

ANTIBIOGRAMMA: MIC, Kirby-Bauer, E-test

Tre sono i metodi usati per determinare in vitro la MIC degli antibiotici verso i batteri:

- METODO DELLE DILUIZIONI IN BRODO
- METODO DI KIRBY-BAUER O TEST DI DIFFUSIONE IN AGAR
- MICROMETODO DELLE DILUIZIONI IN BRODO

METODO DELLE DILUIZIONI IN BRODO

E' stato uno dei primi ad essere sviluppato ed è ancora oggi utilizzato come test di riferimento. Consiste nell'allestire 10 provette contenenti una brodocoltura in cui sono distribuite serialmente concentrazioni di antibiotico che vanno da un minimo ad un massimo; la decima provetta viene utilizzata come controllo della crescita. Le provette vengono inoculate con una sospensione standardizzata di batteri da saggiare ed infine incubata a 35°C per 18 ore. Al termine dell'incubazione, le provette sono esaminate per mettere in evidenza l'eventuale intorbidamento del brodo; la torbidità indica che la crescita batterica non è stata inibita dalla concentrazione di antibiotico contenuta nel terreno. Per convenzione si indica come MIC, la concentrazione dell'antibiotico presente nella prima provetta in cui non si osserva crescita visibile.

Batteriologicamente si definisce MIC la più bassa concentrazione di antibiotico in $\mu\text{g/ml}$ capace di inibire in vitro la crescita batterica. Il significato clinico della MIC è che la concentrazione da essa indicata deve raggiungere il sito dell'infezione se si vuole inibire la crescita del microorganismo; in genere sono però necessarie concentrazioni superiori alle MIC in quanto altri fattori, quali il legame dell'antibiotico con le proteine seriche o la distribuzione nei tessuti di inibitori tissutali nell'essudato infiammatorio possono ridurre l'attività del farmaco.

A differenza della MIC, la concentrazione minima battericida (MCB) è la più bassa concentrazione in $\mu\text{g/ml}$, che provoca la morte del 99,9% dei batteri in

esame; subcolture da provette apparentemente prive di batteri in quanto limpide, in terreni privi di antibiotici, danno origine a colonie; la concentrazione della prima provetta in cui non si ha più crescita, corrisponde alla MCB.

Nella pratica i medici si servono dei valori della MCB per trattare i pazienti in malattie infettive le cui difese naturali siano gravemente compromesse, particolarmente in pazienti in terapia antiblastica o immunosoppressiva e nelle endocarditi infettive.

Nei pazienti con infezioni non complicate, la cui risposta immunitaria sia normale, i valori delle MIC sono sufficienti e possono servire da guida per impostare la terapia.

METODO DI KIRBY-BAUER O DELLA DIFFUSIONE IN AGAR

Il metodo di Kirby-Bauer si basa sul principio che un dischetto di carta imbevuto di antibiotico e poi seccato, depositato su un terreno insemato con un ceppo batterico, a contatto con la superficie umida dell'agar, assorbe l'acqua e rilascia l'antibiotico che diffonde nel terreno circostante.

La velocità di estrazione dell'antibiotico dal dischetto è maggiore della sua diffusione nel terreno, per cui nella zona vicina al dischetto la concentrazione è maggiore che nel dischetto stesso, ma allontanandosi dal dischetto si ha una riduzione logaritmica fino a giungere ad un punto in cui la crescita batterica sulla superficie dell'agar non viene più inibita.

L'inibizione alla zona di crescita rappresenta la MIC; dalla misura del diametro dell'alone di inibizione si risale alla MIC attraverso una curva di regressione (nell'esempio riportato un diametro di inibizione di 18 mm corrisponde ad una MIC di 6.25 µg/ml che equivale al punto limite del test di diluizione in brodo illustrato in precedenza).

Il test di diffusione fornisce una risposta di tipo qualitativo: sensibile, intermedio, resistente; intermedio significa non interpretabile: le dimensioni

degli aloni di inibizione dipendono dalle caratteristiche fisico-chimiche dell'antibiotico, dallo spessore dell'agar, dalla composizione e pH oltre che dalla sensibilità del germe.

