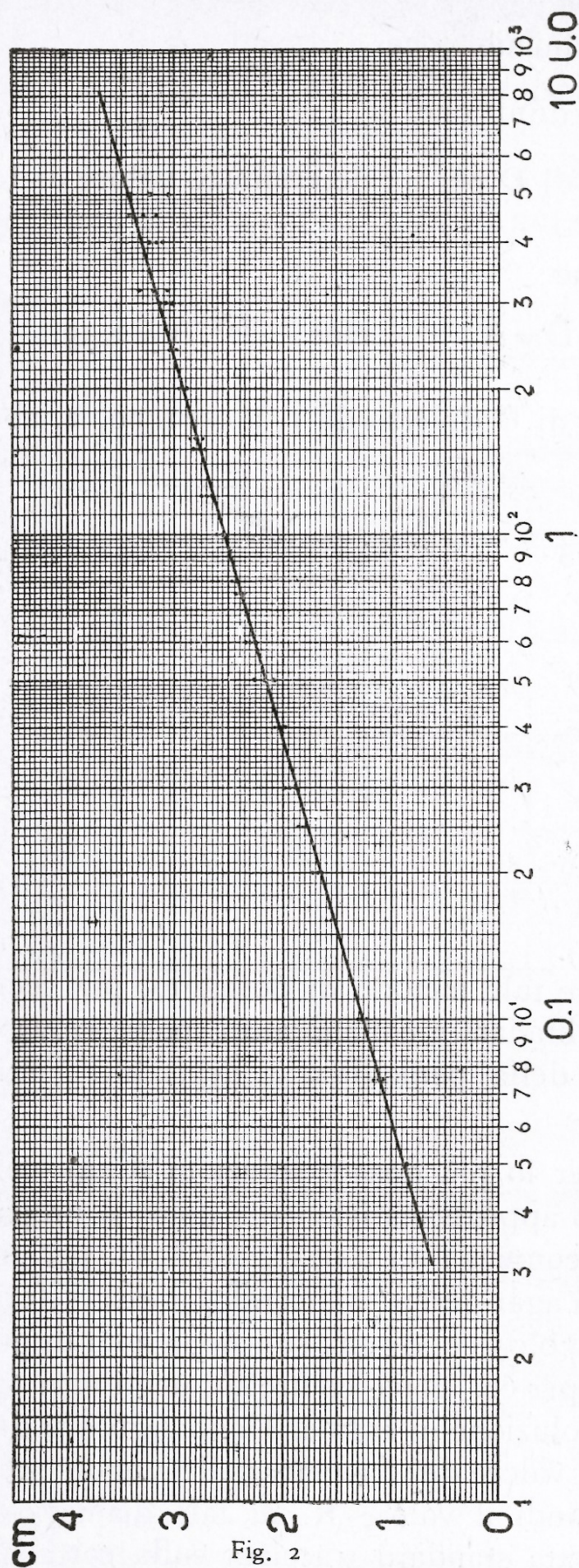


Fig. 2

sce nella piastra in modo uniforme e presenta differenze di spessore alle volte notevoli: dove l'agar è meno spesso, l'alone d'ini-

Il medesimo metodo potrà essere impiegato anche per determinare la penicillino-sensibilità relativa di un germe. In tale caso l'agar-germi verrà naturalmente preparato con il germe in esame, e in ciascun pozzetto si verseranno 0,05 cc. di una soluzione di penicillina contenente 1 U.O. per cc. Con il solito sistema si determinerà il valore R. dei diametri.

