

## I test di sensibilità in vitro ai chemioantibiotici per i patogeni respiratori esigenti

A. Camporese

Unità di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica - Dipartimento di Medicina di Laboratorio  
Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

### I test di sensibilità in vitro per i microrganismi "esigenti"

Nell'ambito della diagnostica microbiologica sono definiti *esigenti* o *fastidiosi* quei microrganismi che, pur differendo per posizione tassonomica, sono accomunati dalla richiesta di peculiari condizioni di crescita che richiedono particolare abilità analitiche e interpretative soprattutto per quanto concerne l'esecuzione dei test di sensibilità agli antimicrobici, che tra l'altro non sempre possono essere eseguiti con i sistemi automatici (1,2).

Per di più questi batteri esprimono sempre nuove ed estese refrattarietà a diversi antibiotici che necessitano di essere valutate correttamente sia sotto il profilo clinico che epidemiologico.

Sull'argomento esistono numerose, quanto autorevoli pubblicazioni (1-4), ma lo scopo di questa breve rassegna consiste essenzialmente nell'affrontare, nel modo il più possibile sintetico sotto il profilo metodologico e clinico, il processo analitico e interpretativo per la valutazione della sensibilità ai chemioantibiotici di alcuni tra i microrganismi *esigenti* che sono anche tra i maggiori responsabili della patologia infettiva respiratoria: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*.

In microbiologia clinica uno dei principali obiettivi è fornire al medico curante nel più breve tempo possibile l'indicazione del farmaco più idoneo per risolvere una malattia da infezione (5).

Per quanto concerne alcuni microrganismi esigenti delle vie respiratorie, esistono delle difficoltà riferibili sia ai particolari meccanismi di resistenza che essi esprimono, sia al fatto che non tutti i laboratori sono sempre in grado di eseguire di routine tutti i test di sensibilità previsti per questi batteri (1).

Perciò, quando il microbiologo si trova ad affrontare questo capitolo diagnostico è necessario che abbia ben presente alcuni limiti analitici e maturi di conseguenza una precisa strategia comportamentale (1-4).

Innanzitutto, come si vedrà, per taluni microrganismi *esigenti* non esistono dei precisi standard di riferimento per l'esecuzione e l'interpretazione dei risultati (1,2), ragion per cui per valutare meglio i test di sensibilità di questi batteri è di assoluta utilità avere ben chiara soprattutto la propria situazione epidemiologia locale: *unicuique suum* è la regola che ciascun microbiologo clinico oggi deve anteporre a qualsiasi altra considerazione in merito all'interpretazione dei test di sensibilità ai chemioantibiotici, in quanto è ormai chiaro a tutti che la situazione loco-regionale delle resistenze, per le sue sfumature multifattoriali, può variare in modo davvero significativo anche a distanza di poche decine di chilometri (6).

Nella patologia sostenuta dai microrganismi *esigenti* delle vie respiratorie è d'altro canto assodato che la terapia empirica (basata sull'esperienza...) con i farmaci considerati di prima scelta costituisce ormai spesso la prassi, anche perché talora le malattie da infezione sostenute da questi batteri rispondono piuttosto bene a questi antibiotici. L'approccio alle infezioni respiratorie comunitarie è un esempio di come sia ormai diffusa l'attitudine di anteporre la terapia ragionata all'esecuzione dell'esame colturale e dell'antibiogramma (6-9).

Il consolidarsi di tale prassi potrebbe indurre in questo e in altri casi a ritenere l'esame microbiologico superfluo. Si tratta invece di mediare tra la necessità di ottenere quanti più dati possibili per elaborare un'epidemiologia in grado di orientare la scelta terapeutica del medico curante e la consapevolezza delle oggettive, concrete difficoltà nell'ottenere un corretto campionamento per la diagnosi delle infezioni polmonari.

Spetta perciò al microbiologo clinico compiere uno sforzo concreto rivolto a far comprendere l'importanza di eseguire quando possibile i controlli microbiologici, soprattutto allorchè si tratti di infezioni delle basse vie respiratorie o quando la terapia empirica abbia fallito (5,8,10).

### STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: INTERPRETAZIONE DEI TEST

- Sono considerati resistenti i ceppi con MIC superiore o uguale a 0.12 µg/ml
- Tra questi, quelli con MIC tra 0.12 e 1.0 sono da considerarsi intermedi, mentre quelli con MIC >2 sono ceppi ad alta resistenza
- I ceppi penicillina R sono R anche agli altri β lattamici
- I ceppi penicillina R sono spesso multi-resistenti (tetraciclina, cloramfenicolo, eritromicina)
- Per eritromicina è stato dimostrato anche un efflusso attivo, simile a quello descritto per *Streptococcus pyogenes* (fenotipo M)
- Sui campioni sistemici eseguire sempre la MIC per penicillina e cefalosporine: se Intermedie, vanno refertate R
- Eseguire sempre la MIC anche nelle polmoniti: i ceppi con bassa resistenza a penicillina vanno comunque sempre trattati alla dose massima di β lattamico

### HAEMOPHILUS INFLUENZAE: INTERPRETAZIONE DEI TEST (1)

- Si può usare in generale il test del nitrocefina come screening, in quanto i ceppi BLNAR sono poco frequenti: se β lattamasi negativi refertare ampi S
- Ceppi BLNAR non producono β lattamasi ma sono ampicillina R, con ridotta attività per cefalosporine di seconda generazione e amoxicillina/clavulanato dovuta ad alterazione delle PBP o ridotta permeabilità: testare ampicillina e considerare R tutte le penicilline protette e cefalosporine (secondo NCCLS)

### HAEMOPHILUS INFLUENZAE: INTERPRETAZIONE DEI TEST (2)

- Se β lattamasi + si considerano ampicillina e amoxicillina R anche se S in vitro, mentre amoxicillina/clavulanato supera la resistenza
- In questo caso è però condizionata anche la sensibilità a cefalosporine di seconda generazione (sono poco stabili alle β lattamasi dell'emofilo), SXT (in aumento la R !!), tetraciclina, cloramfenicolo e macrolidi (questi ultimi non sono comunque di prima scelta)
- Segnalati anche rari ceppi BLPACR β lattamasi + con amoxicillina/clavulanato R
- Occasionale produzione di cloramfenicolo-acetiltransferasi con R anche a SXT e rifampicina
- Bassa resistenza ai fluorochinoloni

### MORAXELLA CATARRHALIS: INTERPRETAZIONE DEI TEST

- Praticamente tutti i ceppi vanno considerati potenzialmente produttori di β lattamasi (BRO-1 e BRO-2) e pertanto refrattari ai β lattamici β lattamasi sensibili.
- Si può usare in generale il test del nitrocefina come screening. Se β lattamasi negativi refertare ampicillina S
- L'enzima BRO-1 esprime una resistenza più tenace di BRO-2 e sembra il responsabile della R dei β lattamasi + con ampi R, mentre BRO-2 determina la R dei β lattamasi + con ampi S.
- I ceppi β lattamasi + si considerano penicillina, ampicillina e amoxicillina R anche se S in vitro, mentre amoxicillina/clavulanato supera la resistenza
- Nei ceppi β lattamasi + viene relativamente condizionata anche la sensibilità alle cefalosporine di seconda generazione, SXT e macrolidi (che non sono di prima scelta)
- Non ci sono particolari problemi per i fluorochinoloni

Ma al microbiologo spetta anche l'analisi continua e attenta della propria realtà epidemiologica e la diffusione e discussione dei dati statistici locali con i clinici, in modo tale da poter indirizzare in modo "razionalmente ragionato" la scelta del farmaco più idoneo in base al sospetto di malattia (5,10).

Per quanto concerne le metodologie analitiche a disposizione nella valutazione della sensibilità di *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, purtroppo alcuni tra i test più attendibili, quali ad esempio l'E-test e la diluizione in brodo, non sono sempre alla portata di tutti i laboratori per motivi innanzitutto di costi, ma anche per la scarsa diffusione di strumentazioni analitiche automatizzate dedicate e talvolta per la carenza di personale che abbia maturato l'esperienza necessaria al loro utilizzo routinario (1-3).

