

**METODI PER DETERMINARE
L'EFFICACIA ANTIMICROBICA DI
UN PRINCIPIO ATTIVO (es.
antibiotici, estratti vegetali, oli
essenziali, ecc.**

METODI PER DETERMINARE LA SENSIBILITÀ DEI MICRORGANISMI AI FARMACI

1) METODI BASATI SULLA DILUIZIONE
DELL'ANTIBIOTICO (terreno liquido)



*determinazione della
Minima Concentrazione Inibente
(MIC)*

2) METODI BASATI SULLA DIFFUSIONE IN
AGAR (terreno solido)



Kirby-Bauer

CAMPIONE BIOLOGICO

SEMINA



IDENTIFICAZIONE MACROSCOPICA
PRESUNTIVA DELL' AGENTE ETIOLOGICO
E SUO ISOLAMENTO



Esame della purezza delle colonie



MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

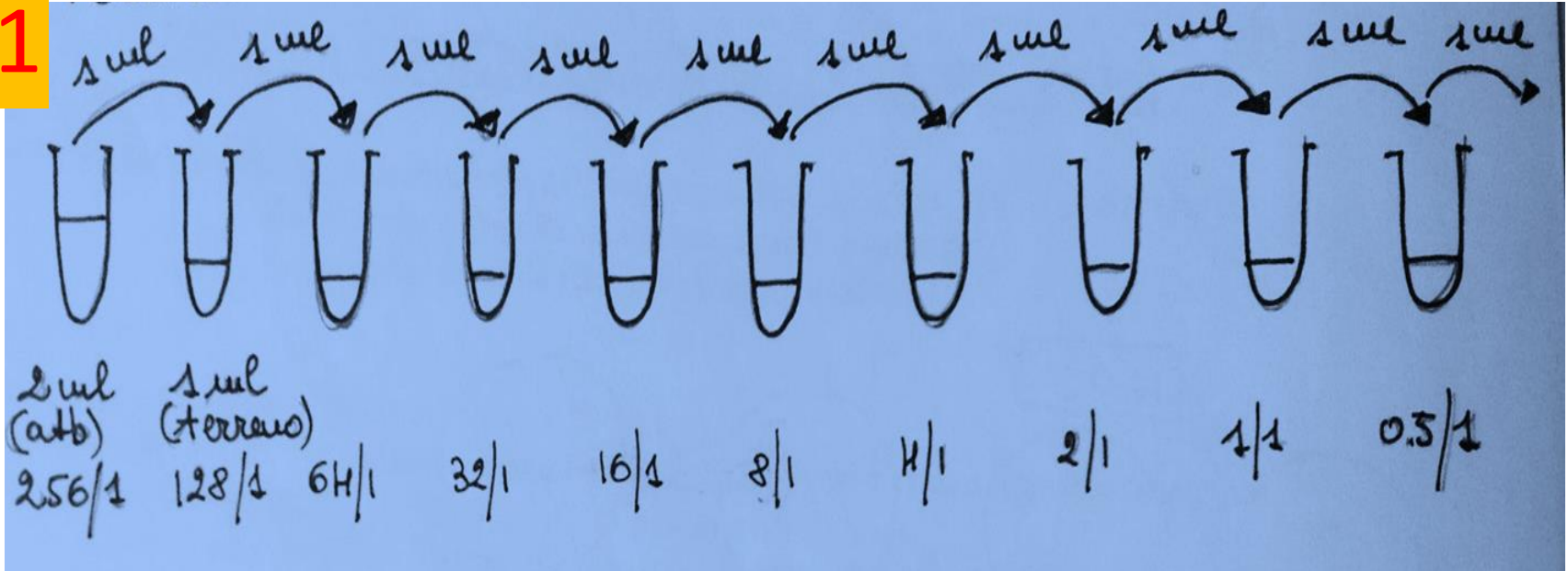
Tecnica delle diluizioni scalari

- La sensibilità del microrganismo viene valutata in base alla sua crescita o meno in un terreno di coltura con diverse concentrazioni di antibiotico.
- Pesare il farmaco (circa 20-30 mg)
- Aggiungere diluente (10 ml soluz fisiologica, NaOH) per sciogliere la polvere
- Aggiungere brodo colturale e diluire fino ad avere una concentrazione pari a 256 mcg/ml (soluzione madre)
- Parallelamente allestire una serie di provette (almeno 10) contenente ognuna, eccetto la prima, 1 ml di brodo colturale
- Nella 1 provetta aggiungere 2ml della soluzione madre di farmaco (256/1)

