

43. Franco SCANGA. — La falsificazione della streptomicina ed un metodo rapido per accertarne l'autenticità.

Riassunto. — Servendosi di una tecnica molto semplice, impiegando del brodo di carne, un po' d'olio di vasellina, un colorante così comune come il bleu di metilene ed un germe non patogeno e di facile conservazione come il *B. coli*, noi abbiamo reso possibile l'accertamento dell'autenticità di un campione di streptomicina, mediante un metodo semplice, rapido e di facile apprezzamento.

Tale metodo è essenzialmente basato sul principio che, coltivando in anaerobiosi il *B. coli* in un mezzo liquido contenente bleu di metilene, la crescita del microrganismo comporta un'ossido-deidrogenazione del colorante, per cui, con la sua trasformazione in leucobase, si ha la perdita del colore iniziale. In presenza di streptomicina la crescita del germe non avviene e pertanto il colore rimane immutato. Tale prova richiede, per la sua lettura, anche meno di 3 ore.

Résumé. — Par l'emploi d'une technique très simple, utilisant du bouillon de culture, un peu d'huile de vaseline, un colorant très commun, le bleu de méthylène, et un germe non pathogène et de facile conservation tel que le *B. coli*, nous avons rendu possible de vérifier l'authentisité d'un échantillon de streptomycine, suivant une méthode simple, rapide et comportant une grande facilité de détermination.

Cette méthode est basée essentiellement sur le principe que si l'on cultive en anaérobiose le *B. coli* dans un milieu liquide contenant du bleu de méthylène, le développement du micro-organisme comporte une oxydo-déhydrogénéation du colorant, qui se transformant ainsi en leucobase détermine la perte de la couleur initiale. En présence de streptomycine le développement du germe n'a pas lieu et par conséquent la couleur reste inaltérée. Cet essai n'exige, pour la lecture, que trois heures, éventuellement moins.

Summary. — Using a very simple technique employing meat-broth, some vaseline oil, as common a colouring matter as methyleneblue and a nonpathogenic germ of easy conservation such as *B. coli*, we have made it possible to ascertain the genuineness of a sample of streptomycin

by following a method both simple and rapid, involving a great facility of evaluation.

This method is based substantially on the principle that by growing *B. coli* anaerobiotically in a liquid medium containing methylene blue, the growth of the organism involves a oxido-dehydrogenation of the colouring matter, which being thereby transformed into a leucobase causes the loss of the initial colour. In the presence of streptomycin the germ fails to develop, and therefore, the colour remains unaltered. This test requires, for the reading, not more than three hours, and even less.

Zusammenfassung. — Wir haben es ermöglicht die Echtheit eines Streptomicinmusters mit einer einfachen, raschen und äusserst leicht schätzbarer Methode zu bestimmen. Die Technik ist sehr einfach und benötigt nur: Fleischbrühe, wenig Vaselinöl, einen nicht pathogenen und leicht konservierbaren Keim, wie *B. coli* und einen gebräuchlichen Farbstoff, das Metzylensblau.

Diese Methode beruht hauptsächliche darauf, dass, wenn man *B. coli* in Anaerobiose in Flüssigkeit die Methylenblau enthält züchtet, der Mikroorganismus eine oxy-dehydrierung des Farbstoffes bewirkt, wodurch sich die Leukobase bildet und Entfärbung eintritt. In Gegenwart von Streptomycin wird das Wachstum des Keimes untersagt und somit bleibt die Farbe unverändert. Diese Untersuchung kann in schwachen 3 Stunden gemacht werden.

FALSIFICAZIONE DELLA STREPTOMICINA

Son ormai passati oltre tre anni da quando in America si prepararono i primi campioni di streptomicina, così purificati da consentirne l'impiego in clinica umana, e tuttavia tale antibiotico non è diventato ancora un farmaco alla portata di tutti, per il suo elevato costo: una boccetta di streptomicina, cioè circa un grammo di sostanza, costa quasi 4.200 lire.

Diversi sono i fattori che incidono sul prezzo del medicamento:

1) La preparazione dell'antibiotico richiede una tecnica non semplice, per cui la sua produzione, per quanto in continuo aumento, è ancora piuttosto limitata.

2) Man mano che le conoscenze sulle possibilità terapeutiche dell'antibiotico si estendono e, con il suo impiego sempre più appropriato, si

constata quali brillanti e spesso miracolosi risultati si ottengono in forme morbose gravissime, la cui prognosi prima era ineluttabilmente infausta, aumentano le richieste del medicamento, tanto da renderle superiori alle offerte.

3) Al contrario della penicillina che può trovare un ottimo sostituto nei sulfamidici, la streptomicina in alcune forme morbose rappresenta il medicamento di scelta, se non addirittura l'unico.

4) Il suo impiego essenziale è nella terapia della tubercolosi: di qualunque forma clinica si tratti, è sempre necessario disporre di molte decine di milioni di unità, spesso addirittura di qualche centinaio di milioni.

Ed ecco allora che tutti questi fattori: limitata produzione, richiesta superiore all'offerta, necessità di grandi dosaggi, unitamente al carattere spesso urgente ed affannoso che accompagna la ricerca di questo antibiotico, fanno della streptomicina un medicamento ricercato e prezioso.

Era pertanto prevedibile che venisse tentato in vario modo di trarre dolorosamente profitto da questa situazione, provvedendo alla sofisticazione del medicamento.

Quali assistenti del Laboratorio di batteriologia dell'Istituto Superiore di Sanità, occupandoci in particolar modo del controllo delle sostanze antibiotiche, abbiamo avuto numerose volte occasione di accertare, su richiesta di medici, di clinici e delle Autorità sanitarie e di Pubblica Sicurezza, diverse falsificazioni di streptomicina. Qualche volta tale controllo è stato puramente occasionale, perchè da noi sollecitato, ma il più delle volte era richiesto perchè i medici restavano perplessi di fronte all'assenza di qualsiasi risultato della pur tanto decantata sostanza sui loro malati. Nè essi potevano di nulla accorgersi, perchè quasi sempre la falsificazione era perfetta in tutti i particolari, sì da non suscitare alcun sospetto. Soltanto una specifica competenza al riguardo poteva far rilevare qualche piccolo indizio e far sorgere così qualche dubbio.

Ed allora, ammessa la possibilità, non del tutto rara, di imbattersi in fiale di streptomicina falsa, almeno fino a quando il suo costo sarà elevato e la sua disponibilità limitata, come poter procedere all'accertamento della genuinità del medicamento?

Indichiamo anzitutto alcuni segni particolari, che se anche non sono sufficienti per un sicuro giudizio, potrebbero però indurre un sospetto

più o meno rimarchevole circa l'autenticità dell'antibiotico. Alcune volte tali segni sono così evidenti da non lasciare quasi dubbi sulla genuinità della streptomicina, ma spesso essi sono rimarcabili solo ad un occhio molto esperto e pratico.

Dalla nostra personale esperienza risulta che, in ordine di frequenza, le sostanze trovate al posto della streptomicina sono:

1) *Glucosio*: la sua frequenza è superiore a quella di tutte le altre sostanze messe insieme; la somiglianza è notevole, specie con la streptomicina immessa recentemente in commercio.

2) *Penicillina*: tale metodo di falsificazione è il più semplice per i seguenti motivi: basta sostituire alle boccette di penicillina unicamente l'etichetta incollata al flaconcino di vetro; non v'è alcun pericolo che la sostanza non sia innocua o che non sia sterile; inoltre l'estrema facilità con cui si scioglie in soluzione fisiologica o in acqua distillata, non desta nel sanitario alcun sospetto.