Qualunque sia il metodo adottato, i risultati devono comunque essere interpretati con grande precauzione. A questo proposito, valga sempre la regola per la quale è necessario mantenere uno stretto contatto tra il microbiologo e il curante per valutare congiuntamente il sospetto diagnostico e di conseguenza discutere anche l'opportunità di eseguire effettivamente un antibiogramma su un microrganismo "difficile", rappresentando altresì ai colleghi tutte le eventuali limitazioni metodologiche e di risultato. In generale non si può però sostenere a priori che un metodo non standardizzato non possa fornire ugualmente indicazioni cliniche, se eseguito con accuratezza: semplicemente esso andrà validato con le dovute cautele, verificandone criticamente e in coscienza il risultato ottenuto (1,3).

Sull'opportunità di inserire, se necessario anche per *default*, commenti clinici al referto analitico o note che sottolineino che si tratta comunque di procedure non standardizzate, si discute da molto a tutti i livelli senza trovare una opinione comune.

Personalmente, se sono in generale favorevole a inserire nei referti elementi che meglio sottolineano alcuni aspetti analitici che di primo acchito possono sfuggire al clinico, come ad esempio la presenza di un ceppo di stafilococco meticillino-resistente o l'isolamento di enterobatteri produttori di beta lattamasi a spettro esteso, sono di principio contrario ad "appesantire" il referto microbiologico con altri commenti analitici che sono di competenza di chi esegue e valida il test eseguito.

In ultima analisi, prima di affrontare nei particolari l'argomento, non si dimentichi l'importanza dell'esecuzione costante dei controlli di qualità che, come si vedrà, consentono di evidenziare sia eventuali problemi legati alle caratteristiche intrinseche del terreno, sia di valutare secondo le indicazioni dell'NCCLS la precisione e l'accuratezza dei test di sensibilità (1,2).

### *Streptococcus pneumoniae*: scelta dei test di sensibilità

La resistenza di *Streptococcus pneumoniae* alla pe-

nicillina dipende, com'è noto, da un'alterazione delle PBP: in particolare, la modifica della PBP2b determina un'elevata resistenza alla penicillina, mentre le alterazioni della PBP1a e 2x conferiscono resistenza alle cefalosporine di terza generazione (1,2,6,11).

Da un punto di vista epidemiologico, la refrattarietà alla penicillina di *Streptococcus pneumoniae* in Italia è relativamente bassa, se si escludono segnalazioni legate a sporadici episodi di incremento dovuti alla circolazione di ceppi particolarmente resistenti (6,12,13).

Per quanto concerne la valutazione della sensibilità ai chemioantibiotici, NCCLS prevede sia l'uso del metodo in agar-diffusione che quello della microdiluzione in brodo (14).

Il test in agar-diffusione, che utilizza MHA con il 5% di sangue di montone e un'incubazione con atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, non sempre è in grado di garantire in prima istanza l'interpretazione di un'eventuale ridotta sensibilità ai beta lattamici.

In questo caso, comunque, per la valutazione della sensibilità alla penicillina, NCCLS prescrive l'utilizzo di un disco di oxacillina da 1 microgrammo: con questo metodo, tutti i ceppi di *Streptococcus pneumoniae* che presentino intorno al disco di oxacillina un alone di inibizione >19 mm. di diametro sono da considerare sicuramente sensibili ai beta lattamici.

Se l'alone, invece, risulta <19 mm non è possibile definire a priori l'attività di penicillina, perché in questo caso potrebbe trattarsi di un ceppo ancora sensibile oppure resistente.

Questo risultato, perciò, rende necessario procedere all'esecuzione della MIC per verificare il vero livello di resistenza (1,2,3).

L'utilizzo in prima istanza dell'agar diffusione è comunque buona norma, secondo la nostra esperienza, per dirimere tutti gli isolati sensibili alla penicillina consentendo al tempo stesso di ottenere buoni risultati per quanto riguarda le altre molecole da testare, anche se esiste la tendenza a sovrastimare la resistenza al cotrimossazolo.

NCCLS raccomanda comunque (14), almeno per i campioni sistemici, di far seguire sempre all'esecuzione del test di agar-diffusione anche l'approfondimento con un test di microdiluzione. Questo test, che per NCCLS rimane di riferimento per la valutazione della sensibilità ai beta lattamici, può essere eseguito anche in automazione utilizzando terreno CAMHB con sangue lisato di cavallo e permette di ottenere subito la MIC oltre che della penicillina anche di altri beta lattamici, quali le cefalosporine.

