

ANTIBIOGRAMMA

METODI PER DETERMINARE LA SENSIBILITA' AGLI AGENTI ANTIMICROBICI

Generalità

L'isolamento e l'identificazione degli agenti patogeni responsabili di manifestazioni cliniche nell'uomo è premessa indispensabile per valutare la necessità dell'intervento terapeutico: di questi agenti è necessario valutare il numero e la specie.

In caso di infezioni miste le prove di sensibilità vanno eseguite separatamente per ogni specie microbica: le prove di sensibilità diretta su materiale patologico polimicrobico sono in genere non valide, anche in relazione al fatto che non è noto il numero dei microrganismi viventi presenti, fattore indispensabile per le prove di sensibilità.

Per la valutazione delle prove in vitro bisogna tenere conto tra l'altro:

- sede di infezione in relazione alla concentrazione che l'agente microbico può raggiungere in essa;
- possibile influenza del pH del mezzo colturale;
- presenza di sostanze organiche che possono ridurre l'attività dell'agente antimicrobico ed impedirne la diffusione;
- influenza dell'agente microbico sui fattori di virulenza;
- azione batteriostatica (microstatica nel caso di miceti) o battericida (micocida nel caso di miceti).

I metodi per determinare la sensibilità dei microrganismi agli agenti antimicrobici si dividono in due gruppi: metodi per diluizione e metodi per diffusione.

Metodi per diluizione

Sono in genere migliori per precisione, standardizzazione e riproducibilità; se effettuati con un ampio numero di diluizioni e numerosi ceppi microbici sono nella maggior parte dei casi utilizzati per la valutazione di nuovi agenti antimicrobici. Nei metodi per diluizione l'interpretazione dei risultati si ottiene valutando la crescita microbica in terreni di coltura addizionati di concentrazioni scalari dell'agente antimicrobico (a.a.); è importante evitare l'utilizzo di terreni di coltura che possono inibire l'attività di alcuni a.a. L'agente antimicrobico utilizzato deve essere sterile, opportunamente conservato e ad attività nota. Con i metodi di diluizione è possibile infine valutare l'associazione di due o più farmaci.

I **vantaggi** dei metodi per diluizione sono la possibilità di calcolare con precisione la dose minima inibente, inoltre si può studiare (nel caso di terreni liquidi) l'attività microbica.

Gli **inconvenienti** riguardano soprattutto i terreni liquidi e si riferiscono ad errori di valutazione per la presenza di eventuali germi contaminanti, di mutanti resistenti all'a.a. o all'aspecifico intorbidamento del terreno dovuto a sostanze aggiunte ad esso dall'a.a.

Con i metodi di diluizione è possibile valutare l'azione sinergica, antagonista o nulla dell'associazione di due o più a.a.

Tecnica in terreno liquido

L'inoculo è preparato da una coltura batterica, sviluppata a 35°C per 18h, in fase di crescita logaritmica.

- dosare l'inoculo con metodi spettrofotometrici, con misura della torbidità o con camera contaglobuli;
- diluire l'a.a. dalla soluzione madre scalarmente (per raddoppio) in contenitori contenenti un uguale volume di terreno di coltura;

- seminare una quantità costante della sospensione microbica in esame (inoculo); il numero dei germi seminati è in genere compreso tra 10^5 – 10^6 cell/ml finale in modo da ridurre la possibile presenza di mutanti resistenti;
- seminare per controllo il terreno di coltura senza a.a. (controllo di sviluppo del ceppo);
- incubare la provetta a temperatura di 35°C per 16 – 20h;
- lettura dei risultati spettrofotometrica o ad occhio nudo valutando l'assenza di sviluppo (assenza di intorbidamento o meglio non aumento dell'eventuale intorbidamento dovuto all'inoculo).

La concentrazione più bassa di a.a. in grado di inibire la crescita microbica viene definita **Concentrazione Minima Inibente** (M.I.C.) e viene espressa in microgrammi/ml o U.I. per ml.

La **Concentrazione Minima Battericida** (M.B.C.), cioè la più bassa concentrazione in microgrammi/ml di a.a. che determina la morte del 99,9% dei batteri presenti, si determina effettuando subcolture in terreno solido o liquido dalle diluizioni in cui vi è stata inibizione dello sviluppo batterico; per la semina si può utilizzare il centrifugato della coltura inibita. La crescita nelle subcolture indica che l'azione inibente dell'a.a. è di natura batteriostatica e non battericida.

I metodi più usati per determinare in vitro le MIC degli a.a. verso i batteri in terreno liquido si differenziano in base al tipo di contenitore utilizzato:

metodo in provetta (metodo di Ericsson e Sherris), il volume di terreno liquido può essere 10 ml, 5 ml, 3 ml, la metodica è quella precedentemente discussa;

micrometodo in pozzetti, sostanzialmente identico al metodo delle diluizioni in provetta, le MIC vengono determinate in microtiter (piastre di plastica o vetro con micropozzetti scavati all'interno) valutando l'intorbidamento o la formazione di sedimento superiore all'inoculo.

Tecnica in terreno solido

- L'inoculo è preparato da una coltura batterica per incubazione a 35°C per 16 – 20h;
- dosare l'inoculo con spettrofotometro o analisi turbidimetrica (MacFarland), allestire un microtiter nei cui pozzetti vengono distribuiti i ceppi microbici da saggiare;
- diluire scalarmente l'a.a. in provette contenenti terreno nutritivo agarizzato sciolto e portato a temperatura non inattivante per l'a.a.
- versare in piastre petri il contenuto delle provette;
- aspettare la solidificazione della piastra contenente il terreno più l'a.a. e far asciugare dai residui di umidità sulla sua superficie;
- seminare per infissione con l'ausilio di un replicatore a 60 punte i ceppi microbici preparati. Ciò consente l'esame contemporaneo di un numero elevato di colture: la semina viene effettuata in tutte le piastre a partire dal controllo non contenente a.a.;
- incubare a 35°C per 18h.

