



GUIDA ALL'ANTIBIOGRAMMA

**Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Sardegna**

A cura del Dott. Stefano Lollai



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'Istituto 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

- 2.1. Antibiogramma: test che stabilisce la sensibilità o la resistenza di un ceppo batterico a vari antibiotici. Nel presente documento ci si riferisce alla tecnica di diffusione in agar o Kirby-Bauer.
- 2.2. MIC: Minima concentrazione inibente. La più bassa concentrazione di un antibiotico capace di inibire *in vitro* la crescita di un batterio.
- 2.3. Utente/Utenza: il soggetto che si avvale dei servizi dell'Istituto

3. Il saggio di sensibilità agli antibiotici

All'isolamento colturale del patogeno segue in genere il saggio di sensibilità agli antibiotici. Il test prende il nome di *antibiogramma* ed ha lo scopo di stabilire *in vitro* l'effetto degli antimicrobici sul patogeno, fornendo informazioni utili alla terapia.

L'antibiogramma viene di solito eseguito con la tecnica detta di agar-diffusione, nota anche come tecnica Kirby-Bauer (6.2; 6.8), che consiste delle seguenti fasi ([vedi](#)) (6.1):

- Una sospensione del microrganismo, contenente un numero standardizzato di cellule batteriche, viene inoculata sulla superficie di un terreno di coltura in piastra (agar Müller Hinton) sul quale poi vengono applicati dischetti di carta bibula ciascuno contenente un antibiotico in concentrazione standard.
 - Le piastre vengono incubate in termostato a temperatura e tempo prestabiliti (35-37 °C per 16-18 o 24 ore).
 - Durante l'incubazione, il microrganismo si sviluppa sull'intera superficie del terreno e l'antibiotico diffonde in modo radiale dal dischetto
 - Il microrganismo risulta quindi esposto ad un gradiente di concentrazione di antibiotico che diminuisce con la distanza dal dischetto

- Dopo un appropriato periodo di incubazione, che in ogni caso non deve superare le 24 ore, si misura l'alone di inibizione della crescita del microrganismo attorno al dischetto dell'antibiotico



Il diametro dell'alone in millimetri è correlato alla sensibilità del batterio all'antibiotico.

La misura dell'alone viene interpretata secondo i criteri stabiliti da linee guida riconosciute ed il microrganismo considerato quindi sensibile, intermedio o resistente. Le linee guida più note e utilizzate sono quelle dell' *EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* europeo (6.7) e quelle del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* americano (6.5).

4. Caratteristiche del test

La tecnica descritta è stata messa a punto per assecondare esigenze e tempi della diagnostica (6.2), 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* (6.6, 6.8) ma non è applicabile a tutti i microrganismi di importanza diagnostica: anaerobi e batteri a lenta crescita e/o esigenti ne sono infatti esclusi (6.3; 6.4; 6.9).

Di seguito alcuni esempi di microrganismi per cui non è stato possibile standardizzare tale tecnica in modo affidabile e per i quali non è quindi possibile eseguire un antibiogramma tradizionale in agar: batteri anaerobi, Corynebatteri, *Actinomyces spp.*, *Trueperella pyogenes* (ex *Arcanobacterium piogenes*), *Bacillus spp.*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (6.3; 6.4). Ancora meno la tecnica dell'agar diffusione può essere applicata a Mycobatteri e Mycoplasmi (6.9).

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 (6.6, 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 i tempi stabiliti (non oltre le 24 ore di incubazione). Ciò ha una ricaduta sui tempi di risposta diagnostica e significa, per esempio, che l'antibiogramma non può essere fatto nei giorni prefestivi e che possono essere necessarie anche 24 ore aggiuntive per ottenere preliminarmente il batterio in coltura pura.

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

E' inoltre sconsigliato il saggio contemporaneo di associazioni di antibiotici, tranne qualche caso accettato dalle linee guida (6.6).

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 (6.6; 6.8).

Non sono inoltre disponibili standard interpretativi per definire sensibilità e resistenza per tutte le specie animali. Sensibilità e/o resistenza dipendono infatti anche dalle concentrazioni che l'antibiotico raggiunge nei liquidi corporei della specie ospite, ovvero dalle sue caratteristiche farmacocinetiche. In particolare, non ci sono standard interpretativi per la specie ovina e, per tale ragione, è ancora accettato ricorrere in prima approssimazione agli standard interpretativi della specie umana (6.5, 6.6).

5. L'interpretazione dell'antibiogramma

Se è vero che non esistono standard interpretativi per tutti i patogeni e gli antibiotici è anche vero però che i risultati di un test di sensibilità possono essere interpretati e generalizzati.

Il test di sensibilità alla tetraciclina, antibiotico rappresentativo dell'intera classe, ne è un esempio: un batterio risultato sensibile alla tetraciclina va ritenuto sensibile anche a ossitetraciclina, clortetraciclina, doxyciclina e minociclina senza che vi sia la necessità di testarle tutte. Necessario ricordare invece che l'ossitetraciclina non ha standard interpretativi e non può essere saggiata come tale nell'antibiogramma (6.5). La sensibilità all'ampicillina è sinonimo di sensibilità ad amoxicillina ed etacillina (6.5), oltre che alle associazioni con inibitori di beta-lattamasi, come amoxicillina-acido clavulanico.