Per ottenere la MIC dei beta lattamici si può utilizzare in alternativa, se si ha buona pratica, anche l'E-test, pur se si tratta di un'analisi non automatizzabile e se i valori di MIC riscontrati risultano sempre lievemente inferiori alla microdiluzione (1,2,15,16).

Per il controllo di qualità, si consiglia di usare il ceppo di controllo ATCC 49619.

### ***Streptococcus pneumoniae*: interpretazione dei test**

Come si è detto, il test di agar-diffusione, mentre è risolutivo nel discriminare i ceppi sicuramente sensibili ai beta lattamici (alone intorno al disco di oxacillina > 19 mm.), fornisce un'indicazione solo presuntiva di resistenza alla penicillina quando l'alone risulti invece < 19 mm.

In questi casi, solo l'esecuzione della MIC mediante microdiluzione in brodo o l'E-test consentono di rilevare l'effettiva presenza di una resistenza ai beta lattamici (1,2).

Sono, infatti, da considerare resistenti solo i ceppi con MIC superiore o uguale a 0.12 µg/ml: tra questi, quelli con MIC comprese tra 0.12 e 1.0 µg/ml sono da considerarsi intermedi o a bassa resistenza (la maggior parte in Italia), mentre quelli con MIC superiori o uguali a 2 µg/ml sono ritenuti ad elevata resistenza (14).

Quando si metta in evidenza una resistenza alla penicillina, ovviamente anche tutti gli altri beta lattamici dovranno essere considerati terapeutamente inefficaci.

Purtroppo, quando *Streptococcus pneumoniae* presenta la refrattarietà ai beta lattamici, spesso esprime anche resistenza nei confronti di altri antibiotici, quali tetraciclina, cloramfenicolo ed eritromicina. Per i macrolidi, che comunque non sono considerati farmaci di prima scelta per questo microrganismo, esiste tra l'altro anche un meccanismo di pompa ad efflusso attivo, analogo a quello descritto per il fenotipo M di *Streptococcus pyogenes* (2,17,18).

Come si è detto precedentemente, è assolutamente razionale e comunque previsto dall'NCCLS, eseguire sempre la MIC per la penicillina e le cefalosporine ad ampio spettro su tutti i campioni sistemici (es.: sangue, liquor): in questi casi, un risultato intermedio andrà sempre refertato come resistente (14).

Secondo la nostra esperienza, la valutazione della MIC andrebbe estesa anche ai ceppi isolati da infezioni delle basse vie respiratorie, e comunque nelle polmoniti da cui sia stato isolato un ceppo di *Streptococcus pneumoniae* intermedio alla penicillina i beta lattamici andranno sempre utilizzati alla massima dose terapeutica (1,6).

### ***Haemophilus influenzae*: scelta dei test di sensibilità**

*Haemophilus influenzae*, e in particolare il sierotipo B, ha sviluppato un meccanismo di resistenza legato alla produzione di beta lattamasi (soprattutto TEM-1, meno frequentemente BRO-1).

Nel triveneto, come d'altro canto nel resto del Paese, si è registrato da tre anni a questa parte un netto incremento di isolamenti di ceppi beta lattamasi produttori (da 0% a circa 15%).

Proprio perché il principale meccanismo di resistenza consiste nella produzione di beta lattamasi (1,2,6,19,20,21), si consiglia di eseguire sempre sugli isolati il test rapido di idrolisi della cefalosporina cromogena nitrocefina: il saggio è facilmente realizzabile stemperando alcune colonie sul dischetto di nitrocefina e attendendo l'eventuale viraggio del colore al rosso (1,2).

Per quanto riguarda i test di sensibilità in vitro, il metodo oggi più usato nei laboratori di microbiologia è l'agar diffusione su terreno HTM (*Haemophilus Test Medium*), in quanto gli emofili non crescono sul comune terreno MHA (Mueller Hinton Agar), con un'incubazione in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> (1,2,3,4).

Per l'esecuzione del test si procede a una sospensione diretta delle colonie partendo da una coltura ottenuta su agar cioccolato dopo 20-24 ore di incubazione, con un indice di torbidità allo standard 0.5 di McFarland.

Il saggio è molto influenzato dall'effetto inoculo: inoculi alti possono infatti aumentare le MIC dei beta lattamici soprattutto nei ceppi produttori di beta lattamasi (22,23).