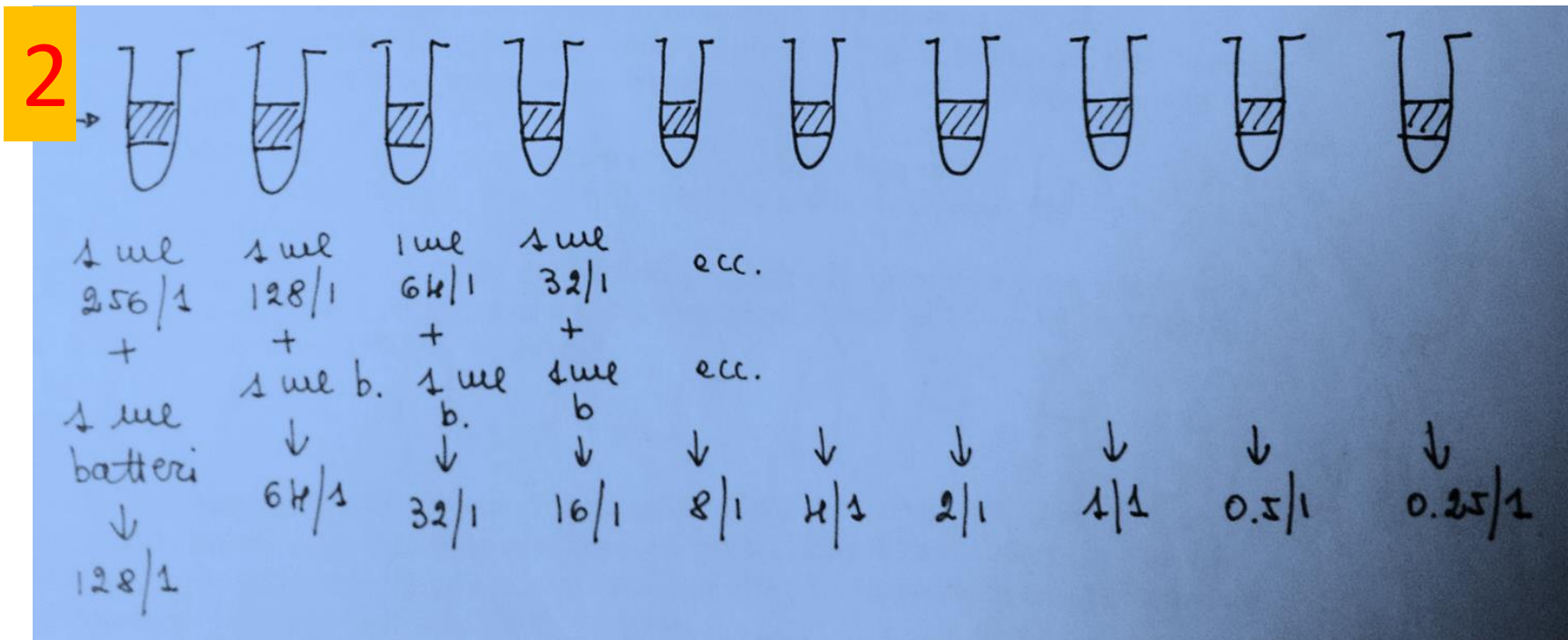
Tecnica delle diluizioni scalari

- Eseguire diluizioni scalari del farmaco (**diluizioni al «raddoppio»** perché in ogni provetta avremo metà concentrazione rispetto alla precedente o il doppio rispetto alla successiva).
- Prelevare 1 ml dalla 1° provetta e metterlo nella 2°, mescolare agitando; dalla 2° provetta prelevare 1 ml e metterlo nella 3° e così via fino all'ultima. Dall'ultima provetta si preleva 1 ml e lo si elimina [1]

