



GUIDA ALL'ANTIBIOGRAMMA

1. Scopo e campo di applicazione

La presente guida descrive le modalità adottate per l'esecuzione e l'interpretazione dei saggi di sensibilità agli antibiotici (antibiogrammi) a cui vengono sottoposti gli stipti batterici isolati presso i laboratori dell'Istituto durante le prove microbiologiche. E' destinato all'utenza dell'Ente con l'obiettivo di:

- Migliorare la comprensione del servizio reso e quindi la sua fruibilità
- Far conoscere e giustificare le modalità tecniche di esecuzione, i tempi di risposta, i riferimenti normativi ed i conseguenti vincoli tecnici a cui la prova è necessariamente sottoposta

2. Definizioni

Antibiogramma: esame che stabilisce la sensibilità o la resistenza di un ceppo batterico a vari antibiotici

Utente/Utenza: il soggetto pubblico o privato che si avvale dei servizi dell'Istituto

3. Il saggio di sensibilità agli antibiotici

All'esame colturale segue di solito il saggio della sensibilità agli antibiotici dei patogeni isolati. Il test prende il nome di *antibiogramma* ed ha lo scopo di saggiare in vitro l'effetto degli antibiotici sul patogeno, anticipando informazioni utili ai fini della terapia.

L'antibiogramma viene di solito eseguito con la tecnica detta di agar-diffusione, indicata anche come *tecnica Kirby-Bauer* (6.2; 6.9).

In un adatto *medium* di coltura il microrganismo in esame viene messo a contatto con dischetti di carta bibula contenenti gli antibiotici da saggiare e viene quindi valutata l'azione di questi sulla crescita del microrganismo.

L'esecuzione di un antibiogramma consiste nelle seguenti fasi ([vedi](#))(6.1):

- il microrganismo da testare viene inoculato sulla superficie di un substrato di crescita in piastra sul quale vengono applicati i dischetti contenenti concentrazioni standardizzate degli antibiotici
- Le piastre del terreno vengono incubate in termostato a temperatura e tempo prestabiliti. Durante l'incubazione, l'antibiotico in esame si diffonde sulla superficie del terreno ed il microrganismo risulta quindi esposto ad un gradiente di concentrazione che diminuisce con la distanza dal dischetto
- Dopo un appropriato periodo di incubazione, che non deve superare le 24 ore, si misura l'alone di inibizione della crescita del microrganismo attorno al dischetto

Il diametro dell'alone è legato alla sensibilità del batterio all'antibiotico.



GUIDA ALL'ANTIBIOGRAMMA

La misura dell'alone viene interpretata secondo Linee Guida Internazionali, fra le quali le più conosciute ed utilizzate sono quelle del *Clinical and Laboratory Standards Institute* americano (CLSI) (6.7), ed il microrganismo categorizzato in sensibile, intermedio o resistente.

4. Limiti del test

La tecnica descritta è stata messa a punto per assecondare esigenze e tempi della diagnostica, ma ha alcuni limiti. E' applicabile al saggio della sensibilità di microrganismi comuni, a rapida crescita, non particolarmente esigenti, come Stafilococchi, Enterobatteri, Streptococchi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, (6.7) ma non è applicabile a tutti i microrganismi di importanza diagnostica: anaerobi e batteri a lenta crescita e/o esigenti ne sono infatti in genere esclusi (6.3; 6.4; 6.9; 6.10).

Di seguito alcuni esempi di microrganismi per cui non è eseguibile un antibiogramma tradizionale: batteri anaerobi, Corynebatteri, *Actinomyces spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp.*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (6.3; 6.10).

Tantomeno la tecnica dell'agar diffusione può essere applicata a Mycobatteri (6.9) e Mycoplasmi.

Per tutti questi microrganismi le tecniche di saggio della sensibilità antibiotica sono di più difficile applicazione, richiedono procedure specifiche e non sempre esistono criteri interpretativi standardizzati (6.10).

Da rimarcare ancora che l'affidabilità dei risultati dipende dalla corretta esecuzione e questa dal rispetto di alcuni vincoli tecnici: il microrganismo da saggiare deve essere in coltura pura e recente e, soprattutto, l'antibiogramma deve essere letto entro le 24 ore. Ciò ha una ricaduta sui tempi di risposta: significa, per esempio, che l'antibiogramma non può essere fatto nei giorni prefestivi e che possono essere necessarie anche 24 ore aggiuntive per ottenere il batterio in coltura pura.

Non rispettare o forzare queste prescrizioni significa fornire risultati non validi.

La tecnica inoltre non è applicabile a tutti gli antibiotici utilizzati in terapia, ma solo a quelli per i quali il metodo dell'agar diffusione si è dimostrato valido (6.7).