Il terreno HTM, che permette di ottenere un test stabile e riproducibile è, come noto, di consistenza trasparente, e questo può rendere più complessa la lettura degli aloni di inibizione: i criteri interpretativi dei diametri si esegue seguendo quanto previsto da NCCLS (14).

Il ceppo di controllo di crescita ATCC 10211 è vivamente raccomandato per il controllo di crescita su HTM, mentre per controllare la precisione e l'accuratezza del test di sensibilità in vitro, NCCLS raccomanda l'utilizzo dei ceppi ATCC 49247 e ATCC 49766 (1,2,14).

In alternativa al metodo di Bauer & Kirby in HTM, si può eseguire l'E-test, sempre utilizzando l'agar HTM: il metodo è relativamente semplice e riproducibile ma piuttosto costoso (15).

In ultima analisi si può considerare l'eventualità di eseguire un test di diluizione in brodo HTM, senza atmosfera addizionata di CO<sub>2</sub>, secondo le regole NCCLS, anche con l'eventuale ausilio di uno strumento automatico: in questo caso, però, si ricordi che l'effetto inoculo è molto più pronunciato rispetto a quanto descritto per il test in agar (22,23).

### ***Haemophilus influenzae*: interpretazione dei test**

Come si è detto, il più importante meccanismo di resistenza di *Haemophilus influenzae* consiste nella produzione di beta lattamasi: per questo la maggior parte dei ceppi possono essere testati in prima istanza anche solo con il test rapido di idrolisi della cefalosporina cromogena nitrocefina.

In questo caso, si considera acquisito che se il microrganismo non produce beta lattamasi (test negati-

vo) è sensibile anche a penicillina, ampicillina e amoxicillina.

Se, viceversa, il ceppo produce beta lattamasi (test positivo), dovrà essere refertata una resistenza ai tre precedenti beta lattamici anche se l'agar diffusione dovesse evidenziare una sensibilità.

In questo caso, amoxicillina/clavulanato è comunque in grado di superare la resistenza, anche se sono stati segnalati (20,21) rari ceppi produttori di beta lattamasi resistenti anche alle penicilline protette dall'inibitore delle beta lattamasi (ceppi BLPACR).

Se si è in presenza di ceppi beta lattamasi produttori, può essere condizionata anche la sensibilità alle cefalosporine di seconda generazione (peraltro relativamente stabili alle beta lattamasi dell'emofilo), oltre a cotrimossazolo, tetraciclina, cloramfenicolo e macrolidi (1,2).

L'agar diffusione risulta comunque utile per mettere in evidenza quei ceppi di emofilo che non producono beta lattamasi, ma che possono risultare comunque resistenti ad ampicillina (ceppi BLNAR) in quanto presentano alterazioni delle PBP o una ridotta permeabilità ai beta lattamici (1,2,14).

Questi microrganismi presentano anche una contemporanea riduzione di attività per le cefalosporine di seconda generazione e per le penicilline protette: in questi casi NCCLS raccomanda addirittura di refertare comunque questi antibiotici come resistenti (14).

C'è infine da sottolineare che, se per eritromicina non esistono breakpoint interpretativi (14), sussiste comunque ancora una buona sensibilità per azitromicina e claritromicina, mentre è ancora bassa la resistenza ai fluorochinoloni ed è in aumento invece la resistenza al cotrimossazolo.

E' stata inoltre evidenziata una occasionale resistenza al cloramfenicolo da produzione di enzima cloramfenicolo-acetiltransferasi, talora associata a refrattarietà a tetracicline, cotrimossazolo e rifampicina (24).

### ***Moraxella catarrhalis*: scelta dei test di sensibilità**

Allo stato attuale, praticamente tutti i ceppi di *Moraxella catarrhalis* isolati sono da considerare potenzialmente produttori di beta lattamasi (BRO-1 e BRO-2) e come tali refrattari ai beta lattamici sensibili all'azione di questi enzimi (1,2,25).

L'enzima BRO-1 determina l'espressione di una resistenza più tenace di BRO-2: mentre il primo meccanismo sembra essere responsabile della resistenza dei ceppi produttori di beta lattamasi con la contemporanea resistenza all'ampicillina, il secondo sembra correlato alla refrattarietà dei ceppi produttori di beta lattamasi con il mantenimento della sensibilità all'ampicillina (1,2).