E' un grosso errore definire un germe sensibile ad un antibiotico, solo per la presenza di alone. E' sempre necessario misurare l'alone di inibizione con un calibro e consultare le tavole di conversione.

La concentrazione di antibiotico nel sangue e nei tessuti, la distribuzione della sensibilità nell'ambito delle specie e la valutazione dell'efficacia del farmaco nella terapia sono i frutti di esperienze passate (es. gentamicina: la risposta di tipo qualitativo, pur permettendo di individuare due classi di antibiotici, attivi e non attivi, non dà tuttavia alcun contributo nella scelta dell'antibiotico più efficace per la patologia in esame).

MICROMETODO DELLE DILUIZIONI IN BRODO

E' simile al metodo delle diluizioni in brodo già descritto.

Tale metodo si diversifica in quanto la sensibilità dei microrganismi ai farmaci antimicrobici viene determinata in micropiastra anziché in provette; la micropiastra è suddivisa in 12 file di pozzetti, in ciascuna fila è presente un antibiotico liofilizzato a concentrazioni crescenti, un pozzetto privo di antibiotico funge da controllo della crescita.

Una quantità fissa di brodocoltura contenente una concentrazione nota di germi, viene aggiunta in ciascun pozzetto, facendo uso di un distributore automatico, la piastra viene poi coperta e incubata a 35°C per 18 ore.

La lettura è semiautomatica, in quanto i dati rilevati otticamente dall'operatore vengono inseriti in un PC che li elabora confrontandoli con quelli memorizzati nel programma. Le osservazioni vengono trasformate dal computer in categorie di sensibilità (S, I, R, MS) e viene espresso il reale valore numerico della MIC dell'antibiotico nei confronti del ceppo in esame responsabile dell'infezione.

Impiego della MIC nella scelta della terapia: premesse

La quantità minima di antibiotico richiesta per inibire una crescita visibile del batterio “in vitro”, è la concentrazione minima inibente.

Le infezioni batteriche possono essere curate se il focolaio dell'infezione viene raggiunto da una quantità di antibiotico sufficiente.

Nelle infezioni del sangue e dei tessuti molli il livello ematico deve essere sempre uguale o maggiore alla MIC come anche nelle infezioni del CSF e del liquido amniotico, nei quali le concentrazioni sono di norma inferiori ai livelli ematici.

Le concentrazioni di tutti gli antibiotici nelle urine è molto più elevata che nel sangue; nelle cistiti, la concentrazione urinaria degli antibiotici dovrebbe essere più elevata della MIC. Nella pielonefrite il livello ematico dovrebbe essere superiore alla MIC per tutta la durata della terapia.

Supponiamo di avere isolato dalle urine 1.000.000 di E.coli/ml e di avere la risposta di sensibilità a 10 dei 15 antibiotici testati; il medico potrà scegliere tra i 10 sensibili facendo riferimento soltanto alle categorie di sensibilità e applicare il dosaggio consigliato o scegliere l'antibiotico più idoneo per il paziente da trattare, tenendo conto della via di somministrazione e della diffusibilità, inoltre modulare il dosaggio a seconda della MIC da raggiungere nel sito di infezione.

In questo secondo caso, dovrà esaminare la tabella a pg. 26 del libretto guida all'antibiotico terapia utilizzando la MIC che offre la visione globale della correlazione tra il dosaggio utilizzato e le concentrazioni raggiunte nei vari distretti corporei per 21 degli antibiotici più utilizzati.

I livelli urinari sono sempre enormemente più elevati di quelli ematici; supponiamo che la scelta cada sull'ampicillina perché più indicata per il

paziente in esame (es. si tratta di cistite in donna gravida); nel nostro referto l'ampicillina ha una MIC di 32 µg/ml = resistente. A pg. 6 dello stesso libretto troviamo spiegazioni più dettagliate riguardo l'antibiotico in esame: osserviamo come esista un range di sensibilità da 0.25 µg/ml a 1 µg/ml, uno di moderata sensibilità da 2 µg/ml a 16 µg/ml ed uno di resistenza da 32 µg/ml in poi.

