

49. B. BABUDIERI e A. GRIGNOLO - Tre nuovi metodi di microdosaggio della penicillina.

Esigenze sperimentali e necessità cliniche rendono alle volte necessaria la ricerca e il dosaggio di piccole quantità di penicillina in soluzioni o in liquidi organici.

Poichè non si dispone ancora di uno specifico metodo analitico chimico o colorimetrico della penicillina, si ricorre in questi casi a metodi biologici, basati sia sul potere batteriostatico del medicamento, sia sulla sua capacità di inibire alcune altre funzioni microbiche (luminescenza) (1).

Non è nostro intendimento enumerare qui tutta la vasta congerie dei metodi di dosaggio proposti dai vari AA. Essi, pur essendo numerosissimi, sono tutte modificazioni o variazioni di due classici metodi: *a*) il dosaggio in provette di brodo, contenenti diluizioni scalari del medicamento; *b*) il dosaggio in piastre di agar-germi.

Usando in tali prove il ceppo standard di stafilococco aureo « Oxford », ed eseguendo il dosaggio nel volume di appena 1 cc. di brodo, il primo metodo permette di mettere in evidenza quantità di penicillina non inferiori alle 0,02 U.O.

Il metodo di dosaggio in piastre di agar-germi, seguendo la tecnica elaborata da uno di noi (2), rileva al massimo, nel volume di 0,05 cc. di soluzione, quantità superiori ad un minimo di 0,002 U.O. (cioè 0,04 U.O. per cc.).

Pressochè tutte le numerose modificazioni di questi metodi non permettono di mettere in evidenza quantità di penicillina sensibilmente inferiori a quelle qui citate. Ne fa eccezione l'elegante metodo proposto da Rammelkamp (3).

Tale metodo consiste nel mettere a contatto, in tubicini capillari di vetro di 0,8 mm. circa di diametro, parti uguali di una diluizione scalare della soluzione di penicillina in esame e di una miscela composta di una parte di sangue umano reso incoagulabile mediante l'aggiunta di liquoid all'1-2 per mille, di 4 parti di soluzione fisiologica e di 0,025 parti di una cultura di 24 ore in brodo di uno streptococco emolitico.

I tubicini vengono chiusi alle due estremità, tenuti in termo-

stato a 37° in posizione orizzontale per 24 ore, quindi osservati in posizione verticale. L'assenza di emolisi o l'emolisi parziale sono indizio dell'azione batteriostatica della penicillina sullo streptococco.

Impiegando uno streptococco da noi isolato (1 BD) molto sensibile all'azione della penicillina, siamo riusciti con tale metodo a rilevare quantità di penicillina (in 0,05 cc di soluzione) dell'ordine di 0,00045 U.O. (cioè 0,009 U.O. per cc.).

Tale metodo però, per quanto molto sensibile, è piuttosto indaginoso e noi abbiamo voluto tentare di semplificarlo, accrescendone, se possibile, la sensibilità.

Dopo numerose prove e dopo aver variato in tutte le maniere possibili le modalità ed i tempi della prova e le dosi delle sostanze usate, abbiamo messo a punto il metodo d'analisi che qui esponiamo, che presenta i requisiti che c'eravamo proposti di raggiungere.

Sopra una lastra quadrata di vetro di circa 12 cm. di lato si appoggia un pesante anello di bronzo nichelato, dal diametro interno di 8,3 cm. e lo si copre col coperchio di una piastra di vetro.

Invece del vetro e dell'anello, si può usare una capsula di vetro di pari diametro a fondo perfettamente piano.

A parte si scioglie a bagno-maria un provettone contenente 9 cc. di agar all'1%, a pH 7,4. Sciolto l'agar si porta il provettone alla temperatura di 50° e vi si aggiungono 0,9 cc. di sangue umano defibrinato e 0,1 cc. di cultura di 24 ore in brodo del ceppo di streptococco emolitico 1 BD. Si mescolano i tre componenti e si versano sterilmente nell'interno dell'anello metallico (o nella capsula), che viene posato su di un piano perfettamente orizzontale.