Stafilococchi sensibili alla penicillina vanno considerati sensibili a tutti gli antibiotici beta-lattamici. Stafilococchi resistenti alla penicillina e sensibili all'oxacillina, sono in genere produttori di beta-lattamasi e quindi resistenti a tutte le penicilline disattivate da tale enzima, ma risultano ancora sensibili alle associazioni con inibitori di beta-lattamasi, a meticillina, cloxacillina e alle cefalosporine.

Nell'antibiogramma è sconsigliato testare la cloxacillina perché non dà risultati affidabili. Più opportuno saggiare l'oxacillina, il cui test è predittivo per questa categoria di penicilline. Stafilococchi invece che risultano resistenti all'oxacillina vanno considerati resistenti a tutti i beta-lattamici: l'eventuale sensibilità *in vitro* a penicillina con la contemporanea resistenza a oxacillina sono da considerare un "fenotipo impossibile" (6.5, 6.10). Stafilococchi gentamicina-resistenti vanno ritenuti resistenti a tutti gli aminoglicosidi (tranne streptomina) (6.13).

In genere gli streptococchi sono sensibili a penicillina e ampicillina e non producono beta-lattamasi (inutile testare quindi associazioni del tipo amoxicillina-acido clavulanico) (6.10). Tra gli streptococchi beta-emolitici, la sensibilità alle penicilline è tuttora la regola; isolati sensibili alla penicillina sono sensibili anche ad ampicillina, amoxicillina e cefalosporine. Gli streptococchi viridanti invece mostrano una resistenza più varia verso i beta-lattamici e la sensibilità alle cefalosporine non può

essere predetta dalla sola sensibilità alla penicillina. Sono intrinsecamente sensibili ai macrolidi (6.11, 6.12).

Gli Enterococchi sono per natura resistenti alle cefalosporine e perciò tali molecole non vanno testate su questi microrganismi. Sono in genere sensibili a penicillina e ampicillina, mostrando però delle MIC relativamente elevate. Gli enterococchi risultati sensibili alla penicillina vanno considerati sensibili anche ad ampicillina, amoxicillina, e amoxicillina-acido clavulanico. Sono intrinsecamente resistenti anche ad eritromicina e clindamicina (6.6, 6.10).

Da considerare inoltre che streptococchi ed enterococchi sono di norma resistenti al trimethoprim-sulfametoxazolo e agli aminoglicosidi e che i batteri Gram-positivi in genere sono intrinsecamente resistenti a polymyxina B, colistina e acido nalidixico (6.10, 6.11).

Le Enterobacteriaceae sono resistenti alla penicillina. La maggior parte di questi microrganismi produce infatti varie beta-lattamasi, enzimi litici in grado di disattivare questi antibiotici, con spettri di azione assai ampi. Sono inoltre da considerare intrinsecamente resistenti ai glicopeptidi (es. vancomicina, polimixina), acido fusidico, ai macrolidi, lincosamidi e rifampicina. Il genere *Proteus* è intrinsecamente resistente alla tetraciclina, alla nitrofurantoina e alla colistina; *Serratia marcescens* alla colistina (6.11).

Negli Enterobatteri il risultato della cefalotina è predittivo per tutte le cefalosporine tranne la cefazolina, che dovrebbe essere testata a parte (6.5).

Pseudomonas aeruginosa ha resistenza intrinseca o acquisita ad un gran numero di antibiotici, tra i quali, ad esempio, tetracicline, macrolidi, lincosamidi, e penicilline (tranne le carbossipenicilline e le ureidopenicilline) (6.11) e per tale motivo l'antibiogramma dovrebbe essere riservato a casi particolari con impiego di molecole mirate.

Si rimanda ai lavori elencati in bibliografia per eventuali approfondimenti.

6. Documenti di riferimento / Bibliografia

- 6.1. [Antimicrobial susceptibility testing. Agar disc diffusion technique.](#)
- 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. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria](#), Document M45, 3rd Ed., 2016.
- 6.4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria](#). Document M11-A8, 2012.
- 6.5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals](#), Document VET 01S-Ed. 3, 2015.
- 6.6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution. Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals](#). Document VET01-A4, 2013
- 6.7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). [Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.](#)
- 6.8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests](#). Approved standard. Document M2-A12, 2015.
- 6.9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes](#). Document M24, 2nd ed., 2011
- 6.10. Fontana R., Cornaglia G. L'antibiogramma. Padova, 2000
- 6.11. Jorgensen JH, Hindler JF. [New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria](#). Clin Inf Dis, 2007; 44:280-6
- 6.12. Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRAB). [Linee guida per l'interpretazione delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici in vitro per un utilizzo nella terapia clinica](#)
- 6.13. Leclercq R., Canton R., Brown D.F.J., Giske C.G., Heisig P., MacGowan A.P., Mouton J.W., Nordmann P., Rodloff A.C., Rossolini G.M., Soussy C.J., Steinbakk M., Winstanley T.G., and Kahlmeter G. [EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing](#). Clin Microbiol Infect, Vol. 19, N. 2, 2013
- 6.14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). [EUCAST Expert rules, intrinsic resistance and exceptional phenotypes](#) v 3.1, 2016.

7. Contatti Istituto

Dott. Stefano A. Lollai

Struttura Complessa Sanità Animale

Laboratorio di Microbiologia Speciale e Collezione Ceppi Batterici

Tel. 0792892327

e-mail: stefano.lollai@izs-sardegna.it

Dott.ssa E. Agnese Cannas

Centro di Referenza Nazionale per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini

Tel. 0792892214

e-mail: agnese.cannas@izs-sardegna.it