La lettura dei risultati si basa sulla presenza di crescita microbica nel punto di inoculo delle punte del replicatore per i microrganismi resistenti ad una determinata concentrazione di a.a. e assenza di crescita per i microrganismi sensibili; la correlazione tra ciascun microrganismo inoculato e la sensibilità all'a.a. può avvenire perché ogni microrganismo è identificato con un numero di riferimento. Si effettua il calcolo della MIC per ogni ceppo microbico verificando l'assenza di crescita nella serie di piastre.

Metodi per diffusione

È una prova di sensibilità di un microrganismo verso numerosi agenti antimicrobici (a.a.) su piastre di terreno solido mediante applicazione, con tecniche differenti, di agenti antimicrobici sul terreno solido inoculato con il microrganismo da esaminare.

L'a.a. diffonde radialmente a partire dal punto in cui è stato deposto creando un gradiente di concentrazione; nella zona circolare di agar dove l'a.a. raggiunge una concentrazione uguale o superiore alla concentrazione minima inibente (MIC) non si avrà crescita microbica ma si formerà una **zona di inibizione** il cui diametro è in relazione alla sensibilità del microrganismo all'a.a.

L'antibiogramma si può effettuare applicando sulla superficie della piastra dischetti di carta da filtro (**carta bibula**) sterili perfettamente aderenti contenenti concentrazione nota e standard di a.a.; i chemioantibiotici diffondono in rapporto alla diffusibilità in terreno di coltura.

Per risalire dal diametro dell'alone di inibizione alla sensibilità del microrganismo bisogna relazionare tale valore, attraverso una retta di regressione, ai valori di MIC in microngrammi/ml ottenuti con il metodo della diluizione in terreno liquido.

Generalmente questi metodi vengono interpretati qualitativamente per distinguere i ceppi sensibili dai resistenti.

Nell'esecuzione di un antibiogramma per diffusione bisogna prestare attenzione a:

- variabili di natura propriamente tecnica (tipo di piastra, qualità del terreno di coltura, applicazione corretta dell'antibiotico, ecc.);
- variabili di natura biologica (numero di microrganismi insemnati, temperatura di incubazione, tempo di incubazione). Pertanto una perfetta standardizzazione delle metodiche è alla base di una corretta interpretazione dei risultati.

Il metodo standardizzato più utilizzato è quello di Bauer-Kirby; con questa metodica il terreno di coltura deve rispondere ad alcune proprietà come pH e concentrazione ionica adeguati, concentrazione e spessore uniforme dell'agar.

Poiché la diffusione dell'antibiotico nell'agar avviene in relazione all'uniformità dello spessore del terreno nelle piastre la metodica richiede:

- piastre piane e disposte su una superficie orizzontale;
- concentrazione dell'agar di 1,5-2% ;
- spessore dell'agar di 4 mm calcolato in base alle dimensioni delle piastre e la quantità di terreno adoperato;
- scelta del terreno di coltura adeguato; generalmente si utilizza Mueller Hinton (pH compreso tra 7.2 e 7.4) il quale non interferisce con l'attività dei vari antibiotici. Tuttavia anche uno stesso terreno di coltura a seconda delle diverse partite può presentare notevoli differenze nella concentrazione ionica (il particolare la concentrazione di calcio e magnesio può interferire con la grandezza degli aloni di inibizione), nella conducibilità elettrica, ecc. Inoltre è da rilevare che l'aggiunta di sangue al terreno di coltura può modificare l'attività di un a.a.
- dosaggio dell'inoculo, necessario perché la grandezza degli aloni di inibizione è in relazione al numero di microrganismi seminati. Per standardizzare la densità dell'inoculo si può usare un metodo microscopico opacimetrico (MacFarland) o spettrofotometrico. L'inoculo ottenuto da diluizione della coltura pura deve contenere $10^5 - 10^6$ germi/ml finale;
- allestimento dell'agar germi mediante:
 1. semina dell'inoculo nella massa dell'agar;

2. semina dell'inoculo sulla superficie della piastra (in questo caso previo essiccamento della piastra prima della semina);
 - essiccamento della piastra dopo la semina;
 - deposizione dei dischetti contenenti gli a.a. sul terreno di coltura asciugato, utilizzando pinze sterilizzate alla fiamma e successivamente raffreddate. È opportuno conservare adeguatamente gli a.a. onde evitare l'inattivazione;
 - permettere una prediffusione dell'a.a. nella massa dell'agar a temperatura ambiente, alla quale non si verifica moltiplicazione batterica;
 - incubare in un termostato alla temperatura di 5°C per un periodo variabile tra 6-8h e 16-20h;
 - procedere alla lettura della grandezza degli aloni di inibizione utilizzando un calibro adatto e valutando se all'interno dell'alone si notano colonie di sviluppo, indice di germi resistenti;
 - valutazione degli aloni.

Secondo l'N.C.C.L.S. (National Committee for Clinical Laboratory Standards) si è stabilito che per le specie microbiche saggiate con dischetto contenente a.a. (a concentrazione fissa) il diametro dell'alone di inibizione deve rispondere a certi valori al di sotto dei quali il microrganismo viene considerato **resistente**, al di sopra dei quali viene considerato **sensibile**; esiste inoltre una zona definita intermedia in cui si deve stabilire se il microrganismo è sensibile o resistente che per questo viene definito **intermedio**.