Si lascia quindi solidificare l'agar, e quando questo è ben solido, si intagliano in esso, usando il cilindro a margine tagliente già descritto da uno di noi (2), piccoli pozzetti di 7 mm. di diametro. Se ne possono intagliare per ogni preparazione, da 10 a 20. Questi vengono opportunamente numerati, e in ciascuno di essi si versa con una pipetta graduata da 0,1 cc. la quantità di 0,05 cc. del liquido in esame. La quantità è sufficiente per riempire completamente il pozzetto, senza debordare da esso.

Le lastre vengono quindi messe in termostato alla temperatura di 37°. La lettura viene fatta non appena nelle zone distanti dai pozzetti, o attorno ad un pozzetto di controllo, contenente soltanto soluzione fisiologica, l'emolisi è completa e l'agar-sangue, guardato

per trasparenza, risulta perfettamente trasparente (Fig. 1). Ciò avviene in genere dopo 12-15 ore; alle volte dopo un tempo un po' maggiore.

Là dove la penicillina ha inibito l'attività emolitica degli streptococchi, si vedono i pozzetti contornati da un alone opaco di agar-sangue non emolizzato. Tale alone non presenta un margine netto, ma un margine sfrangiato, irregolare.

Là dove la soluzione di penicillina è molto diluita, non si forma neppure un alone di inibizione continua, ma si osserva attorno

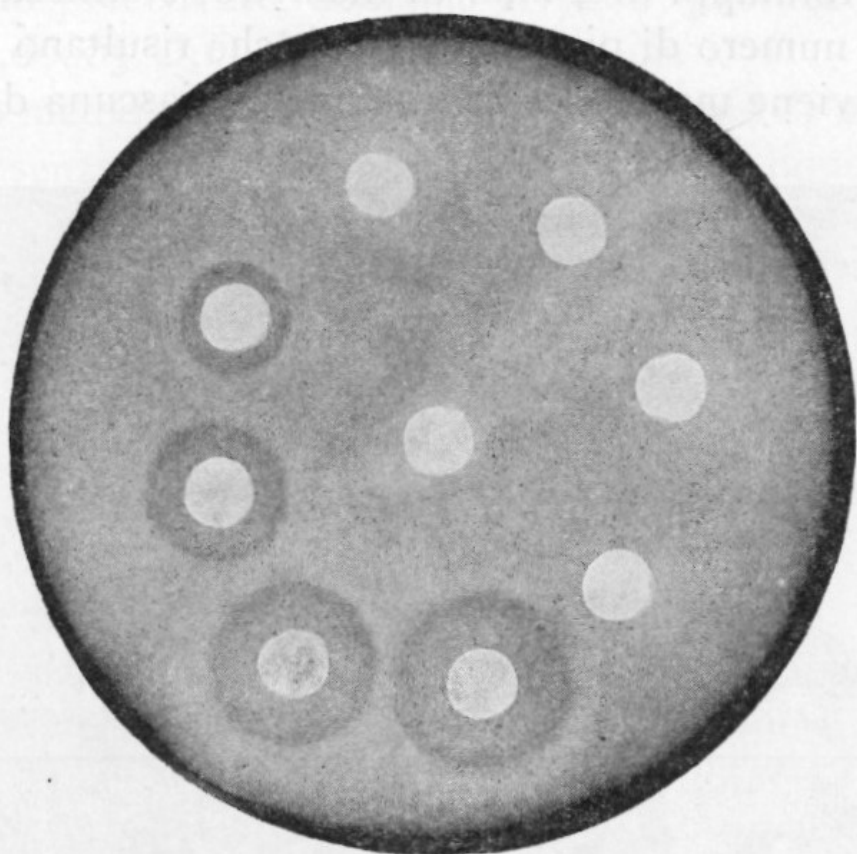


Fig. 1.

al pozzetto, soltanto qualche punto e qualche breve e sinuosa linea opaca, sufficienti però ad indicare la presenza dell'antibiotico.

Con tale metodo siamo riusciti a mettere in evidenza quantità di penicillina estremamente piccole e più precisamente, nel volume di 0,05 cc. di soluzione, quantità di appena 0,0002 U.O. (0,004 U.O. per cc.).