La sensibilità del ceppo alla penicillina, raffrontato con il ceppo Oxford, sarà dato anche in tale caso dalla formula

$$S = 10^{\frac{D - 2.53}{1.29}}$$

Restano da fare alcune osservazioni sull'impiego pratico di questo metodo e sulle cause d'errore che esso presenta e che bisogna procurare di evitare. Una delle più frequenti cause di errore è data dai difetti che il fondo delle piastre comuni spesso presenta, per cui il vetro, invece d'essere perfettamente orizzontale, presenta rigonfiamenti o sollevamenti. Ne consegue che l'agar non si distribui-

bizione tende a raggiungere valori superiori alla media e viceversa. Di solito, come ho già detto, lo spessore minimo dell'agar si ha al centro della piastra e bisogna perciò evitare di praticare fori in tale zona. Convienè altresì scartare le piastre a fondo molto difettoso. A questo grave inconveniente si può ovviare usando invece della piastra una lastra di vetro, su cui si appoggia un basso cilindro di metallo, di 9,1 cm. di diametro, composto di due sezioni articolate tra di loro. Questo cilindro serve per delimitare

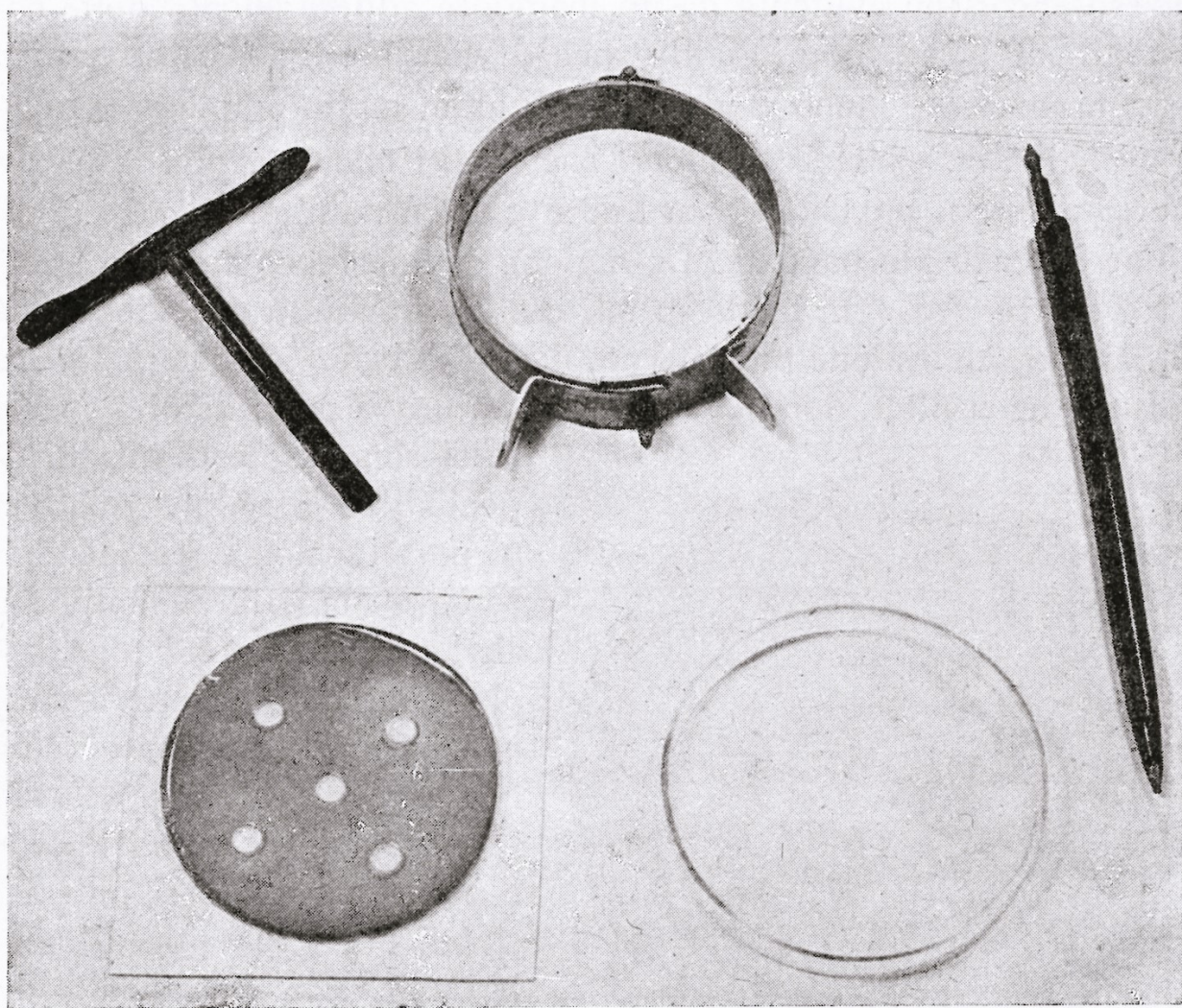


Fig. 3

la superficie che dovrà essere ricoperta dall'agar-germi e si può togliere dopo che questo si è solidificato. L'agar-germi sarà successivamente ricoperto e protetto da un coperchio di capsula (fig. 3.)

Ricordo che le mie determinazioni sono state praticate su piastre comuni a fondo tutt'altro che perfetto, e che probabilmente, usando piastre a fondo perfettamente orizzontale, o lastre di vetro, i limiti dell'errore probabile verrebbero ulteriormente ristretti.