Non sono inoltre disponibili standard interpretativi per tutte le specie animali e, in mancanza di dati, vi può essere la necessità di ricorrere ad approssimazioni, come l'uso degli standard pensati per la specie umana (6.6).

E' inoltre sconsigliato il saggio contemporaneo di associazioni di antibiotici, tranne qualche caso accettato dalle linee guida (6.9).



GUIDA ALL'ANTIBIOGRAMMA

5. L'interpretazione dell'antibiogramma

Se è vero che non esistono standard interpretativi per tutte le molecole utilizzabili, è anche vero però che i risultati ottenuti con certi antibiotici possono essere generalizzati.

La tetraciclina, ad esempio, è rappresentativa dell'intera classe, quindi se un batterio è risultato sensibile alla tetraciclina, va ritenuto sensibile agli antibiotici della stessa categoria (6.9); allo stesso modo il trimetoprim-sulfametoxazolo viene usato per testare la sensibilità a trimetoprim-sulfadiazina (6.6).

A ciò si aggiungano altre considerazioni utili per una corretta interpretazione dell'antibiogramma:

i) Gli stafilococchi sensibili alla penicillina vanno considerati sensibili anche alle altre penicilline, alle loro associazioni con inibitori delle beta-lattamasi e alle cefalosporine. E' sconsigliato testare in vitro la cloxacillina, preferibile testare in questo caso l'oxacillina, il cui risultato è rappresentativo della categoria (6.9).

ii) Enterococchi sensibili alla penicillina sono da considerare sensibili anche ad ampicillina, amoxicillina, amoxicillina/acido clavulanico (6.9).

Il risultato della cefalotina è predittivo per tutte le cefalosporine di 1° generazione.

Le cefalosporine non vanno testate per gli Enterococchi, che su questi hanno scarsa efficacia (6.9).

iii) Gli Enterobatteri sono in genere resistenti alla penicillina. Causa la produzione di *beta-lattamasi*, la resistenza alle beta-lattamine è comparsa infatti in questi batteri già pochi anni dopo la scoperta della penicillina. La maggior parte delle *Enterobacteriaceae* produce infatti varie *beta-lattamasi* con spettri di attività molto diversi.

In ogni caso è preferibile testare l'ampicillina; la sensibilità ad ampicillina è indicativa della sensibilità anche ad amoxicillina (6.9).

Pseudomonas aeruginosa ha resistenza intrinseca o acquisita ad un grande spettro di antibiotici (6.9) e per tale motivo l'antibiogramma dovrebbe essere riservato a casi particolari (es. animali da affezione) con impiego di molecole mirate.

6. Documenti di riferimento / Bibliografia

- 6.1. American Society for Microbiology - Antimicrobial Susceptibility Testing Animation
http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/cclimages/Articleimages/s_hoeb/kirby%20bauer.html
- 6.2. Bauer, AW, Kirby, WMM, Sherris, JC and Turck, M, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496
- 6.3. [CLSI \(formerly NCCLS\). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Document M45-A, 2006](#)
- 6.4. [CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Document M11-A7, 2007](#)



GUIDA ALL'ANTIBIOGRAMMA

- 6.5. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Informational Supplement. CLSI Document M31-S1, 2004
- 6.6. [CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standards – 3rd Edition. CLSI Document M31-A3, 2008](#)
- 6.7. [CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard. 9th Edition. Document M2-A9, 2006](#)
- 6.8. [CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. CLSI Document M24-A, 2003](#)
- 6.9. Fontana R., Cornaglia G. L'antibiogramma. Padova, 2000
- 6.10. [Jorgensen JH, Hindler JF. New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Clinical Infectious Diseases 2007; 44:280–6](#)

7. Contatti Istituto

Sede Centrale Sassari
Dipartimento di Sanità animale
Laboratorio di Batteriologia Speciale
Dott. Stefano Lollai
Tel. 0792892327 - Fax 0792892324
e-mail: stefano.lollai@izs-sardegna.it

Dipartimento Territoriale di Nuoro
Laboratorio di Anatomia Patologica, Istopatologia e Diagnostica Clinica
Dott. Ennio Bandino
Tel. 0784233899 - Fax 0784230421
e-mail: ennio.bandino@izs-sardegna.it

Centro territoriale di Tortolì
Dott.ssa Pierangela Cabras
Tel. e Fax 0782624511
e-mail: pierangela.cabras@izs-sardegna.it

Dipartimento Territoriale di Oristano
Laboratorio di Anatomia Patologica, Istopatologia e Diagnostica Clinica
Dr. Antonio Vidili
Tel. 0783351003 - Fax 0783358931
e-mail: antonio.vidili@izs-sardegna.it

Dipartimento Territoriale di Cagliari
Dott. Manuele Liciardi
Tel. 0702135058 - Fax 0702135121
e-mail: manuel.liciardi@izs-sardegna.it