Successivamente a quello qui esposto, abbiamo elaborato due altri metodi di microdosaggio, che pur essendo un po' più indaginosi di questo, pure presentano alcuni vantaggi che in determinate circostanze li rendono preferibili.

Per attuare il primo di questi due metodi, occorre disporre di una piastra di porcellana la cui superficie è scavata da un certo

numero di vaschette circolari di circa 2,5 cm. di diametro. Vaschette di questo genere vengono usate dagli acquarellisti. Sulla superficie della piastra appoggia una lastra di vetro che la copre completamente. Il tutto viene sterilizzato in autoclave. A parte si prepara la già descritta miscela di agar-sangue-streptococco, e di questa si versano $3,25 \text{ cm}^3$ nell'anello già descritto. E' consigliabile perchè l'agar si distenda in modo uniforme, riscaldare prima la lastra di vetro.

Quando l'agar è bene solidificato, si stampano in esso, per mezzo di un foratappi di 4 mm. di diametro, sterilizzato alla fiamma, un certo numero di piccoli dischetti, che risultano alti 0,5 mm. Di questi ne viene messo sterilmente uno in ciascuna delle vaschet-

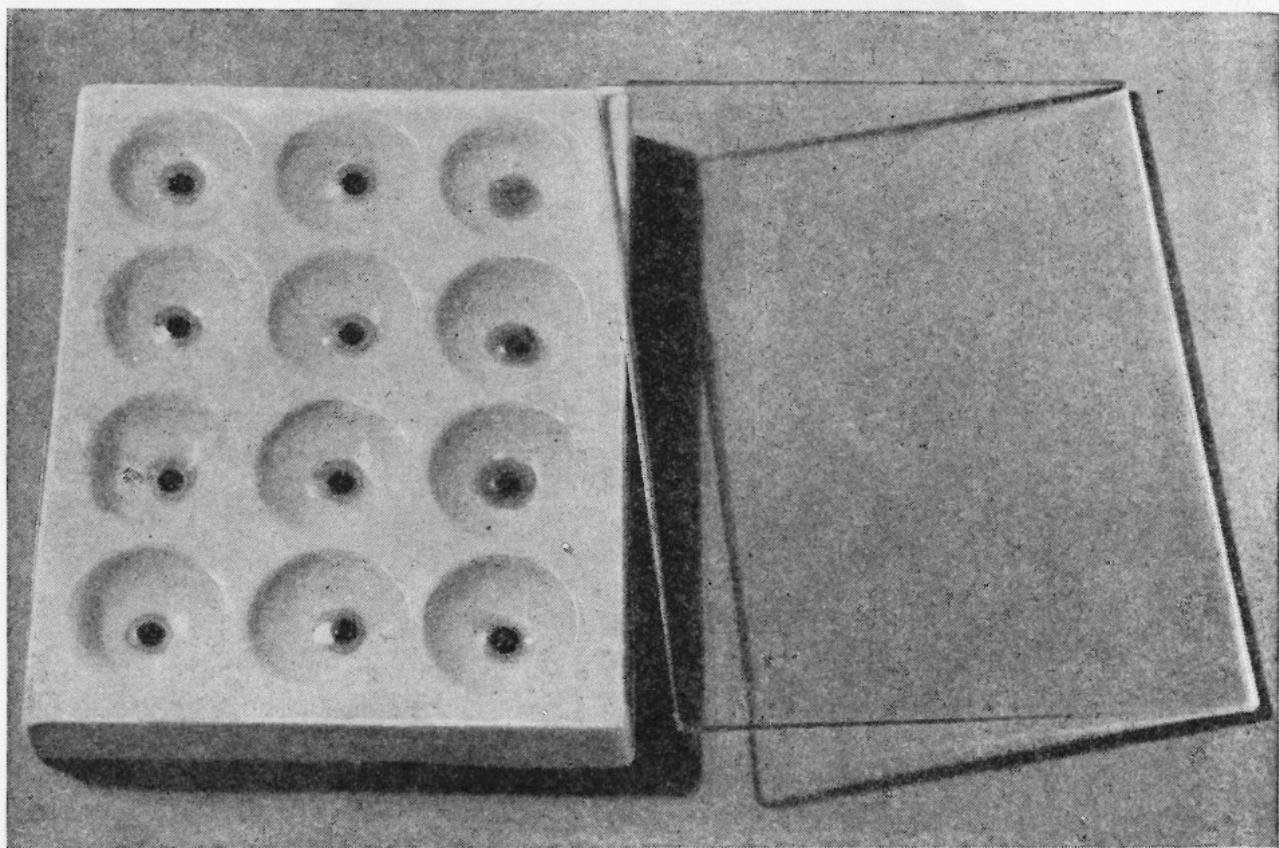


Fig. 2.