Se l'infezione fosse nel sangue, anche con una MIC di 8 µg/ml somministrando 3 mg e.v. ogni 4 ore, la terapia potrebbe non avere successo in quanto il livello minimo raggiunto dall'antibiotico nel sangue è di 6 µg/ml, pertanto inferiore alla MIC.

Nel nostro caso, il germe in causa è responsabile di cistite; un dosaggio di 250 µg/ml per os. ogni 6 ore dovrebbe essere adeguato in quanto con tale dosaggio si ottiene una concentrazione urinaria media di 175 µg/ml, più che sufficiente per debellare il microrganismo.

E-TEST

E' un metodo quantitativo per la determinazione della sensibilità agli antibiotici sia di batteri G- e G+ non esigenti (enterobatteriacee, pseudomonacee, stafilococchi ed enterococchi), sia di batteri esigenti come gli anaerobi, pneumococco ed emofili. Il sistema, che prevede l'impiego di un gradiente di antibiotico predefinito, permette di eseguire la determinazione della MIC espressa in µg/ml di un singolo antibiotico nei confronti di microrganismi cresciuti su terreno agarizzato.

Principio del test

E-test consiste in una combinazione dei saggi di diffusione e di diluizione. Come altri metodi per la determinazione della MIC, E-test quantifica direttamente la sensibilità agli antibiotici con valori distinti di MIC. Poiché i valori di MIC, ottenuti con E-test, sono determinati mediante un gradiente

predefinito e continuo di concentrazione di antibiotico, sono più precisi rispetto a quelli ricavati in modo convenzionale con serie di diluizioni discontinue ottenute per raddoppio.

Sebbene E-test funzioni come un metodo di diffusione in agar con dischetto, differisce da questa metodica convenzionale in quanto impiega un gradiente stabile e preformato di concentrazione di antibiotico.

E-test consiste di una sottile striscia di plastica inerte e non porosa, larga 5 mm e lunga 60 mm. Su una faccia della striscia è riportata una scala di lettura graduata espressa in $\mu\text{g/ml}$, un codice a due lettere specifica il tipo di antibiotico. Sull'altra faccia della striscia è immobilizzato l'antibiotico essiccato e stabilizzato, la concentrazione è in gradiente esponenziale predefinito, con il valore massimo all'estremità superiore e il valore minimo a quella inferiore.

Il gradiente comprende una gamma di concentrazioni che variano da 0,002 a 32 $\mu\text{g/ml}$, da 0,016 a 256 $\mu\text{g/ml}$ oppure da 0.064 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ in funzione dell'antibiotico. Questa gamma corrisponde a 15 diluizioni per raddoppio usate nei metodi convenzionali per la determinazione della MIC.

Quando la striscia E-test viene applicata sulla superficie inocolata della piastra, il rilascio di antibiotico dal supporto di plastica alla matrice agarizzata è immediato. Un gradiente continuo ed esponenziale di concentrazione di antibiotico si forma direttamente sotto la striscia di supporto. Dopo incubazione, quando la crescita batterica si rende visibile, si può osservare un alone di inibizione ellittico, centrato lungo la striscia di plastica. Il valore di MIC viene letto nel punto di intersezione tra il bordo dell'ellisse di inibizione e la striscia E-test.

Per ottenere MIC riproducibili con un sistema basato su un gradiente di antibiotico, è necessario che l'antibiotico sia stabile per tutta la durata del periodo critico, durante il quale si forma l'alone di inibizione per una particolare combinazione batterio-antibiotico. E' stato dimostrato che i valori

di MIC ottenuti con E-test, grazie alla stabilità e alla precisione del gradiente di antibiotico, sono risultati riproducibili e direttamente proporzionali ai valori di MIC ottenuti con il sistema di riferimento di agar diluizione proposto dall' NCCLS