Proprio perché il fondamentale meccanismo di resistenza consiste nella produzione di beta lattama-

si, è consigliabile eseguire sempre sugli isolati il test rapido di idrolisi della cefalosporina cromogena nitrocefina, che tra l'altro viene previsto dall'NCCLS come unica valutazione di sensibilità per *Moraxella catarrhalis*. Il test è inserito tra l'altro in alcune confezioni analitiche commerciali usate per l'identificazione di questo microrganismo.

Non essendo stati definiti degli standard internazionali per gli altri test di sensibilità in vitro, essi vanno eventualmente eseguiti con tutte le precauzioni interpretative del caso e comunque mediante diffusione in MHA o diluizione in brodo MHB con cationi e supplementi (1,2,3,4,14) e un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

I break-point sono quelli riferiti in genere ai "nonfastidious organisms" di NCCLS.

**Tabella I:** Gli antibiotici da testare secondo l'ordine di priorità sui ceppi di *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*.

---

***Streptococcus pneumoniae*:**

1 - Test indispensabili:

oxacillina, penicillina, eritromicina, cotrimossazolo

2 - Test di seconda istanza:

tetraciclina, cefotaxime, ceftriaxone, cefepime, levofloxacina

3 - Eventuali test di terza istanza:

cloramfenicolo, rifampicina, moxifloxacina, vancomicina

***Haemophilus influenzae*:**

1 - Test indispensabili:

nitrocefina, ampicillina

2 - Test di seconda istanza:

cloramfenicolo, amoxicillina, amoxicillina/clavulanato, cefaclor, cefuroxime, ceftriaxone, ciprofloxacina

3 - Eventuali test di terza istanza:

levofloxacina, tetraciclina

***Moraxella catarrhalis*:**

1 - Test indispensabili:

nitrocefina

2 - Test di seconda istanza:

ampicillina, amoxicillina, amoxi/clavulanato, cefaclor, cefuroxime, cotrimossazolo

3 - Eventuali test di terza istanza:

levofloxacina, eritromicina, cloramfenicolo, tetraciclina

---

***Moraxella catarrhalis*: interpretazione dei test**

Come si è detto, la maggior parte dei ceppi di *Moraxella* possono essere testati solo con il nitrocefina, che è sufficiente per valutare l'espressione della resistenza mediata dalla produzione di beta lattamasi (14).

Da un punto di vista interpretativo, quando si isola un ceppo di *Moraxella catarrhalis* produttore di beta

lattamasi sarà necessario considerare resistenti penicillina, ampicillina e amoxicillina anche se dovessero evidenziarsi delle sensibilità nei successivi test in vitro, mentre amoxicillina/clavulanato è in grado di superare la resistenza e rappresenta comunque il farmaco di prima scelta.

Come si è detto, c'è una differenza tra i ceppi che esprimono beta lattamasi BRO-1 e BRO-2:

infatti, i ceppi BRO-1 sono sempre resistenti all'ampicillina, mentre i ceppi BRO-2 sono da considerarsi sensibili all'ampicillina.

Nella *Moraxella* che produce beta lattamasi è relativamente condizionata anche la sensibilità alle cefalosporine di seconda generazione, al cotrimossazolo e ai macrolidi, anche se questi ultimi non sono da considerarsi come antibiotici di prima scelta (1,2,6). Non sono evidenziati, invece, particolari problemi per quanto riguarda i fluorochinoloni.

**Antibiotici da testare e razionale terapeutico**

Una volta validati i sistemi di rilevazione della sensibilità ai chemioantibiotici per *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, in base alle potenzialità analitiche del proprio laboratorio e alle esigenze cliniche di ciascuna realtà operativa, è importante valutare quale sia il razionale nella scelta delle molecole da testare in base all'utilizzo terapeutico.

Come risulta evidente da quanto esposto, secondo NCCLS il test di riferimento per l'esecuzione dell'antibiogramma su questi tre ceppi *esigenti* consiste nella diluizione in brodo: per chi intenda evitare di eseguire una MIC in micropiastre, oggi esiste anche un metodo commerciale automatizzato che consente di ottenere un test di diluizione nei diversi brodi di coltura richiesti.