te di porcellana. Quindi si versano in ciascuna vaschetta $0,05 \text{ cm}^3$ della penicillina in esame, diluita scalarmente in soluzione fisiologica. In una delle vaschette, come controllo, si mettono invece $0,05 \text{ cm}^3$ di semplice soluzione fisiologica.

Si coprono quindi le vaschette con la lastra di vetro, e tutta la piastra di porcellana viene messa in una grande capsula chiusa di vetro, che contiene sul suo fondo un po' d'acqua. Ciò si fa per

evitare l'evaporazione del liquido immesso nelle vaschette. Il tutto si tiene in termostato per 24 ore.

Il risultato si legge con molta chiarezza. Dove l'emolisi è stata impedita dalla presenza dell'antibiotico, il dischetto rosso di agar-sangue spicca nettissimo, immerso nel liquido incolore, come il tuorlo di un uovo minuscolo nell'albume. Dove invece l'emolisi ha avuto luogo, il liquido è colorato in rossastro e il dischetto di agar, decolorato, è pressochè invisibile (Fig. 2).

Con questo metodo, che dà risultati più netti e che è più sensibile di quello precedente, abbiamo rivelato quantità di penicillina di appena 0,00005 U.O. (0,001 U.O. per cm^3).

Il terzo metodo da noi elaborato ha lo scopo di mettere in evidenza la presenza di penicillina in un volume di liquido molto piccolo, inferiore cioè a $0,05 \text{ cm}^3$. Ciò può rendersi necessario in particolari circostanze, ad esempio nel dosaggio della penicillina nelle lacrime, qualora non si voglia, per ottenere un maggior volume di liquido, stimolare con mezzi fisici o chimici, la secrezione delle ghiandole lacrimali.

Anche per questo metodo è necessario preparare la solita miscela di agar-sangue-germi. Di questa si versano però appena $1,3 \text{ cm}^3$ sulla lastra riscaldata, in modo da coprirla di uno strato d'agar-sangue molto sottile. Con il solito foratappi si preparano dischetti di 4 mm. di diametro e di 0,2 mm. di altezza. Questi vengono allineati su di un vetrino portaoggetti sterile. Quindi, con un'ansa batteriologica normale (2 mm. di diametro) si porta su ciascun dischetto una minuscola gocciolina delle diluizioni scalari in esame. Il vetrino viene collocato in una capsula di vetro coperta, contenente una vaschetta piena d'acqua, per impedire l'evaporazione del liquido. Dopo 24 ore di permanenza a 37° si legge il risultato osservando il vetrino contro luce. I dischetti in cui l'emolisi è avvenuta, risultano trasparenti; là dove la penicillina ha inibito l'emolisi, i dischetti sono invece totalmente o parzialmente opachi (Figura 3).

Con questo metodo un'ansata di soluzione contenente 0,002 U.O. per cm^3 riesce già a dare un'inibizione evidente. Qualora si consideri che un'ansata normale di liquido pesa all'incirca 2 mgr., ne risulta che la quantità minima di penicillina rilevabile con questo metodo è di appena 0,000004 U.O.

Poichè è noto che 1 mgr. di sale sodico cristallizzato di peni-

cillina contiene circa 1750 U.O., ne risulta che con quest'ultimo metodo si riesce a mettere in evidenza quantità di penicillina intorno ai 2 milionesimi di g ($2 \cdot 10^{-12}$). Con i metodi precedenti le quantità minime rilevabili sono un po' minori ($1-2 \cdot 10^{-10}$ con il primo metodo, $2-3 \cdot 10^{-11}$ con il secondo metodo).