3) *Bicarbonato di sodio - acido borico*: in questi casi il pH della soluzione è di grande giovamento per scoprire l'adulterazione.

4) *Lattosio* o altro zucchero: la loro frequenza è di molto inferiore a quella del glucosio.

5) *Sulfamidici*: il più delle volte trattasi di sulfamidico in polvere, che non è solubile nella soluzione fisiologica o in acqua distillata: in tali casi la falsificazione si scopre subito.

Ed ecco ora quali sono i segni più comuni che possono indurre il sanitario a sospettare sulla autenticità dell'antibiotico, tenendo presente che di tali segni se ne riscontrerà uno o più, a seconda del tipo di falsificazione e della sostanza impiegata.

I) SEGNI RIFERENTISI ALLA SCATOLA ED ALLA BOCCETTA

a) Gli scritti sia della scatola esterna che dell'etichetta non sono netti e ben marcati, poiché anzichè litografati, sono composti con caratteri tipografici; è facile perciò che, se vengono inumiditi, non rimangono inalterati, ma si spandono;

b) le sigle impresse dalla casa produttrice sull'involucro esterno di alluminio non sono ben chiare e ben rilevate;

c) spesso il dischetto di alluminio, che trovasi al disotto dell'involucro esterno di protezione (fig. 1-2), non è posto sopra al cerchietto di alluminio che serve a tener fissato il tappo di gomma, ma è situato

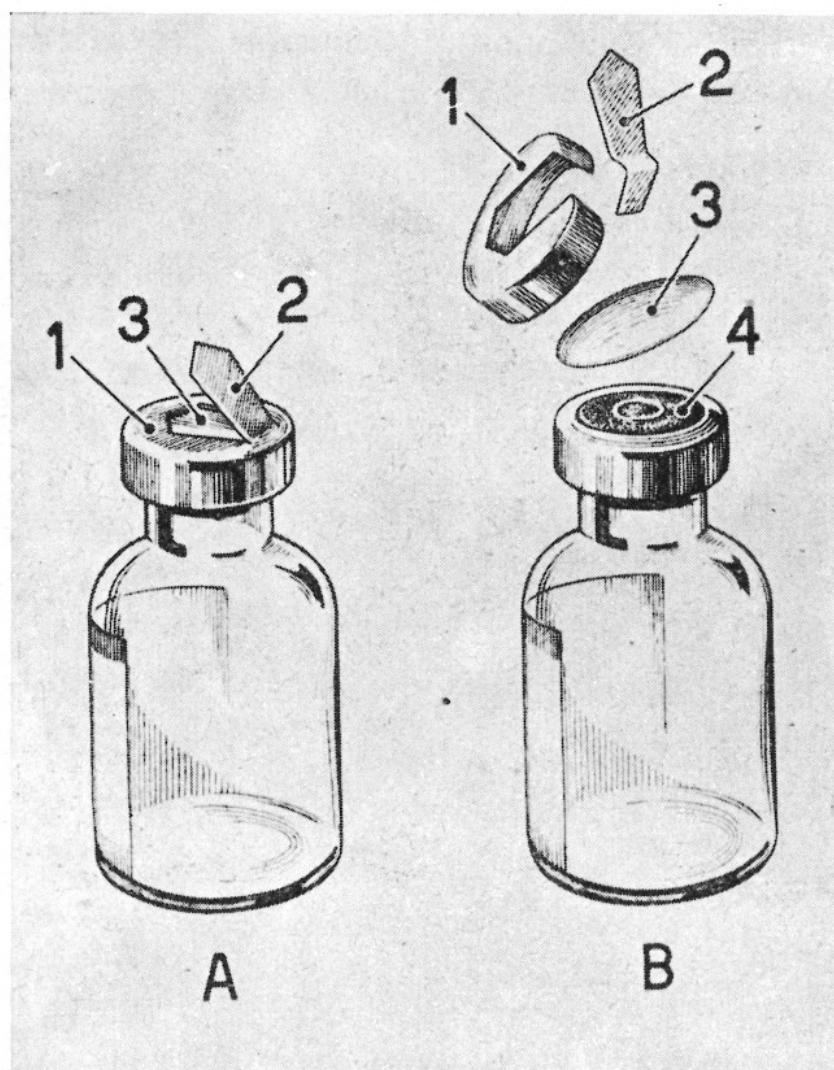


FIG. 1. — Boccetta di streptomicina autentica: a sinistra (A) è raffigurato il sistema di chiusura ancora intatto: 1) cerchietto esterno di alluminio con la linguetta (2) che ne consente l'apertura; al di sotto si intravvede il dischetto di alluminio (3) di protezione della gomma. A destra (B) si vede la stessa boccetta dopo l'apertura: il dischetto di alluminio (3) viene allontanato facilmente, lasciando scoperta la sottostante gomma (4).

fra il tappo di gomma ed il cerchietto stesso. Perciò non può esser tolto al momento dell'uso e pertanto, per forare la gomma con l'ago, bisognerà necessariamente strappare con la estremità di una forbice o di un coltello una parte del dischetto stesso. In altri casi tale dischetto di alluminio non è fissato al bordo del cerchietto, ma disposto come appare nelle fig. 3 e 4.

2) SEGNI RIFERENTISI ALLA SOSTANZA

- a) La polvere falsa non ha un colore bianco-grigiastro;
- b) non è mai aderente al vetro della boccetta, nè si presenta in ammassi più o meno voluminosi e comunque più grandi dell'orificio della boccetta;