Si potrebbe pensare che l'antibiotico possa diffondersi in maniera non uniforme nello spessore dell'agar e che la diffusione sia particolarmente facile tra l'agar e il fondo di vetro. Mediante prove eseguite usando soluzioni colorate, ho potuto constatare che ciò non corrisponde a realtà e che la diffusione avviene in maniera uniforme in tutto lo spessore dell'agar.

La lettura del valore del diametro non offre in genere difficoltà. Il distacco fra la zona opaca e quella diafana è molto netto, e reso ancor più evidente da un maggiore addensamento delle colonie microbiche proprio sulla zona di confine. Tale caratteristico addensamento è meno evidente negli aloni molto ampi.

Talvolta, specie con alcuni metaboliti micetici, non si ha un unico alone di inibizione, ma due o più concentrici, in cui l'inibizione è per lo più parziale. La ragione di tale fenomeno non è ancora chiara. Ad ogni modo in tali casi si prende in considerazione il diametro dell'alone più interno, dove l'inibizione è completa. La lettura dei risultati non deve essere fatta prima di 20-24 ore, specie

se si sono usate diluizioni di penicillina a valore relativamente elevato. E ciò perchè, come è noto, la penicillina e altri antibiotici non hanno soltanto un potere batteriostatico, ma anche uno battericida ben evidente.

Si vede così che l'alone d'inibizione quale si può misurare dopo 10-12 ore d'incubazione, non ha ancora dimensioni definitive, ma che va successivamente allargandosi fino a raggiungere il suo

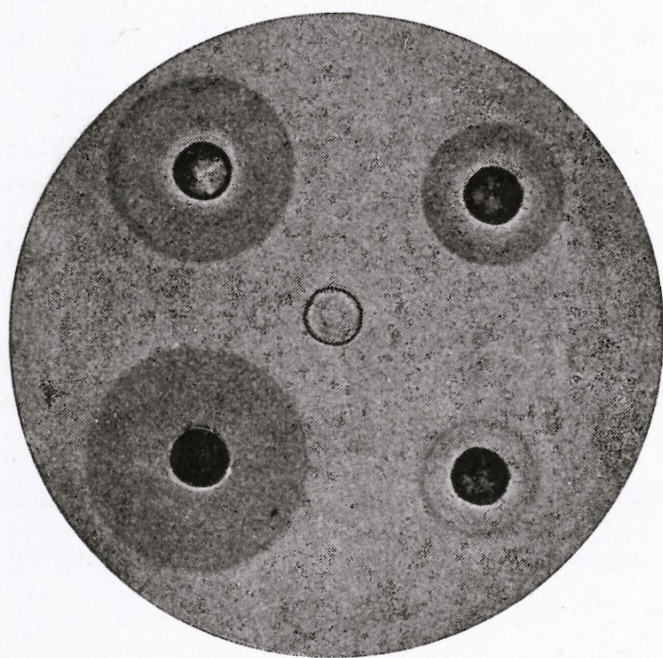


Fig. 4

diametro massimo dopo 20-24 ore d'incubazione.