1

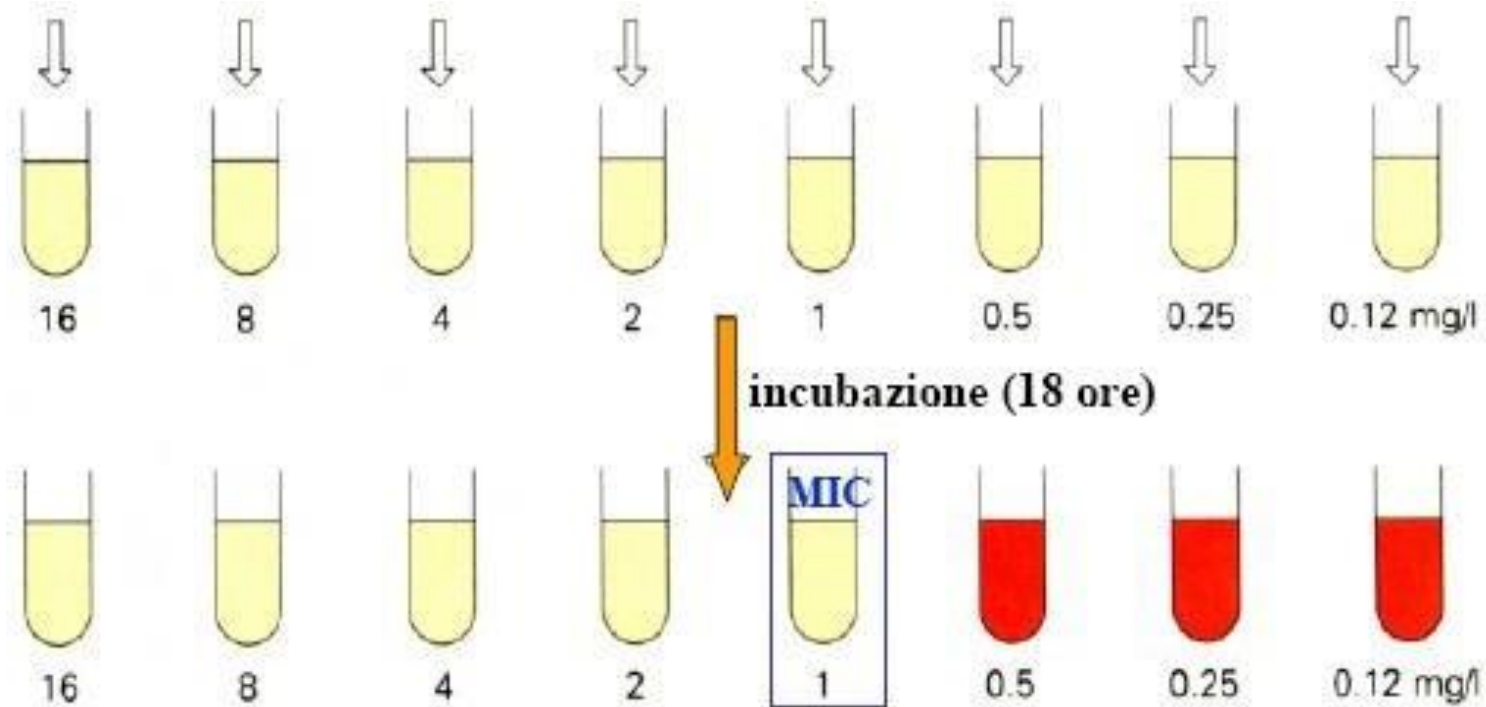


- Insemenzare ogni provetta con 1 ml della sospensione batterica in esame alla concentrazione standard di 10^5 batteri/ml (aggiungendo 1 ml di batteri il farmaco sarà ulteriormente diluito 1:1)[2]. Agitare

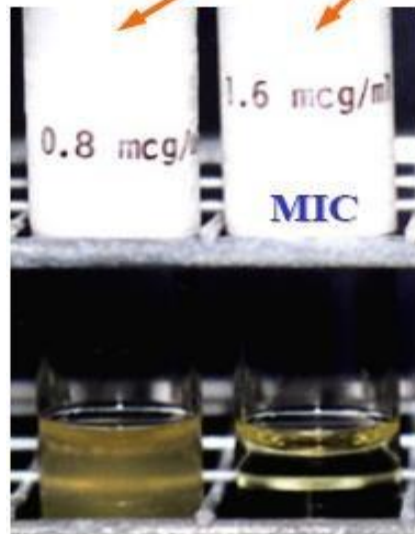
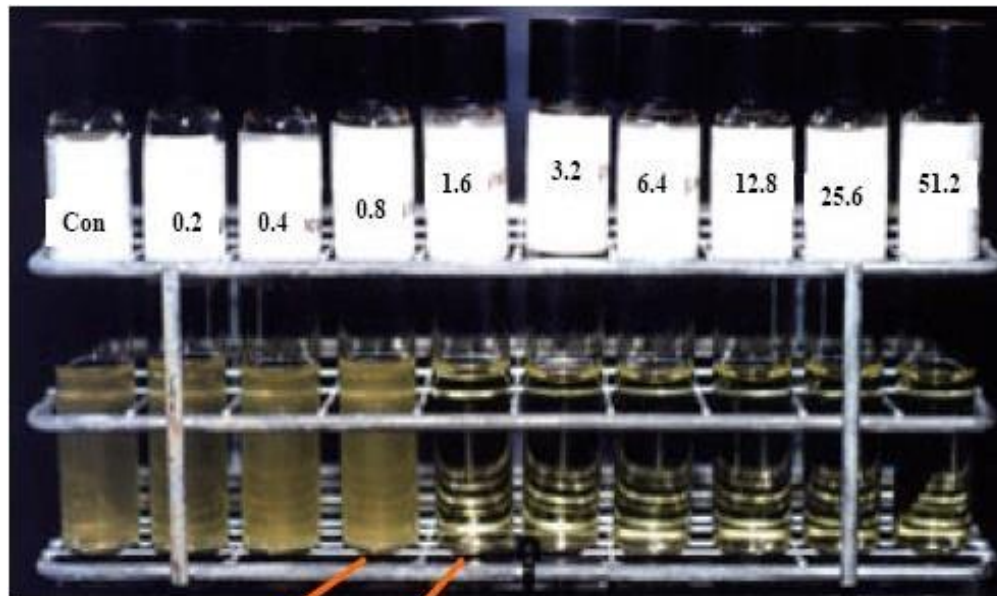


MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

- **Lettura. Le provette con concentrazione bassa di antibiotico sono torbide per avvenuta crescita batterica, quelle a concentrazione più elevata sono limpide**
- **La concentrazione più bassa di antibiotico che porta ad assenza di crescita visiva dopo 18-24 ore di incubazione è la MIC.**

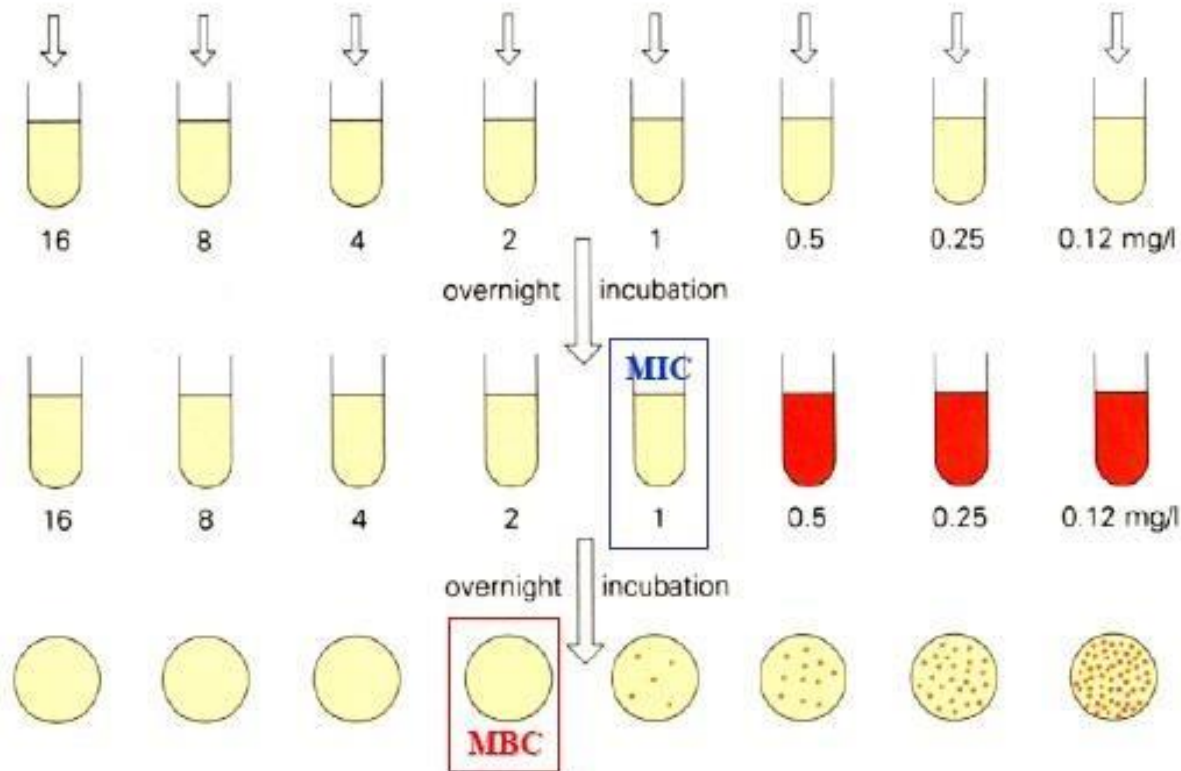


• Dopo 18 ore di incubazione, le provette vengono controllate per la presenza di una crescita batterica visibile (torbidità): l'assenza di torbidità visibile del terreno di coltura denota un'inibizione completa della crescita microbica.