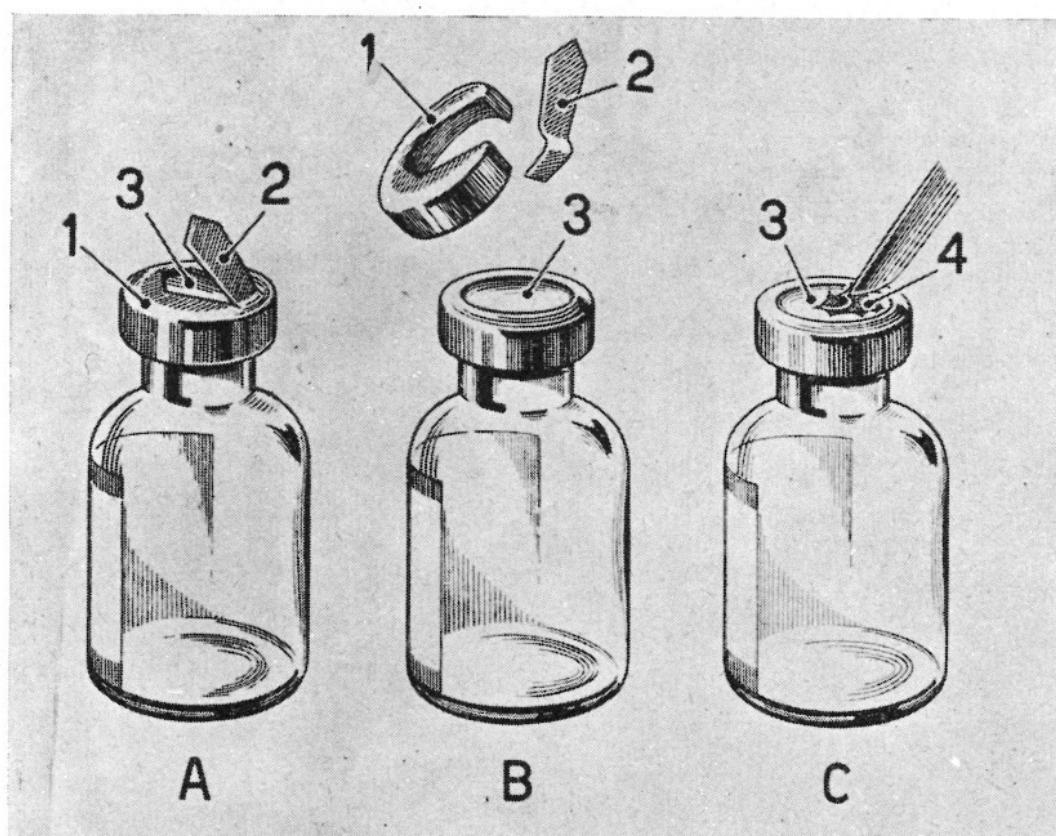


FIG. 2. — Boccetta di streptomocina falsa: a sinistra (A) è raffigurato il sistema di chiusura intatto; non è apprezzabile alcuna differenza con quello della boccetta vera. Ma quando si procede all'allontanamento del cerchietto di alluminio (B-1) si constata che il dischetto sottostante (B-3) è situato tra il tappo di gomma ed il relativo cerchietto di fissaggio, per cui esso non può venire allontanato. Perciò, onde poter forare con l'ago la gomma sottostante (C-4) bisognerà strappare a viva forza con la punta di una forbice un tratto del dischetto (3).

c) agitando fortemente la boccetta, la polvere non aderisce uniformemente ed in strato sottile su tutta la superficie interna del vetro, nè si forma all'interno della boccetta, dopo l'agitazione, una fine nubecola;

d) quando si introduce all'interno della boccetta il liquido per preparare la soluzione, la polvere non si scioglie quasi istantaneamente, ma più o meno lentamente;

e) la soluzione contenente la sostanza sciolta non è perfettamente limpida;

f) se si saggia la reazione della soluzione, si trova che spesso il pH non è compreso tra 5 e 7;

g) siccome il più delle volte trattasi di uno zucchero, si può osservare fortemente positiva la reazione di Fehling.

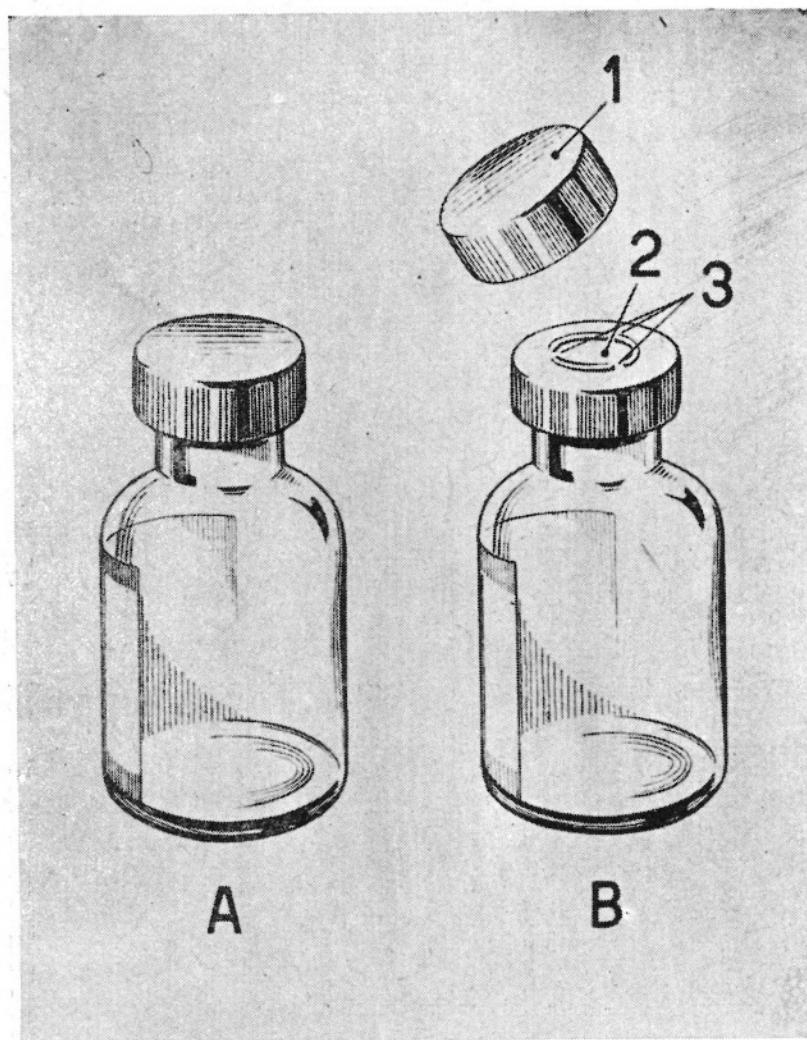


FIG. 3. — Poccetta di streptomicina autentica : è rappresentato un altro sistema di chiusura: il dischetto di protezione che trovasi al di sopra del tappo di gomma (B-2) è fissato al cerchietto laterale mediante tre sottili listarelle (3) che si continuano col cerchietto stesso.

Come per la penicillina e per altri antibiotici, anche per la streptomicina vi sono vari metodi di controllo biologico, ma essi, oltre che essere di tecnica più o meno complessa, richiedono periodi di tempo quasi sempre di 18-24 h. e, più che altro, servono per procedere alla titolazione delle unità contenute in un campione di streptomicina.

Ora il quesito che a noi preme di risolvere non è quello di stabilire se nella boccetta in esame vi sia 1 milione di U. per g. o meno, ma soltanto *se vi sia streptomicina o no*, rispondendo a questa domanda il più presto possibile e con una ricerca che sia nello stesso tempo semplice e precisa.