Qualora si consideri che le più sensibili reazioni della chimica organica rivelano la presenza di sostanze dell'ordine di grandezza di alcuni γ , e quelle della chimica inorganica e della spettrografia raggiungono ordine di grandezza di poco inferiori, si può ritenere che la nostra reazione sia una delle più sensibili finora note, e che ben difficilmente possa essere soppiantata da una reazione chimica.

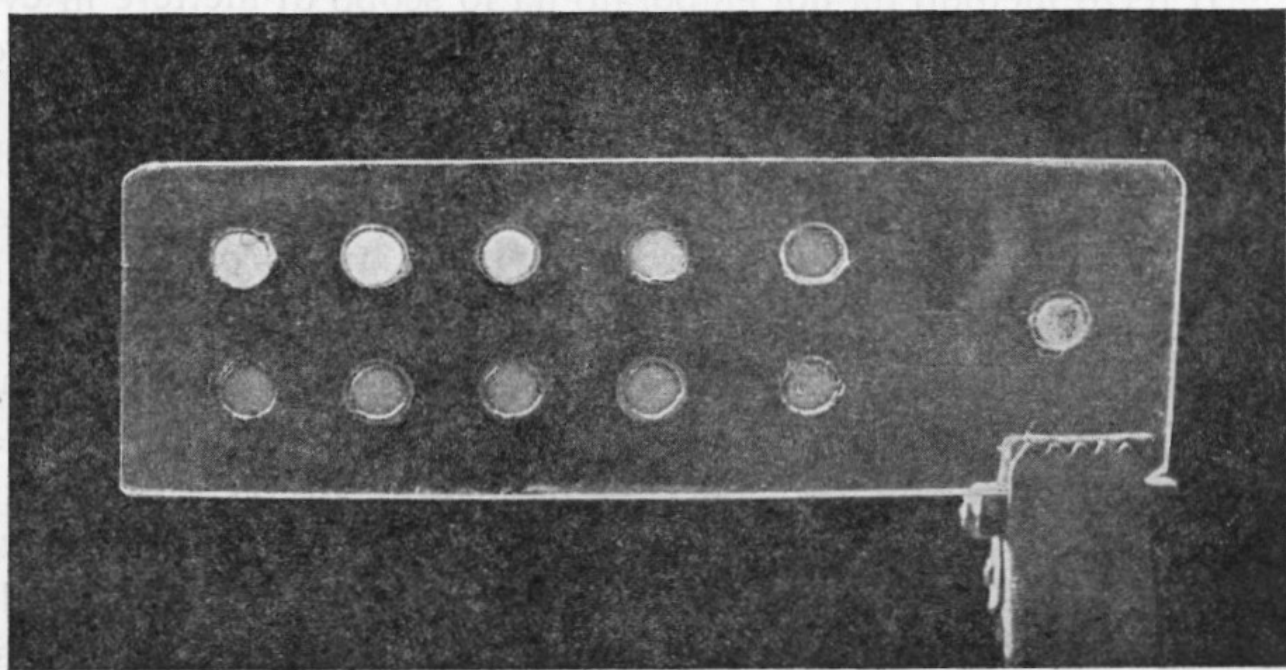


Fig. 3.

Piccole differenze nella tecnica delle reazioni o nella composizione dei mezzi, danno, entro stretti limiti, una certa oscillazione nei valori dei risultati, per cui da reazione a reazione la quantità minima di penicillina che riesce a dare inibizione dell'emolisi, può variare. Per evitare errori è quindi indispensabile accompagnare ogni serie di reazioni con un dosaggio di controllo su diluizioni scalari di un campione standard di penicillina di valore noto. I risultati ottenuti nella serie di diluizioni in esame verranno poi raffrontati con i risultati dati da queste diluizioni standard.

Un'avvertenza da osservare nell'impiegare questi metodi è quella d'accertarsi che la soluzione di penicillina in esame sia isotonica col sangue e che non contenga di per sè sostanze emolitiche. In tali casi infatti i risultati sarebbero falsati da un'emolisi aspecifica.