Nella Tabella I sono riportati i farmaci da testare con un ordine di priorità: nella prima categoria sono indicati gli antibiotici che, per i motivi che ho già avuto modo di esporre, devono comunque essere analizzati in quanto consentono di rilevare i meccanismi più frequenti di resistenza dei tre microrganismi considerati.

In seconda e terza istanza possono poi essere valutati anche altri antimicrobici, in base alle esigenze cliniche delle realtà in cui si opera e in relazione a quanto desunto dall'epidemiologia locale.

Indipendentemente da ciascuna singola realtà esiste comunque, come è evidente dalla Tabella I, una priorità in alcuni casi assoluta nella scelta almeno delle molecole fondamentali da testare.

Per quel che concerne, ad esempio, *Streptococcus pneumoniae* è inizialmente sufficiente analizzare la sensibilità a beta lattamici, macrolidi ed eventualmente al cotrimossazolo. Da un punto di vista strettamente clinico, si ricordi che amoxicillina con o senza l'inibitore della beta lattamasi mantiene in vi-

vo una buona attività a dosi piene fino a valori di MIC comprese tra 1 e 2.

Come ulteriore integrazione, possono poi essere inseriti altri antibiotici che poi possono essere o meno refertati in base alla malattia da infezione, ma che a scopo epidemiologico assumono una discreta importanza, quali ad esempio tetraciclina, vancomicina, cloramfenicolo e fluorochinoloni.

Per quanto riguarda le cefalosporine, NCCLS non definisce standard mediante diffusione in agar (14): come si è già detto, nei campioni sistemici e in quelli provenienti da infezioni delle basse vie respiratorie andrà prevista la valutazione della MIC mediante diluizione in brodo.

Nel caso di *Haemophilus influenzae* il test di prima istanza assolutamente necessario consiste nell'analisi dell'eventuale produzione di beta lattamasi mediante la cefalosporina cromogena nitrocefina: nel caso di positività, si dovrà interpretare una resistenza a penicillina, amoxicillina e ampicillina, mentre rimane di solito attiva l'amoxicillina associata all'inibitore delle beta lattamasi, se si escludono i rari ceppi BLPACR già descritti (20,21).

L'ampicillina va comunque sempre testata, indipendentemente dal test del nitrocefina, per mettere in evidenza eventuali ceppi BLNAR: nei rari casi di questo tipo di resistenza già descritto in precedenza anche i beta lattamici protetti e le cefalosporine di seconda generazione andranno sempre considerate resistenti (1,2).

Altri eventuali antibiotici oltre a quelli già descritti e al cloramfenicolo vanno inseriti in antibiogramma prevalentemente a scopo di sorveglianza epidemiologica piuttosto che per uso strettamente clinico.

Come si è detto, non esistono invece test di riferimento per *Moraxella catarrhalis* (1,2,14), per cui l'unica analisi che andrà necessariamente eseguita consiste nel test del nitrocefina per confermare la tendenza ormai diffusa di questi ceppi alla produzione di beta lattamasi (14), a sua volta espressione di refrattarietà anche per penicillina, amoxicillina e ampicillina.

Come è evidente, la scelta dei farmaci da testare in vitro deve sempre seguire una precisa strategia per rendere veramente valido il referto in base sia alle esigenze del clinico che alle proprie potenzialità analitiche.

Le indagini eseguite devono comunque seguire quanto previsto dagli standard internazionali, mentre i risultati dovranno essere sempre validati in base alla realtà epidemiologica nella quale ciascuno si trova ad operare.

Con queste premesse, la figura del microbiologo clinico assume oggi, analogamente a quanto avviene da anni nei paesi anglosassoni, un ruolo che non può più essere considerato solo quello di semplice esecutore delle richieste analitiche provenienti dal medico curante ma piuttosto quello di un professionista in grado di fornire un imprescindibile e concre-

to indirizzo terapeutico al clinico sia in ambiente ospedaliero che sul territorio (5,10), in base alla consapevolezza della qualità analitica del proprio laboratorio e ai dati epidemiologici in suo possesso.