Nella letteratura americana al riguardo viene riferita una reazione

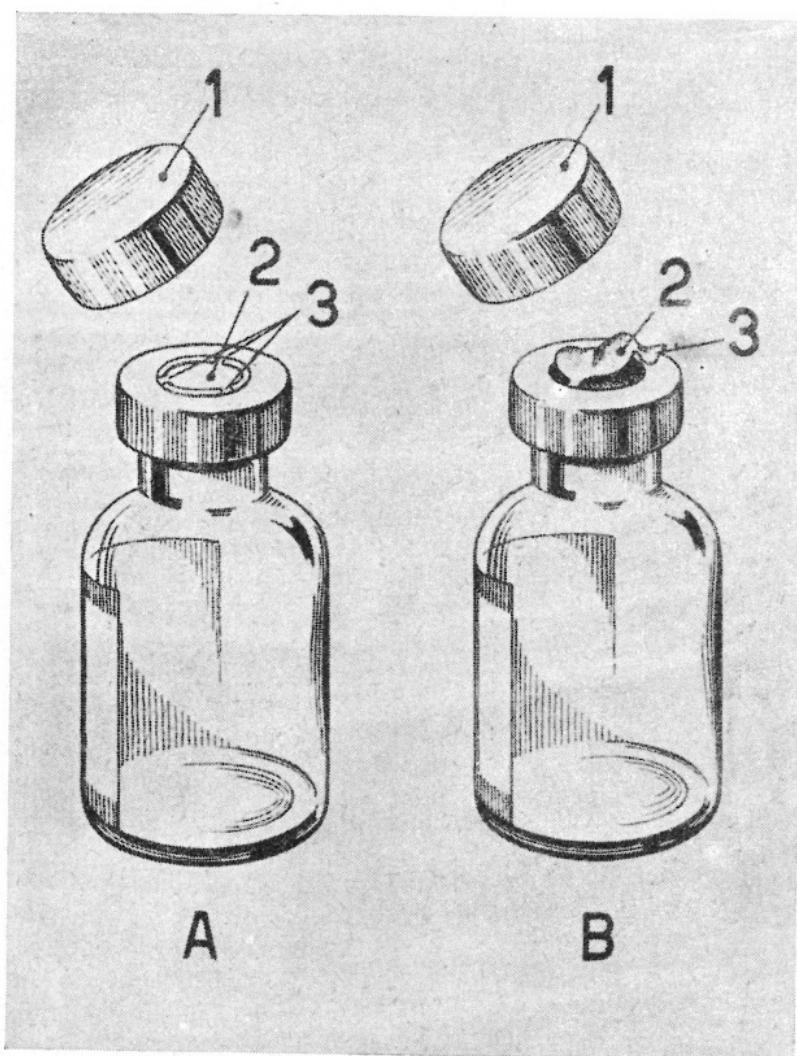


FIG. 4. — Boccetta di streptomicina falsa: il dischetto di protezione (2) non è fissato al cerchietto laterale ma presenta tre lingue poste al di sotto del cerchietto (B-3).

colorata, capace di rivelare la presenza di streptomicina in una soluzione⁽¹⁾: a 2 cm³ della soluzione in esame si aggiunge 1 cm³ di una soluzione acquosa al 2% di acetilacetone e 1 cm³ di una soluzione N di idrato sodico. Si scalda la miscela per 10 minuti a b. m. e quindi si raffredda.

(1) SCUDI, BOXER e JELINEK, Science 104, 486 (1946), citato da B. BABUDIERI: Relazione sulla streptomicina al Congresso di Tisiologia, Milano, nov. 1947.

Se ad essa sia ggiungono 2 cm³ di una soluzione del reattivo di Erlich per le aldeidi, si ottiene una colorazione rosa. Si porta il volume a 1 cm³ e si misura l'assorbimento della luce con un colorimetro fotoelettrico, usando il filtro 450.

Tale reazione è in complesso abbastanza rapida e semplice: basta disporre delle sostanze chimiche indicate. Ma ha un inconveniente, per riconoscimento degli stessi Autori che la descrivono: può dare cioè risultati falsi, se non trattasi di streptomicina purissima. Quest'inconveniente pertanto, a prescindere da ogni altra considerazione, ne rende sconsigliabile l'impiego, con la streptomicina attualmente in commercio.

Ritengo perciò utile far conoscere un mezzo semplicissimo, sensibile, e abbastanza rapido, per stabilire la genuinità di un campione di streptomicina.

Nella letteratura straniera sugli antibiotici sono citati diversi metodi di titolazione di un campione di penicillina o di streptomicina o di determinazione della sensibilità di un germe verso questi antibiotici, utilizzando la riduzione di un colorante in conseguenza dello sviluppo di un germe campione o della variazione del pH del mezzo di cultura.

Così per esempio Prévot e coll. (²) adoperano per la titolazione della penicillina un metodo basato sulla riduzione del verde-yanus, utilizzando come germe il Vibrio perfringens, in un primo tempo, ed il Cl. butyricum successivamente (³). Con tale metodo gli AA. avrebbero ottenuto una media di errori inferiore a quella che dà la titolazione con il metodo dei cilindri su piastra.

Gli stessi AA. hanno utilizzato questo metodo al verde-yanus per la determinazione della penicillino-sensibilità dei germi anaerobi (⁴).

Reid e Brewer (⁵) hanno utilizzato per la determinazione della con-

(²) PRÉVOT A. R., Méthod de titrage rapide de la pénicilline par inhibition du pouvoir réducteur du « W. perfringens » sur le vert-yanus, Ann. Inst. Pasteur, 72, 471 (1946).

(³) PRÉVOT A. R., PEYRE N. et DIGEON M., Modification de la méthode de titrage de la pénicilline. Bilan d'écart individuels. Ann. Inst. Pasteur, 72, 840 (1946).

(⁴) PRÉVOT A. R. et FERLY A., Application de la méthode au vert-yanus à la détermination de la pénicillino-sensibilité des anaérobies, Bull. Acad. Med., 130, 123 (1946).

(⁵) REID R. et BREWER J., The reductase method for the determination of penicillin concentrations in body fluids, J. Bact., 52, 251 (1946).

centrazione della penicillina nei liquidi organici, un metodo basato sulla riduzione del bleu di metilene aggiunto al latte sterilizzato, seminato con *B.subtilis*.

Sanchez e Lamensas (⁶), Sureau, Depine e Schurr (⁷) hanno indicato dei metodi di dosaggio rapido della penicillina, ma basati sulle variazioni del pH del terreno in seguito alla crescita di un microrganismo: *Lactobacillus bulgaricus* (⁶), stafilococco Oxford (⁷).

Pennareach e coll. (⁸) indicano un metodo rapido di ricerca della penicillino-sensibilità dei germi servendosi della ossido riduzione di coloranti, in aerobiosi.

Il nostro metodo è basato sul principio che coltivando in anaerobiosi un germe in un mezzo liquido contenente un determinato colorante ad azione deidrogenante, la crescita del microrganismo comporta una ossido deidrogenazione del colorante, per cui, trasformato in leucobase, si ha la perdita del colore iniziale.

Noi abbiamo pensato di poter ottenere queste condizioni in una maniera molto semplice: ponendo nella provetta al di sopra del brodo contenente i germi ed il colorante, un po' di olio di vasellina sterile. La crescita del microrganismo avviene pertanto in anaerobiosi e dermina perciò la riduzione del colore, cioè la decolorazione del brodo. Nella provetta in cui, per la presenza della streptomicina, la crescita batterica non avviene, il colorante non viene ridotto e pertanto il colore del brodo rimane immutato.

TECNICA DELLA PROVA

Come terreno di cultura noi adoperiamo il brodo carne con pH 7,2. Come germe consigliamo un microrganismo streptomicino-sensibile, che si sviluppi molto celermente; tale è per l'appunto il *B.coli*. E' bene che esso sia previamente saggiato nella sua sensibilità non solo verso la streptomicina, ma anche verso la penicillina.

(⁶) SANCHEZ G. et LAMENSAS A., Méthode de dosage rapide de la pénicilline et de la streptomycine, C. R. Acad. Sci., 224, 1189 (1947).

(⁷) SUREAU B., DEPIN F. et SCHURR O., Titrage biologique de la pénicilline dans le sang et le liquide céphalo-rachidien, en présence d'un indicateur de pH, Ann. Inst. Pasteur, 72, 665 (1946).

(⁸) PENNAREACH, MORAND, GUENER, Note sur l'application des colorants d'oxydoréduction à la recherche rapide de la penicillina-sensibilité des germes en aérobiose, Rev. Méd. navale, 2 N., 4, 387 (1947).