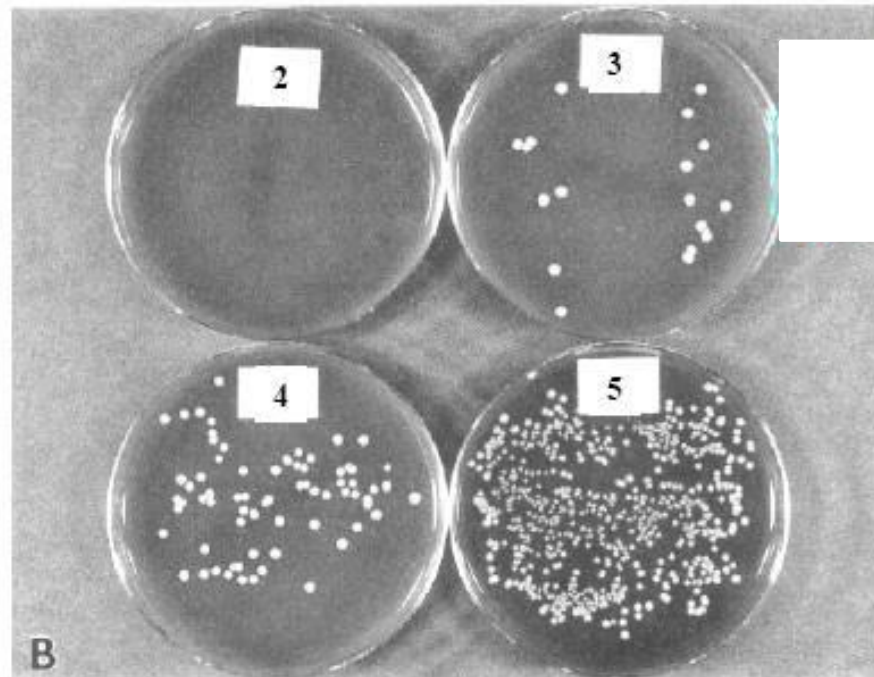
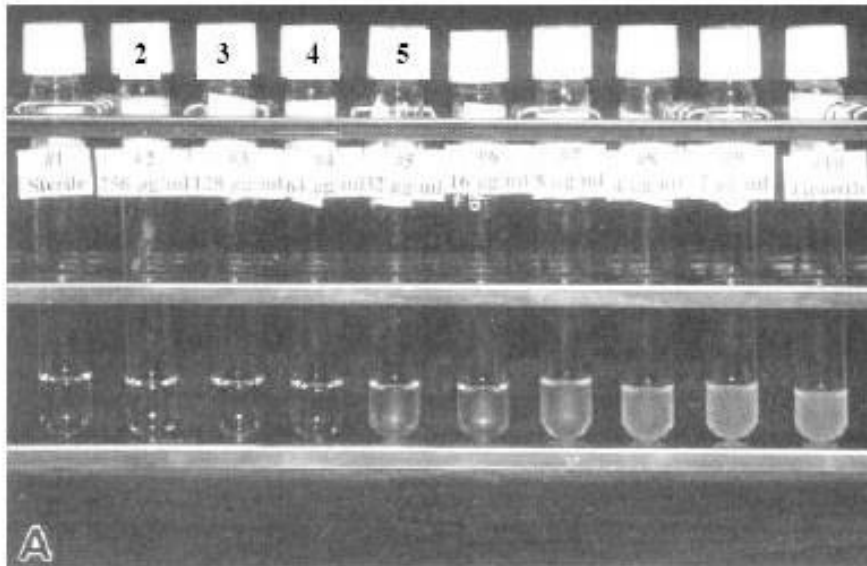
MIC (Minimum Inhibiting Concentration; minima concentrazione inibente) La concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per inibire la crescita di un dato organismo.

Saggio di MIC e MBC



MBC (Minimum Bactericidal Concentration; minima concentrazione battericida) La concentrazione più bassa del composto in esame necessaria per provocare la morte di più del 99.9% di un dato organismo.

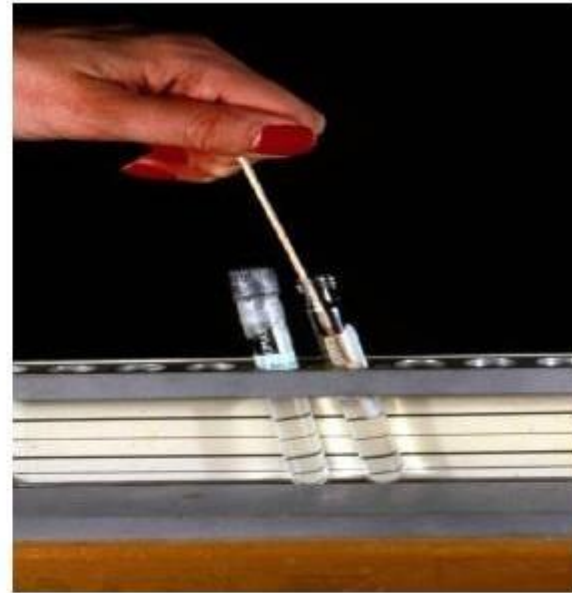
Concentrazione minima battericida (MBC)