## Bibliografia

1. Janet A, Swenson H & JM. Susceptibility testing of fastidious bacteria. In: Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 1999. p1544-1554.
2. Fontana R, Cornaglia G. L'antibiogramma. Padova: Piccin Nuova Libreria Press; 2000.
3. Shanson DC. Laboratory control of antimicrobial therapy. In: O' Grady F, Lambert HP, Finch R, Greenwood D., eds. Antibiotic and Chemotherapy. London: Churchill Livingstone press; 1997. p136-143
4. Acar JF, Goldstein FW. Disk susceptibility test. In: Lorain V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: press; Williams & Wilkins Press; 1996. p1-51.
5. Camporese A, Cappelletti P. Il ruolo del microbiologo clinico nel controllo delle infezioni nosocomiali e nella razionalizzazione dell'uso degli antimicrobici: l'esperienza di Pordenone. Med.Lab.1999; 7: Abstr H-09,527.
6. Marchese A, Schito GC. Osservatorio Epidemiologico Italiano per il monitoraggio delle resistenze agli antibiotici nei patogeni respiratori comunitari 1997-1999: significato per la pratica clinica. GIMMOC 2000; 4: 51-58.
7. Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. Clin Infect Dis 1998; 26: 811-838.
8. Garau J. Basing empiric treatment choices for respiratory tract infection on the results of the Alexander Project. J Chemother 1999;11:51-55.
9. Bacquero F, Barret JF, Courvalin P, et al. Epidemiology and mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. Clin Microbiol Infect Dis 1998; 4, suppl.2: 19-26.
10. Camporese A, Cappelletti P. Il report epidemiologico come strumento per monitorare l'uso razionale degli antibiotici. Med.Lab. 1999; 7: Abstr H-11,527.
11. Schito GC, Mannelli S, Cibrario Sent M, Pesce A, Marchese A. Evoluzione delle resistenze ai farmaci antimicrobici in *Streptococcus pneumoniae* circolante in Italia. Analisi dei dati dell'Osservatorio Epidemiologico Italiano (1998). GIMMOC 1999; 3: 43-47.
12. Camporese A, Tizianel G. Valutazione preliminare di un episodio di rilevante incremento di penicillino-resistenza di *Streptococcus pneumoniae* in provincia di Pordenone. Microbiologia Medica 2000; 15: Abstr G063,215.
13. Camporese A, Natoli D, Satta GF. *Streptococcus pneumoniae* resistance to antibiotics in Italy in the 2000 GISPneumo internet project. Clin Microbiol and Infection 2001; 7: Abstr P519,85
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement M100-S11. NCCLS, Villanova, PA; 2001.

15. Jorgensen JH, Howell AW, Maher LA. Quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using the E-test. J Clin Microbiol 1991;29:109-114.
16. Skulnick M, Small GW, Lo P, et al. Evaluation of accuracy and reproducibility of E test for susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, cefotaxime and ceftriaxone. J Clin Microbiol 1995; 33:2334-2337.
17. Marchese A, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Macrolide resistance mechanisms and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. J Antimicrob Chemother 1999; 44:461-464.
18. Amsden GW. Pneumococcal macrolide resistance-myth or reality? J Antimicrob Chemother. 1999; 44:1-6.
19. Acar JF. Resistance patterns of *Haemophilus influenzae*. J Chemother 1999; 11:44-50.
20. Daum RS, Murphey-Corb M, Shapira E, Dipp S. Epidemiology of ROB beta lactamase among ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in the United States. J Infect Dis 1988; 157: 450-455.
21. Rittenhouse SF, Miller LA, Kaplan RL, Mosley GH, Poupard JA. A survey of beta lactamase producing *Haemophilus influenzae*; an evaluation of 5750 isolates. Diagn Microbiol Infect 1995; 21:223-225.
22. Brook I. Inoculum effect. Rev Infect Dis 1989;11:361-368.
23. Syriopoulou V, Scheifele DW, Sack CM, Smith AL. Effect of inoculum size on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* b to beta lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16:510-513.
24. Doern GV, Daum GS, Tauber TA. In vitro chloramfenicol susceptibility of *Haemophilus influenzae*: disk diffusion procedures and assays for chloramfenicol acetyl-transferase. J Clin Microbiol 1987; 32:180-185.
25. Nicoletti G, Speciale A, Vizzini A, La Ferrera L, Blandino G, Caccamo F. Analisi del 3° anno di monitoraggio delle resistenze agli antibiotici in *Moraxella catarrhalis*. GIMMOC 2000; 4:43-50.