Noi ci serviamo del B.coli 2B, n° 18 della collezione dell'Istituto Superiore di Sanità. Esso è inibito nella sua crescita da 6 U/cm³ di streptomicina, mentre non è per nulla influenzato nemmeno da 500 U/cm³ di penicillina. Come indicatore ci siamo soprattutto preoccupati di trovare un colore che offrisse i seguenti requisiti: a) che si trovasse facilmente in commercio, non costasse molto e che fosse perciò alla portata di ogni laboratorio; b) che venisse ridotto il più rapidamente possibile.

Abbiamo perciò condotto delle ricerche, impiegando i seguenti coloranti:

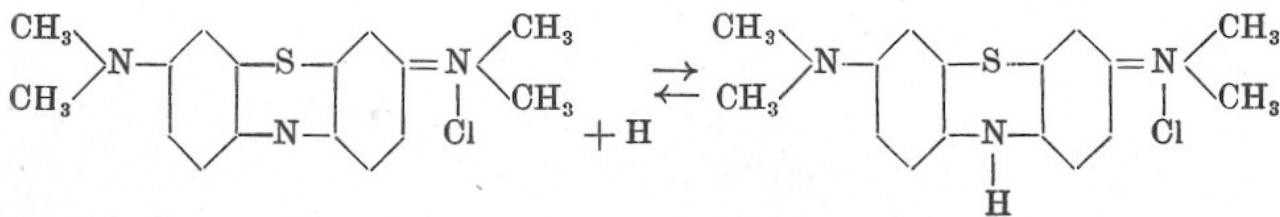
- 1) Eosina;
- 2) Safranina;
- 3) Rosso bengala;
- 4) Verde di malachite;
- 5) Acridina;
- 6) Carminio;
- 7) Violetto di genziana;
- 8) Fucsina;
- 9) Bleu di metilene.

La scelta è caduta sul bleu di metilene perchè è risultato il più sensibile. È consigliabile preparare una soluzione acquosa di bleu di metilene all'1:500 e sterilizzarla a ½ atmosfera per 30' per avere sempre pronto il colorante da adoperare.

Nella nostra prova il bleu di metilene, aggiunto al brodo insemennato con il B.coli e mantenuto in anaerobiosi mediante l'olio di vasellina sovrastante, si comporta come un accettore d'idrogeno che, ridotto per lo sviluppo batterico, perde il colore trasformandosi in leucoderivato.

Tale reazione è facilmente reversibile per cui se dell'ossigeno viene portato a contatto con il leucoderivato, ricompare quasi per intero il colore perduto.

Il bleu di metilene si comporta per ciò come un sistema ossido-riduttore, secondo la seguente equazione (Mazzetti):



Bleu di metilene non ridotto (colorato)

Bleu di metilene ridotto (scolorito)

Ecco in dettaglio alcune ricerche preliminari che abbiamo dovuto compiere, per fissare i dati necessari per l'esatto eseguimento della nostra prova.

Ricerca I. — *Azione inibente della streptomicina sul ceppo B.coli 2-B, della collezione dell'Istituto Superiore di Sanità, usando come terreno di cultura il brodo carne a pH 7,2.*

Si dispongono trentatre provette su tre file di undici, e si pongono in ognuna di esse cm^3 5 di brodo, cm^3 0,5 di una brodocultura di B.coli di 24 h e 2 gocce di bleu di metilene diluito 1:500; si aggiungono quindi quantità scalari di streptomicina, lasciando l'ultima provetta di ogni fila senza antibiotico (controllo). Si ricopre tutto con olio di vasellina e si pone in termostato; si osserverà quindi in quali provette si sarà manifestata l'azione inibitrice della streptomicina: la riduzione del colore più o meno completa, rappresenta l'indice di tale riduzione.

TABELLA I.

Numero delle U.S. presenti per cm^3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0
Numero complessivo delle U. S. presenti in ciascuna provetta	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	0
Riduzione del colore	{	+++	++	+	±	—	—	—	—	—	++++
		+++	++	+	+	—	—	—	—	—	++++
		+++	++	+	±	—	—	—	—	—	++++

Come si vede la dose sicuramente inibente di streptomicina per quel ceppo di coli è rappresentata da 6 U.S./ cm^3 . Si tenga presente che tale risultato è relativo alla maniera come noi abbiamo impostato la prova, cioè con un terreno a pH 7,2, in presenza di bleu di metilene e con una carica batterica molto forte.

Teoricamente perciò basterebbe che noi ponessimo in 5 cm^3 di brodo 30 U.S. di streptomicina per impedire la crescita del germe ed evitare così la riduzione del colore. Ma, tenendo presente gli inevitabili errori di tecnica e la possibilità che, pur trattandosi di streptomicina autentica, il suo titolo possa essere inferiore a quello dichiarato, poichè noi con questo metodo desideriamo unicamente assicurarci della autenticità della sostanza e non del titolo, consigliamo di allestire la prova con due provette, ponendo in una 50 e nell'altra 100 U.S., cioè rispettivamente 10 e 20 U.S./ cm^3 .

Ulteriori ricerche che abbiamo in corso, permetteranno forse di poterci servire di questo metodo con il bleu di metilene anche per una rapida titolazione della streptomomicina.

Ricerca II. — *Prova per stabilire la concentrazione ottimale del bleu di metilene.*

Si prepara una serie di 10 provette contenenti ciascuna 5 cm³ di brodo a pH 7,2, e cm³ 0,5 di una brodocultura di B.coli di 24 h. Quindi si aggiungono dosi scalari di bleu di metilene diluito 1:500, nella seguente maniera: 1 goccia nella 1^a e 2^a provetta; 2 gocce nella 3^a e 4^a; 3 gocce nella 5^a e 6^a; 4 gocce nella 7^a e 8^a; 5 gocce nella 9^a e 10^a. Ad una provetta di ciascun gruppo si aggiungono ancora 50 U.S. di streptomomicina. Si pone tutto in termostato e si osserva dopo 2 ore; 2,30'; 3 ore; 3,30'; 4 ore; 24 ore.

TABELLA II.

Bleu di metilene 1:500	1 goccia	2 gocce	3 gocce	4 gocce	5 gocce
Brodocultura di B. coli cm ³ 0,5	+	+	+	+	+
Streptomomicina	50U.	—	50U.	—	50U.
Riduzione osservata do- po 2 ore	—	—	—	—	—
Riduzione osservata do- po 2 ore e 30'.	—	±	—	±	—
Riduzione osservata do- po 3 ore	—	+	—	+	—
Riduzione osservata do- po 3 ore e 30'.	—	++	—	++	—
Riduzione osservata do- po 4 ore	—	++	—	++	—
Riduzione osservata do- po 24 ore	—	+++	—	+++	—

— = nessuna riduzione. ± = lieve riduzione. + = riduzione più marcata.
++ = riduzione quasi completa. +++ = riduzione completa.

Da questa ricerca si deduce che la concentrazione ottimale del colorante è indifferentemente di 1-2 gocce di bleu di metilene per 5 cm³ di brodo.

Ricerca III. — *Influenza del pH del terreno sulla rapidità di riduzione del bleu di metilene.*

Onde adoperare nella nostra prova un terreno il cui pH fosse ottimale per la rapida riduzione del bleu di metilene, senza d'altra parte inibire o diminuire l'azione antibatterica esplidata dalla streptomomicina, abbiamo ritenuto opportuno preparare un terreno di cultura con differenti

pH, tra 7 e 9, ricercando quale di questi risultasse il migliore per la nostra prova.