TEST DI DISCO DIFFUSIONE SU AGAR



Selezione le colonie



Prepara l'inoculo

METODO DI KIRBY-BAUER

Test di sensibilità agli antibiotici

- Preparazione dell'inoculo
- Standard di McFarland (torbidità)

Standard 0,5 (99,5 ml di ac solforico 1%+ 0,5 ml di cloruro di bario 1,175%) ha una torbidità corrispondente a sospensione batterica $1,5 \times 10^8$ CFU/ml



Preparare la sospensione del batterio in esame confrontando la torbidità con quella di una sospensione standard (0.5 gradi della scala McFarland) che = 10^8 cellule/ml **INOCULO STANDARD**

Standardizza l'inoculo

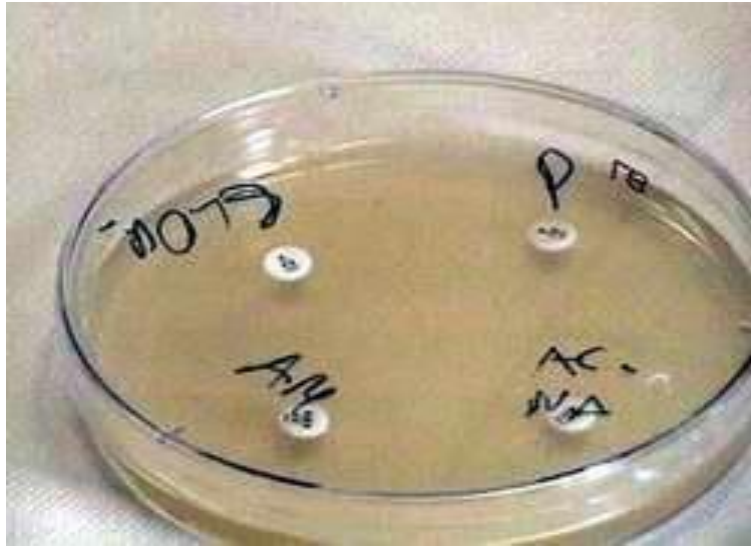
Terreno agarizzato = **Mueller Hinton agar**, terreno standard



