

ANTIBIOGRAMMA



a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni

OBIETTIVO:

Stabilire lo spettro di sensibilità di un determinato ceppo microbico a diversi antibiotici.

PRINCIPIO:

Come nell'esperienza dei disinfettanti, la valutazione della sensibilità del ceppo microbico in esame a diversi antibiotici, si effettua misurando il diametro dell'alone di inibizione che si è formato intorno a dischetti contenenti quantità prestabilite e controllate di antibiotico (tecnica di Kirby-Bauer). L'interpretazione dei risultati la si ottiene consultando apposite tabelle che permettono di stabilire se il ceppo microbico è resistente, intermedio o sensibile ad un determinato antibiotico.

MATERIALI E STRUMENTI:

MATERIALI BIOLOGICI

Culture microbiche di *Escherichia Coli*, *Enterobacter aerogenes*

MATERIALI CHIMICI

Standard MacFarland, dischi di antibiotici

TERRENI DI COLTURA

Trypticase Soy broth, Mueller Hinton agar

VETRERIA, ...

Piastre sterili, ansa, provette 16x100, tamponi sterili, pinze metalliche, beker 100 ml, righello

STRUMENTI

Bilancia, autoclave, termostato, bunsen



Standard MacFarland - (standard di torbidità):

0,5 ml di Bario cloruro 0,048M + 99,5 ml di Acido Solforico 0,35 N (0,99 ml/100ml di acido solforico, 0,117 g/10 ml di Bario Cloruro).

Tale standard corrisponde circa a 10^8 batteri/ml). La soluzione è stabile per circa 6 mesi. Agitare prima dell'uso.

METODICA

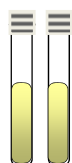
(1^a FASE)

1



Preparare il brodo.

2



Distribuire 4-5 ml di brodo in ogni provetta.

3



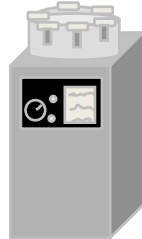
Preparare il terreno Mueller Hinton agar a doppio volume.

4



Distribuire in provettoni con tappo metallico (40 ml per provettone).

5



Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'.

METODICA

(2^a FASE 1° parte)

1



Piastrare il terreno Mueller Hinton agar in ambiente sterile.

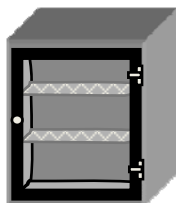
(2^a FASE 2° parte)

1



Con l'ansa, inoculare un ceppo microbico in ogni provetta contenente il brodo TSB.

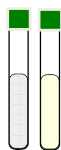
2



Incubare le provette a 37° per 18h.

(3^a FASE 1° parte)

1

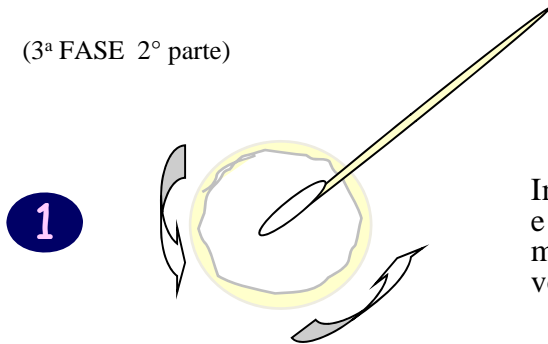


Standardizzare l'inoculo confrontando la torbidità della brodocoltura con quella dello standard MacFarland, (tale standard corrisponde circa a 10^8 batteri/ml) usare brodo sterile per eventuali diluizioni della brodocoltura.

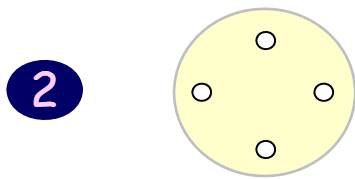
Antibiotici consigliati per il metodo della diffusione nella routine di laboratorio.

Cocchi Gram+	Bacilli Gram-
Ampicillina	Amikacina
Clindamicina	Ampicillina
Eritromicina	Fosfomicina
Fosfomicina	Gentamicina
Rifampicina	Rifampicina
Nitrofurantoina	Neomicina

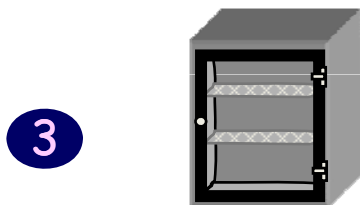
(3^a FASE 2^o parte)



Immergere un tampone sterile nella brodocoltura e seminare sulla superficie del terreno in maniera uniforme, ripetendo l'operazione più volte ruotando la piastra di 60°.

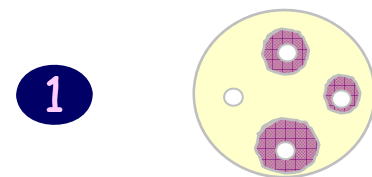


Entro 15' applicare sulla piastra seminata i dischi di antibiotici mediante pinze sterili (selezionare gli antibiotici in relazione al tipo di batteri). Assicurarsi che ci sia perfetta aderenza tra il disco e la superficie dell'agar premendo con la pinza sterile su ogni disco. Disporre i dischi ad una analoga distanza tra loro.



Incubare le piastre a 37° per 16-18 h.

(4^a FASE)



Misurare con un centimetro il diametro degli aloni di inibizione sul fondo della piastra posta sopra una superficie luminosa. Interpretare i risultati in base allo schema di lettura.

Riguardo alla misura del diametro dell'alone occorre fare alcune precisazioni:

- La presenza di colonie all'interno dell'alone di inibizione può indicare la presenza di varianti resistenti o che si è in presenza di una coltura mista.
- Con le specie di *Proteus* formanti patina deve essere misurato l'alone considerando il margine più esterno di crescita, infatti alcuni ceppi di *proteus* possono sciamare all'interno della zona di inibizione, non si deve tener conto di tale naturale fenomeno.

2

Antibiotico	Diametro alone di inibizione		
	Resistente	Moderat. sensibile	Sensibile
Acido nalidixico (NA)	<13	14-18	>19
Amikacina (AK)	<14	15-16	>14
Ampicillina (AM) (A10) (enterococchi, enterobatteri)	<11	12-13	>14
Ampicillina (AM) (A10) (stafilococchi)	<20	21-28	>29
Amoxicillina (Gram-) (AML)	<11	12-13	>14
Amixicillina (Gram+) (AML)	<20	21-28	>29
Eritromicina (E)	<13	14-17	>18
Fosfomicina (FFL)	<10	11-14	>15
Gentamicina (GM)	<12	-----	>13
Kanamicina (K)	<13	14-17	>18
Neomicina (N)	<12	13-16	>17
Penicillina G (P) (Stafilococchi)	<20	21-28	>29
Penicillina G (P) (Altri microrganismi)	<11	12-21	>22
Rifampicina (RD)	<11	12-18	>19

Microrganismo.....

disco	antibiotico	lettura (mm)	interpretazione S/R
1			
2			
3			
4			