TABELLA III.

pH del terreno	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8	8,2	8,4	8,6	8,8	9
con 50 U. di streptomicina { dopo 3 h	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
dopo 24 h	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
senza streptomicina { dopo 3 h	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
dopo 24 h	+++	+++	+++	++	++	++	++	±	±	±	±

I risultati ottenuti dimostrano che: 1) qualunque sia il pH tra 7 e 9, la quantità di streptomicina presente nel terreno di cultura è tale che l'antibiotico riesce sempre ad esplicare in maniera completa la sua attività antibatterica; 2) viceversa la differenza di pH influisce, spesso in maniera notevole, sulla crescita del *B.coli*. Mentre lo sviluppo è massimo con pH tra 7 e 7,4, è minore con pH compreso tra 7,6 e 8,2 e quindi decresce ancora maggiormente con i pH superiori. Tali differenze sono più marcate dopo 24 h. di permanenza in termostato.

Ricerca IV. — *Inattivazione della streptomicina mediante cisteina.*

I caratteri macroscopicamente apprezzabili nella sostanza in esame, il presupposto logico che nella sofisticazione dell'antibiotico si utilizzi qualche sostanza sicuramente innocua, e l'estrema diluizione a cui la sostanza stessa viene da noi impiegata (cm^3 0,5-1 della diluizione 1:10.000 in 5 cm^3 di brodo) sarebbero motivi sufficienti per escludere qualsiasi possibilità di errore nella prova.

Tuttavia abbiamo voluto anche ricorrere ad un controllo sicuro e diretto di inattivazione della streptomicina, ricercando quali delle sostanze a tal uopo consigliate, risultassero le migliori (9-10-11-12-13).

(⁹) RAKE G. a. DONOVICK, R., A procedure for testing sterility of concentrated streptomycin solutions., Proc. Soc. Exp. Biol. a. Méd., 62, 31 (1946).

(¹⁰) WAKSMAN S. A., Les antibiotiques, Masson Editeur, Parigi (1947), pag. 82.

(¹¹) SCANGA F., Penicillina, streptomicina ed altri antibiotici, Editore Sansoni, Firenze (1948).

(¹²) DENKELWALTER R. G., COOK M. A. a. TISHLER M., The effect of cysteine on streptomycin and streptothricin, Science, 102, 9 (1945).

(¹³) REILLY H., a. WAKSMAN S. A., Inhibition of streptomycin activity by cysteine (in corso di stampa).

Abbiamo perciò studiato l'azione sulla streptomicina della semicarbazide, dell'idrossilamina e della cisteina, ricercando anzitutto quale fosse la maggiore concentrazione di ciascuna sostanza che, aggiunta al terreno di cultura, non inibisse la crescita del *B.coli*.

Quindi abbiamo ricercato quali delle tre sostanze, impiegate nella concentrazione che non esercita alcuna influenza sullo sviluppo batterico, riuscisse ad inattivare le 50 U.S. di streptomicina presenti nel terreno di cultura.

TABELLA IV.

PROVA DI INATTIVAZIONE DELLA STREPTOMICINA

5 cm³ di brodo carne pH 7,2 - 2 gocce di bleu di metilene 1/500
1 goccia di *B. coli* di 24 h.

	Semicarbazide g					
	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,001
Semicarbazide sola	—	—	++	++	++	+++
Contatto immediato della semicarbazide con 50 U. di streptomicina	—	—	++	++	++	++
Semicarbazide in contatto per 24 h con 50 U. di streptomicina	—	—	++	++	++	++
Idrossilamina g						
	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,001
Idrossilamina sola	—	—	—	—	++	+++
Contatto immediato della idrossilamina con 50 U. di streptomicina	—	—	—	—	++	++
Idrossilamina in contatto per 24 h con 50 U. di streptomicina	—	—	—	—	++	+++
Cisteina g						
	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,001
Cisteina sola	++	++	+++	+++	+++	+++
Contatto immediato della cisteina con 50 U. di streptomicina	+++	++	—	—	—	—
Cisteina in contatto per 24 h con 50 U. di streptomicina	+++	++	—	—	—	—

Da queste prove è risultato che sia l'idrossilamina che la semicarbazide non esplicano una sufficiente azione inattivante, nelle concentra-

zioni massime utilizzabili; la cisteina invece ha inattivato completamente la streptomomicina presente nel terreno di cultura, nella concentrazione di 50 mg per 5 cm³ di brodo.

Come risulta dalla tabella V, l'azione inattivante della cisteina non ha subito apprezzabili variazioni, anche se il contatto con l'antibiotico, prima di porre le provette in termostato, è stato protratto per 24 ore.

TABELLA V.

	Contatto con 50 U. di streptomomicina per						
	0 ore	1 ora	2 ore	3 ore	4 ore	5 ore	24 ore
Cisteina gr. 0,1	dopo 3 h	+	+	+	+	+	+
	dopo 6 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	dopo 24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cisteina » 0,05	dopo 3 h	+	+	+	+	+	+
	dopo 6 h	++	++	++	++	++	++
	dopo 24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cisteina » 0,02	dopo 3 h	—	—	—	—	—	—
	dopo 6 h	—	—	—	—	—	—
	dopo 24 h	—	—	—	—	—	—
Cisteina » 0,01	dopo 3 h	—	—	—	—	—	—
	dopo 6 h	—	—	—	—	—	—
	dopo 24 h	—	—	—	—	—	—
Controllo . .	dopo 3 h	++	++	++	++	++	++
	dopo 6 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	dopo 24 h	++++	++++	++++	++++	++++	++++

DESCRIZIONE DEL METODO

Supponiamo che si debba controllare l'autenticità di un campione di streptomomicina.

Si procede anzitutto ad un esame accurato della scatola, dell'etichetta, della chiusura di alluminio e della sostanza contenuta nella boccetta. Quindi si strappa con una pinza il tappo di alluminio e si osserva la posizione del secondo dischetto (figure 1, 2 e 3).

Si introducono allora all'interno della boccetta, secondo la tecnica abituale 10 cm³ di soluzione fisiologica o di acqua bidistillata sterile. Quindi si allestisce una serie di 5 provette come segue:

Nella 1^a provetta (fig. 5) si pongono cm³ 4,5 di brodo carne a pH 7,2, cm³ 0,5 di una brodocultura di 18-24 h. di B.coli, 1-2 gocce di bleu di metilene, ricoprendo tutto con olio i vasellina: questa provetta serve per

controllare il normale sviluppo batterico e la conseguente scolorazione del brodo.

Nella 2^a provetta si pongono cm³ 5 di brodo, 1-2 gocce di bleu di metilene, 100 U.S. di streptomicina e l'olio di vasellina, senza insemen- zare il terreno di cultura con il B.coli. Questa provetta serve per accer- tarsi che la riduzione del colore sia da attribuire unicamente alla crescita batterica.

TABELLA VI.

	Provetta N.					Osservazione
	1	2	3	4	5	
Brodo	cm ³ 4,5	cm ³ 5	cm ³ 4,5	cm ³ 4,5	cm ³ 4,5	
B. coli	cm ³ 0,5	—	cm ³ 0,5	cm ³ 0,5	cm ³ 0,5	
Bleu di metilene	gocce 1-2					
Streptomicina da esaminare . .	—	100 U. S.	50 U. S.	100 U. S.	—	
Streptomicina campione . .	—	—	—	—	50 U. S.	
Olio di vasellina	cm ³ 1-1,5					
Riduzione dopo 3 h	+++	—	—	—	—	Risultato favor.
Riduzione dopo 3 h	+++	—	++	++	—	Risultato sfavor.