Ci siamo inoltre accertati che il ceppo di streptococco da noi impiegato non sia sensibile all'azione del lysozym, presente in molti liquidi organici, per esser sicuri di poter impiegare il nostro metodo anche nel dosaggio di penicillina in liquidi organici, senza timore di interferenze dannose nei risultati.

Aggiungiamo ancora che oltre ad aver provato a variare le condizioni delle nostre prove per renderle più precise e più sensibili, abbiamo cercato di elaborare altri metodi di microdosaggio della penicillina. Abbiamo perciò tentato di dosarla unendola a sostanze a supposta azione sinergica, quali i sulfamidici, l'acido p.-amino-benzoico, l'acido ascorbico ecc., o abbiamo tentato di versare la soluzione invece che nei pozzetti, direttamente sulla superficie dell'agar-sangue-germi, o su dischetti di carta da filtro appoggiati su questa, senza riuscire ad ottenere così risultati superiori a quelli dati dal nostro metodo.

In altra serie di prove abbiamo tentato di rivelare la presenza di penicillina attraverso le alterazioni morfologiche che soluzioni diluitissime di questa inducono nei germi. Questo procedimento è molto sensibile, ma i risultati sono alle volte di difficile lettura e valutazione.

Del pari sono falliti i tentativi volti a trar profitto dall'osservazione fatta che dosi molto piccole di penicillina, incapaci di dare batteriostasi, deformano l'alone di inibizione di crescita dato da una soluzione batteriostatica di penicillina, qualora siano versate in pozzetti situati nell'immediata vicinanza dell'alone stesso.

In conclusione riteniamo che i nostri metodi, i quali potrebbero esser resi ancora maggiormente sensibili qualora s'impiegasse in essi uno streptococco emolitico ancor più recettivo alla penicillina del ceppo 1 BD, possano fin d'ora, per la loro semplicità e la loro sensibilità, rendere utili servigi nel campo degli studi sugli antibiotici.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Batteriologia, 25 dicembre 1946.

RIASSUNTO

Gli AA. espongono tre nuovi semplici metodi per il microdosaggio biologico della penicillina. Tali metodi permettono di dosare la Penicillina contenuta nel volume di $0,05-0,002 \text{ cm}^3$ e la loro sensibilità è tale da arrivare a mettere in evidenza anche $0,000004$

U.O. dell'antibiotico, pari ad appena $2 \cdot 10^{-12}$ g di sale sodico puro di Penicillina.

RÉSUMÉ

Les AA. exposent trois nouvelles et simples méthodes pour le microdosage biologique de la pénicilline. Ces méthodes permettent de doser la pénicilline contenue dans un volume de 0,05-0,002 cm³ et leur sensibilité est telle qu'il est possible de mettre en évidence jusqu'à 0.000004 U.O. de l'antibiotique, ce qui équivaut à $2 \cdot 10^{-12}$ g à peine de sel sodique pur de pénicilline.

SUMMARY

The AA. set forth three new and simple methods for the biological microdosage of penicillin. These methods make it possible to dose the penicillin contained in a volume of 0,05-0,002 cm³ and are so sensitive as to appreciate as low an amount as 0,000004 O.U. of the antibiotic, equal to only $2 \cdot 10^{-12}$ g of pure sodium salt of penicillin.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser legen drei neue und einfache Methoden zur biologischen Mikrodosierung des Penicillins dar. Diese Methoden ermöglichen das Penicillin, welches in einem Volumen von 0,005-0,002 cm³ enthalten ist, zu dosieren.

Die Sensibilität dieser Methoden ist so gross, dass man damit bis zu 0,000004 U. O. des Antibiotikum nachweisen kann, gleich $2 \cdot 10^{-12}$ des reinem Natriumsalzes des Penicillins.

BIBLIOGRAFIA

1. RAKE G., MC KEE C. M., JONES H., A rapid test for the activity of certain antibiotic substances. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (1942) 51, 273-274.
2. BABUDIERI B., Controllo di attività dei preparati di penicillina. Rendic. Ist. Sup. Sanità (in corso di stampa). Ann. d'Igiene (in corso di stampa).
3. RAMMELKAMP C. H., A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exudates. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (1942) 51, 95-97.