Tale aumento è poco visibile o manca anche del tutto negli aloni piccoli; mentre raggiunge valori di parecchi mm. negli aloni di diametro superiore ai 3 cm.

Nel praticare controlli di antibiotici e specie di antibiotici del commercio, bisogna tenere presente anche un'altra eventua-

lità, e cioè quella che l'azione batteriostatica possa essere dovuta, del tutto o in parte, non già ad un antibiotico, bensì a qualche prodotto ad azione disinfettante.

Tale quesito deve essere praticamente posto solo qualora si tratti di prodotti che abbiano un contenuto in U.O. poco elevato. In caso contrario è infatti poco probabile che l'eventuale disinfettante possa ancora esercitare la sua azione alle forti diluizioni a cui si arriva nel dosaggio della penicillina.

Ad ogni modo si potrà sospettare una tale eventualità già dalla semplice ispezione degli aloni di inibizione nella piastra di agar-germi.

Mentre come ho detto l'area di inibizione data dagli antibiotici ha limiti molto netti e segnati anzi da un cerchio di addensamento del tutto caratteristico, l'area di inibizione data da un disinfettante, ha un aspetto molto diverso. C'è qui una fascia piuttosto ampia in cui si passa gradatamente dall'agar-germi opaco all'agar sterile, e manca del tutto il caratteristico cerchio di addensamento. Ad ogni modo qualora si volesse ricorrere ad un accertamento più preciso, si potrebbe riscaldare la soluzione in esame, sì da distruggere l'antibiotico in essa eventualmente presente, e ripetere poi con essa l'esame, per constatare se ha ancora azione batteriostatica o meno. Tale metodo non è però sicuro. In primo luogo la termolabilità della penicillina e degli altri antibiotici è piuttosto relativa. Secondo Pulvertaft e Yudkin (6) la penicillina sciolta in una soluzione di fosfati, può sopportare senza sensibile danno per alcuni minuti la temperatura di 100°. Quindi non siamo sicuri, a meno di non voler prolungare molto a lungo il riscaldamento, che tutto l'antibiotico eventualmente presente sia stato eliminato.

In secondo luogo il riscaldamento può neutralizzare o volatilizzare anche eventuali disinfettanti presenti nel prodotto.

Ritengo perciò molto più sicuro, per lo meno nel dosaggio della penicillina, l'uso della penicillinasi, il noto fermento che distrugge in modo elettivo e piuttosto rapidamente la penicillina.

La penicillinasi può essere ottenuta con facilità da una vecchia cultura in brodo di un ceppo adatto di *B. coli*.

Si può ricorrere anche ad un'altra prova e più precisamente a quella di saggiare il prodotto in esame di fronte ad un germe peni-

cillino-resistente. Si comprende che in tale caso, se il prodotto contenesse un disinfettante, provocherebbe la comparsa di un alone di inibizione che mancherebbe invece attorno ad un preparato di sola penicillina.

Un altro problema di soluzione piuttosto difficile, è quello del controllo di pomate o unguenti alla penicillina. In questi casi si potrà procedere in due modi, estraendo la penicillina con adatti solventi (etere, alcool butilico, ecc.) e tenendo conto delle perdite inevitabili in tale processo, o diluendo la pomata con lo stesso eccipiente di cui essa è costituita, e praticando un controllo con il metodo delle diluizioni scalari in brodo o anche mettendo una quantità misurata di pomata diluita nei pozzetti di una piastra di agar-germi.

In tutti e due questi casi è probabile che non tutta la penicillina contenuta nella pomata si diffonda, sì che più che un controllo dell'effettivo suo contenuto nell'unguento si avrebbe un controllo della sua reale attività pratica, cioè della quantità di penicillina che in realtà si staccerebbe dalla pomata, qualora questa fosse applicata su di una lesione.