Nella 3^a e 4^a provetta si pongono cm³ 4,5 di brodo, cm³ 0,5 di B.coli, 1-2 gocce di bleu di metilene e, rispettivamente, in una provetta 50 e nell'altra 100 U.S. della streptomicina da esaminare. Si ricopre tutto con l'olio di vasellina e quindi si osserverà ogni ½ ora, a partire dalla 2^a ora, il risultato. Se trattasi di streptomicina, il colore deve mantenersi inalterato: una parziale riduzione può avversi solo nella provetta contenente 50 U.S., il che è da attribuire o ad errore di tecnica nella esatta preparazione delle varie diluizioni o al fatto che il titolo dell'antibiotico è molto inferiore al dichiarato. Se viceversa la sostanza in esame non è streptomicina, si avrà lo scolorimento in entrambe le provette.

Nella 5^a provetta si pongono cm³ 4,5 di brodo, cm³ 0,5 di B.coli, 1-2 gocce di bleu di metilene e 50 U.S. di streptomicina campione: tale controllo non è però necessario, qualora si sia saggia in precedenza la streptomicino-sensibilità del ceppo di B.coli che si adopera per la prova.

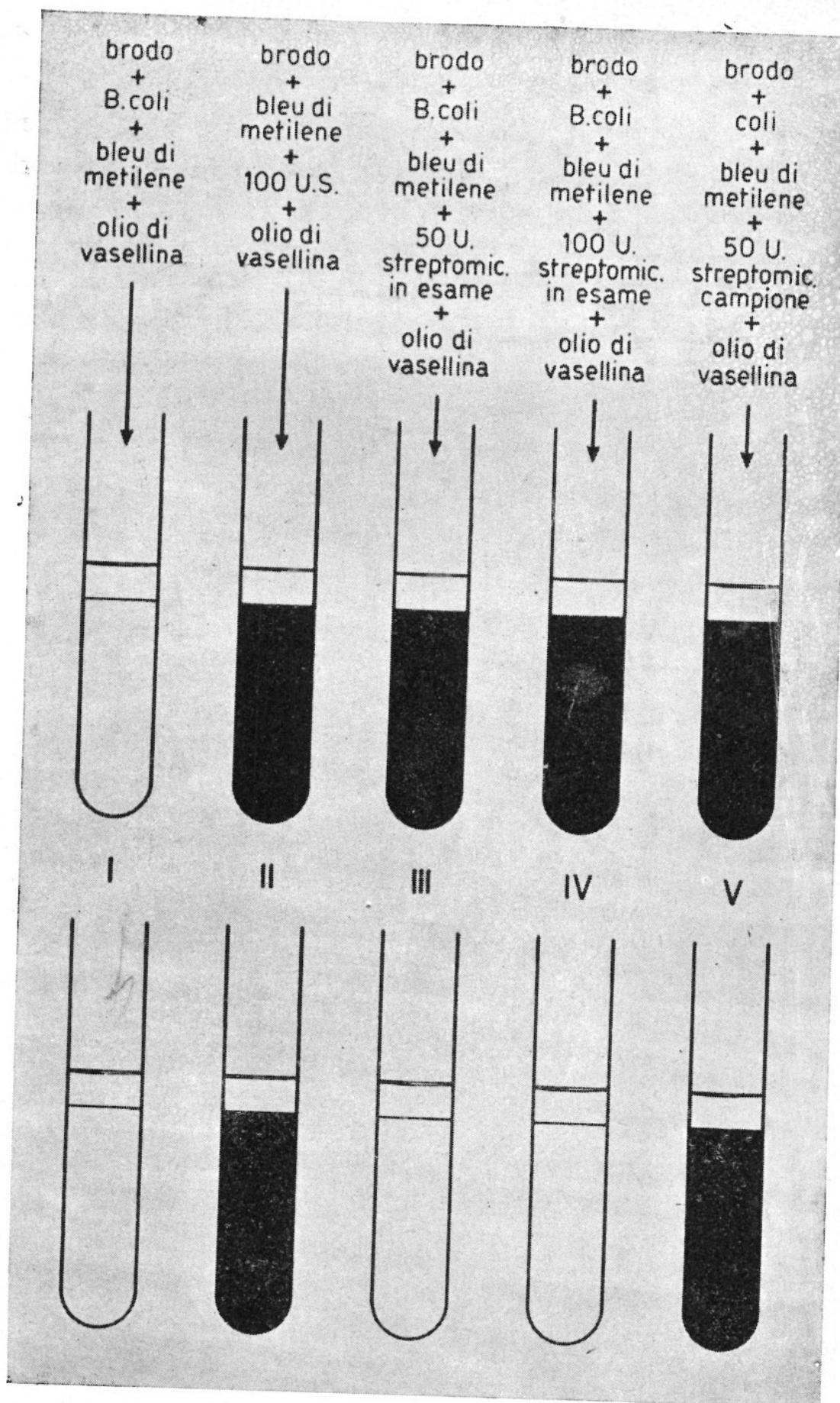


FIG. 5. — Rappresentazione schematica del metodo rapido di controllo di un campione di streptomicina, adoperando come indicatore il bleu di metilene. Le provette chiare mostrano l'avvenuta decolorazione del terreno di cultura; le provette scure indicano che non si è avuta nessuna decolorazione.