Immergi il tampone

Striscia sulla piastra



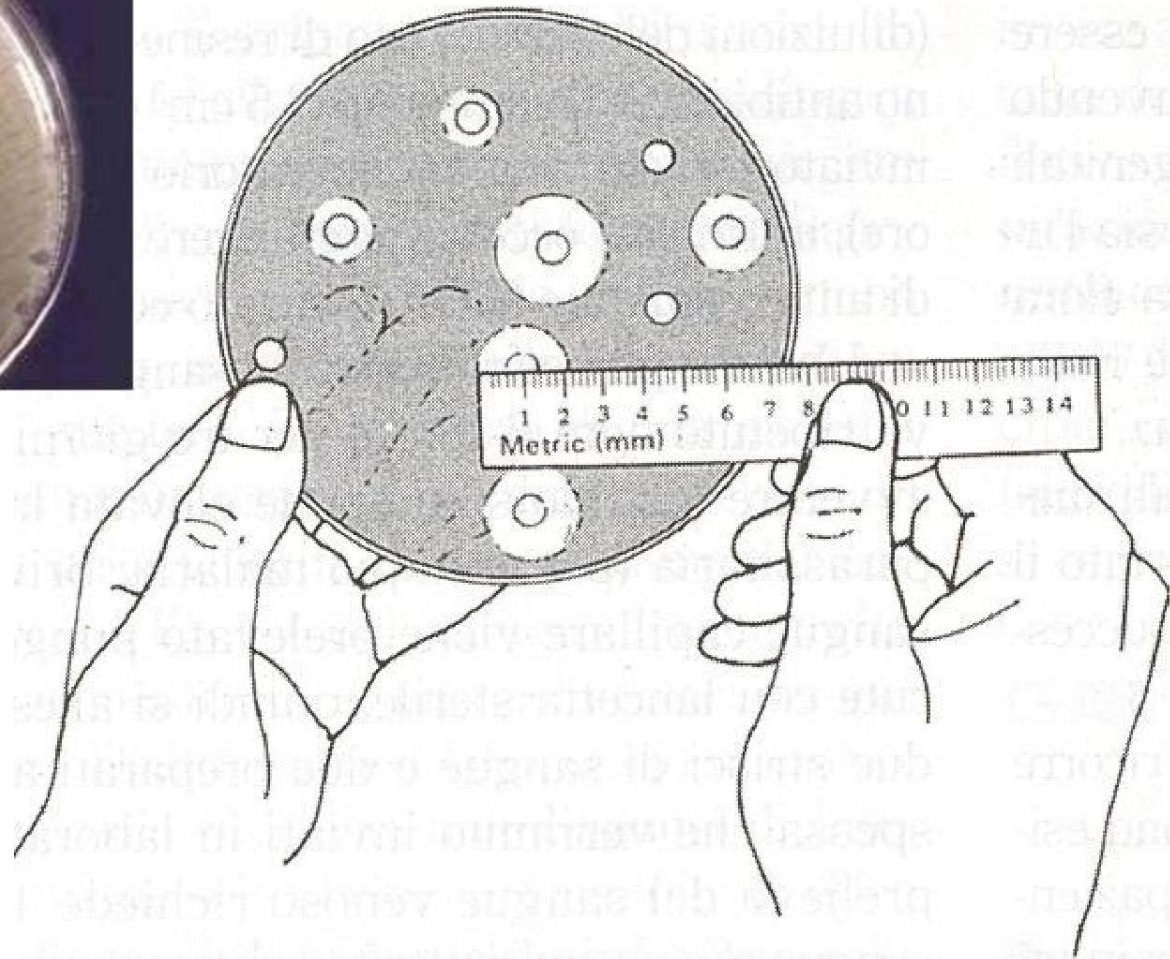
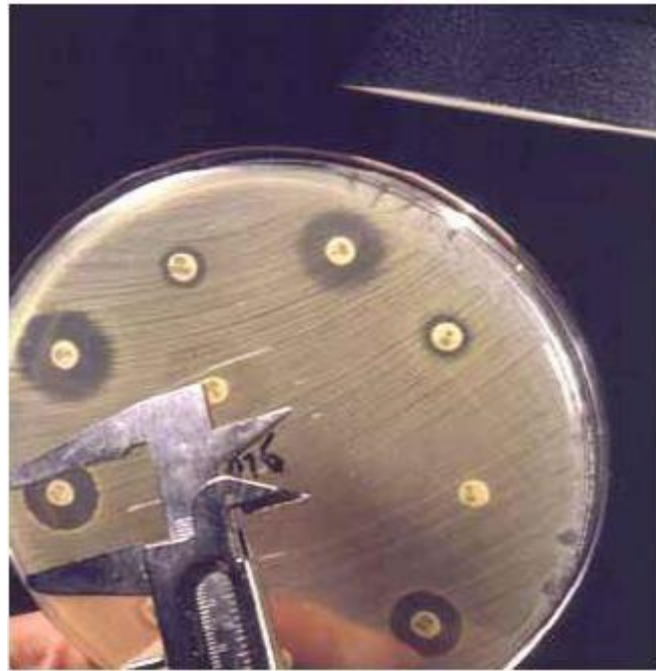


4. Filtri di carta a forma di disco (carta bibula -assorbente-) contenenti concentrazioni note di diversi agenti antimicrobici vengono posti sulla piastra.

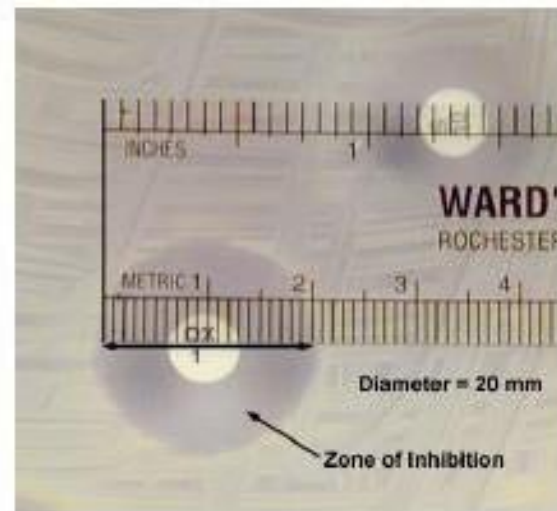


Incubazione in termostato a 35-37°C per 18-24h

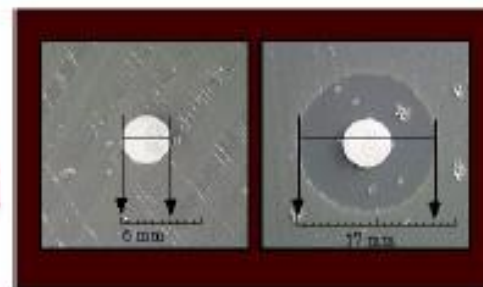
Misura gli aloni



Il diametro degli aloni di inibizione osservati sulla piastra viene misurato (in mm) ed i valori ottenuti paragonati a quelli standard per il ceppo batterico, in modo da stabilire se l'isolato è sensibile o meno ad un dato antibiotico (**Sensibile**, **Intermedio**, **Resistente**).