Voglio ricordare infine che tutti questi metodi di dosaggio in vitro di antibiotici, non hanno sempre un valore assoluto, e che non c'è sempre corrispondenza fra attività in vitro e attività in vivo.

E' nota tutta una lunga serie di antibiotici attivi in vitro e del tutto inefficaci in vivo ed è possibile anche che avvenga il contrario, anche a prescindere dalla maggiore o minore rapidità di assorbimento da parte dei tessuti. Così secondo Tainter e collaboratori (7) l'estere benzilico della penicillina, pur essendo in vitro 13 volte meno attivo che il sale sodico della penicillina, è in vivo 3 volte più attivo di questa, e secondo Meyer, Hobby e collaboratori (8), gli esteri metilico, etilico e n-butilico, sono attivi soltanto in vivo, e inattivi in vitro.

Perciò quando ci si trova davanti ad un antibiotico nuovo, non bisogna mai limitarsi alle prove in vivo, ma bisogna anche ricorrere a quelle sull'animale. Per tali prove si presta bene il topino infettato con un ceppo virulento di streptococco. Non occorre dire che in tali prove è indispensabile lavorare su di un numero non troppo limitato di animali e che bisogna valutare il risultato al lume del calcolo delle probabilità.

Aggiungo ancora che nel controllo di un preparato antibiotico non bisogna trascurare il controllo della sua sterilità. Molti dimenticano che gli antibiotici non sono attivi su tutti i germi e che vi sono microrganismi che si sviluppano con facilità nelle soluzioni di penicillina o di altri antibiotici. Tali germi possono non solo annullare l'attività del prodotto (produzione di penicillinasi) ma anche, inoculati nel paziente, determinare disturbi di notevole gravità.

Ricerche eseguite su soluzioni di penicillina del commercio, mal preparate, m'hanno rivelato una percentuale molto alta d'inquinamenti, per lo più dovuti ad infomiceti, altre volte a blastomiceti o anche a schizomiceti.

Il controllo di sterilità si praticherà con le solite e ben note modalità, che non è qui il caso di esporre.

Così pure non mi soffermo sul controllo del potere piretogeno dei preparati di penicillina, perchè ciò non rientra negli scopi del presente lavoro.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di batteriologia, 28-5-1946.

#### RIASSUNTO

L'A. espone un metodo standard per il dosaggio di preparati di penicillina. Espone inoltre alcune considerazioni sui metodi di controllo dei preparati antibiotici.

#### RESUMÉ

L'A. expose une méthode pour le dosage des préparations de Péniciline. Il ajoute en outre quelques considérations sur les méthodes de contrôle des préparations antibiotiques.

#### SUMMARY

The author explains the methods of dosage of penicillin preparations. He also makes some considerations on the control methods of antibiotic preparations.

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser unterbreitet eine Dosierungsmethode der Penicillinpräparate und fügt noch einige Betrachtungen über die Kontrollmethoden der antibiotischen Präparate hinzu.

## BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) FLOREY H. W., JENNINGS M. A. Brit. J. exper. Pathol. 23, p. 120 (1942).
- (<sup>2</sup>) FOSTER J. W. J. Biol. Chem. 144, p. 285 (1943).
- (<sup>3</sup>) CALLERIO C. Clinica Nuova 1, p. 186 (1945).
- (<sup>4</sup>) DAVOLI R., BIFFI GENTILI G., PARDI A., Giorn. di Med. 2, p. 583, 1945.
- (<sup>5</sup>) MOHS F. E., J. Labor. and Clin. Med., 30, p. 800 (1945).
- (<sup>6</sup>) PULVERTAFT R. J. V.; Yudkin J. Nature 156, p. 82 (1945).
- (<sup>7</sup>) CAVALLITO C. J., KIRCHNER F. K., MILLER L. C., BAILEY J. K., KLIMEK J. W., WARNER W. F., SUTER C. M., TAINTER M. L. Science 102, p. 150 (1945).
- (<sup>8</sup>) MEYER K., HOBBY G. L.; DAWSON M. H. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 53, p. 100 (1943).