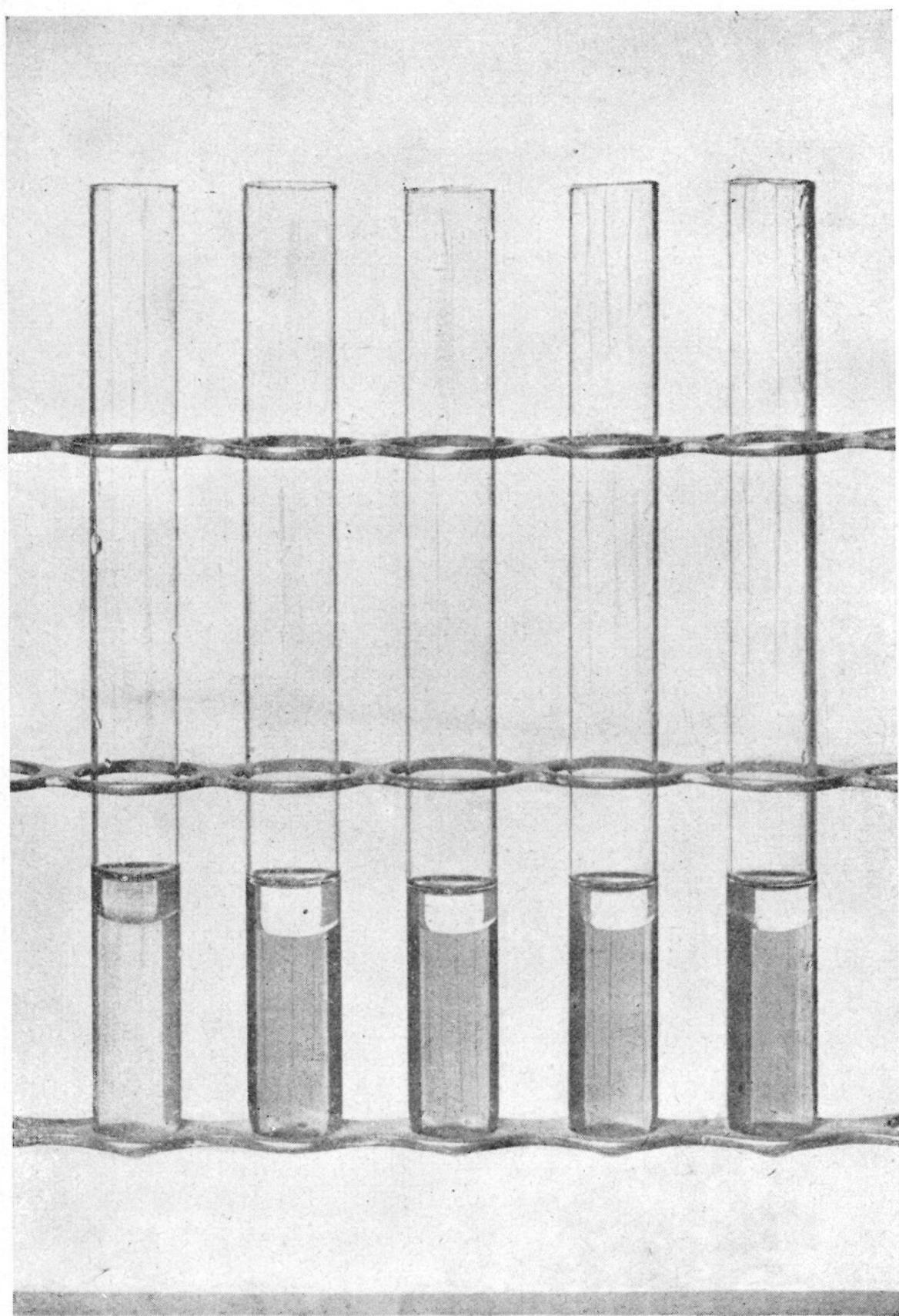


FIG. 6. — Controllo favorevole di un campione di streptomicina: provetta n. 1 (controllo) riduzione del terreno di cultura; provetta n. 2, contenente solo streptomicina senza germi, nessuna riduzione; provette nn. 3 e 4 contenenti la streptomicina in esame (50 e 100 U.), nessuna riduzione; provetta n. 5, contenente streptomicina campione (50 U.), nessuna riduzione.

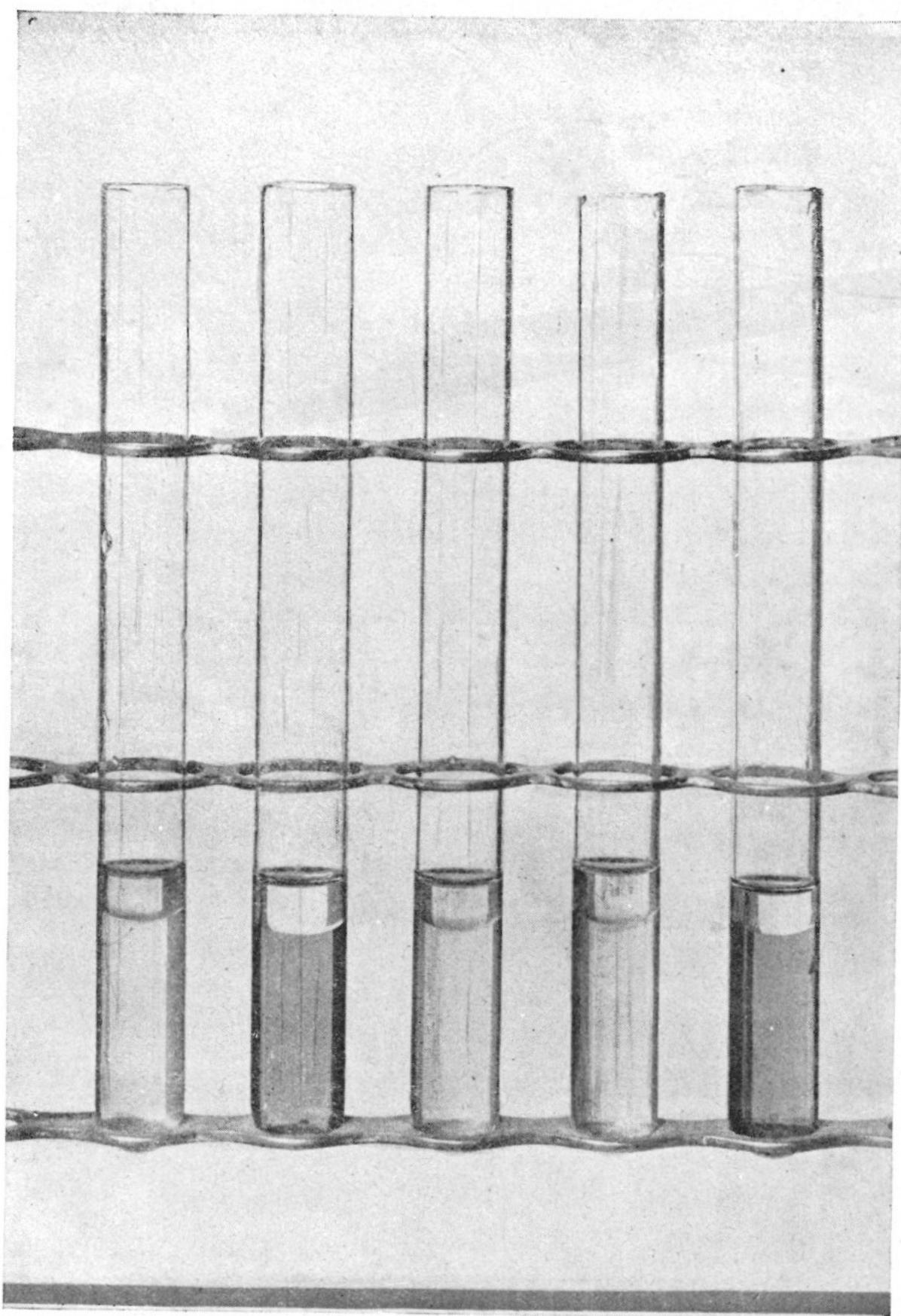


FIG. 7. — Controllo sfavorevole di un campione di streptomicina: le provette 3 e 4 contenenti rispettivamente 50 e 100 U. della sostanza in esame, mostrano uno schiarimento del terreno di cultura per l'avvenuto sviluppo batterico, nonostante la presenza dell'antibiotico.

Dopo 2 ore e mezzo di permanenza in termostato, si fa la prima osservazione: in genere è apprezzabile nella 1^a provetta, contenente solo B.coli senza streptomicina un leggero intorbidamento del brodo ed uno schiarimento più o meno marcato del colore. Dopo 3 ore tale schiarimento è quasi completo. Nella 2^a e 5^a provetta il colore deve restare immutato; nella 3^a e 4^a si dovrà avere riduzione del colore, se non trattasi di streptomicina, altrimenti anche in queste provette il bleu di metilene dovrà rimanere invariato (figure 5, 6 e 7).

Alle volte, pur trattandosi di streptomicina autentica, nella 3^a provetta, contenente 50 U.S., si potrà avere un leggero schiarimento del colore: in tal caso si deve pensare che la sostanza in esame è streptomicina, ma il suo titolo è inferiore a quello dichiarato.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità. 22 febbraio 1948.