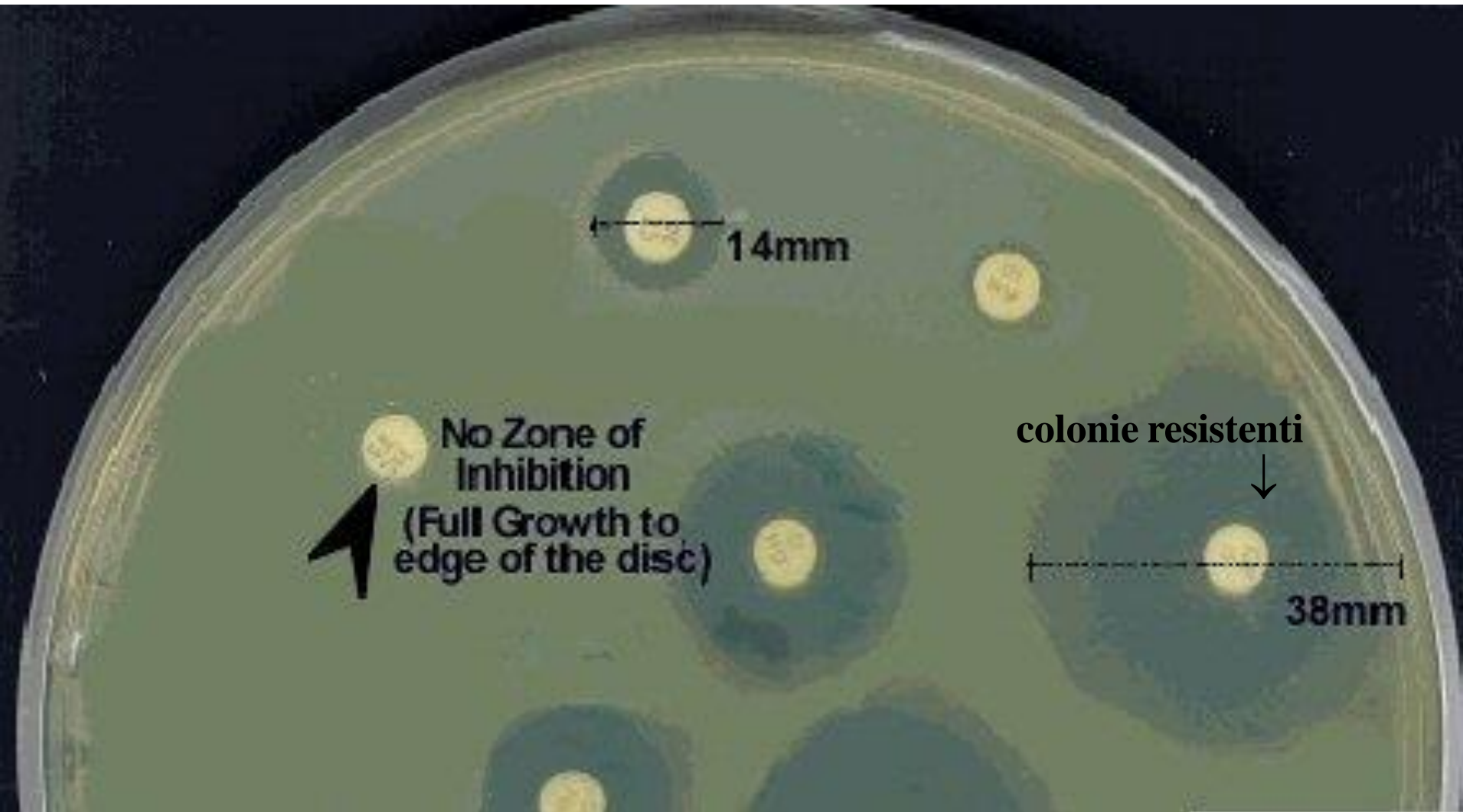


Il metodo di Kirby-Bauer: interpretazione dei risultati



ANTIMICROBIAL AGENT		R = mm or less	I = mm range	S = mm or more
carbenicillin	CB	17	18-22	23
cephalothin	CF	14	15-17	18
gentamycin	GM	12	13-14	15

Antibiogramma



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I valori standard di sensibilità variano per ciascun microrganismo e sono basati sulla concentrazione plasmatica di farmaco che può essere raggiunta senza la comparsa di effetti tossici. Questi consentono di classificare il microrganismo in:

- **“sensibile”**, quando l'antibiotico risulta efficace ai dosaggi comunemente raccomandati,
- **“intermedio”**, quando la crescita batterica è inibita solo al dosaggio massimo raccomandato,
- **“resistente”**, quando l'antibiotico dovrebbe essere utilizzato a dosaggi che risulterebbero tossici nell'organismo.