

Andamento delle resistenze agli antibiotici di *Helicobacter pylori* negli ultimi dieci anni

A. Savio, E. Donati, F. Pirali

Laboratorio di Patologia Clinica Ospedale S. Orsola Fatebenefratelli, Brescia

Riassunto. Gli Autori riportano le variazioni delle resistenze agli antibiotici di 214 ceppi di *Helicobacter pylori* isolati dal 1993 ad oggi da biopsie gastriche. Essi hanno riscontrato un aumento delle resistenze soprattutto per quanto riguarda i macrolidi sia a 14 che a 15 atomi di carbonio, mentre non sono state rilevate nel tempo significative variazioni per quanto concerne metronidazolo (resistenze sempre elevate), tetraciclina (resistenze sempre basse) ed amoxicillina (resistenze praticamente nulle). La stratificazione delle resistenze in base alla tipologia di pazienti da cui è avvenuto l'isolamento ha consentito poi di affermare che: 1) dove un macrolide non ha eradicato l'infezione, probabilmente un altro macrolide non sarà efficace 2) non prescrivere una seconda terapia contenente metronidazolo dopo il fallimento della prima 3) amoxicillina si può ripetere in associazioni diverse anche dopo terapie inefficaci che la contengono.

Summary. The Authors report the different resistance to antibiotics of 214 strains of *Helicobacter pylori* isolated from 1993 up today from gastric biopsy. They found an increase of resistance for macrolides, while the resistance of other antibiotics generally used in *Helicobacter pylori*'s infection not shown any difference: metronidazole continues to show high resistance, tetracycline very low and amoxicillin not resistance. The correlation among patterns of resistance and patients allows us to affirm: 1) if a macrolide was not effective in vivo, another different macrolide will not be effective 2) if metronidazole was not effective, don't use a second therapy with the same antibiotic 3) amoxicillin may be repeated also after in vivo not effective therapy containing the same antimicrobial agent.

Introduzione

Benchè lo studio delle patologie sostenute da *Helicobacter pylori* richiede sempre un apporto multidisciplinare, è comunque facile ipotizzare per il futuro un ruolo sempre più rilevante per il microbiologo. L'impiego infatti, dalla scoperta del batterio nel 1982 ad oggi (1), di specifici trattamenti antibiotici per l'eradicazione di *Helicobacter pylori* dalla mucosa gastrica ha certamente sottoposto tale microrganismo ad una ingente pressione selettiva. Se poi si tiene conto dell'elevata diffusione epidemiologica dell'infezione e che lo schema terapeutico più utilizzato è basato sull'associazione all'inibitore della pompa protonica, non di uno solo, ma di due antibiotici, si comprende come il rischio di ceppi resistenti sia ancora più elevato e quindi come assuma grande rilevanza la coltura *in vitro* del microrganismo non tanto a scopo diagnostico, dal momento

che sono disponibili altri sistemi altrettanto efficaci, quanto per lo studio della sensibilità agli antibiotici. Infatti la coltura di *Helicobacter pylori*, benchè non sia di agevole esecuzione e proprio per questo limitata di solito a centri di ricerca, è la condizione indispensabile per poter valutare la sensibilità del ceppo agli antibiotici e, sebbene non esista ancora una metodica standardizzata e validata a livello internazionale per saggiare *in vitro* la sensibilità di *Helicobacter pylori* agli antibiotici, l'aver dati di sensibilità e resistenza degli isolati clinici assume un valore clinico di rilievo per la gestione del paziente. E' noto infatti che *Helicobacter pylori* è sensibile in genere ad una grande varietà di antibiotici (2, 3), ma non sempre il trattamento antimicrobico del paziente porta all'eradicazione dell'infezione non solo per l'eventuale azione inibente gli antibiotici dei succhi gastrici o per l'insufficiente concentrazione dell'antimicrobico nel sito di infezione, ma proprio perchè

o non è stato eseguito un antibiogramma iniziale o durante il trattamento si è sviluppata resistenza nel ceppo batterico.

Date queste premesse ci è sembrato di grande interesse rivedere i dati di sensibilità e resistenza agli antibiotici dei ceppi di *Helicobacter pylori* isolati da materiali biopsici presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale S.Orsola Fatebenefratelli di Brescia a partire dai primi isolamenti risalenti a oltre 10 anni fa sino ad oggi, sia per verificare l'epidemiologia attuale delle resistenze, sia per individuare eventuali significative variazioni nel tempo che possano suggerire cambiamenti nei comportamenti terapeutici e di monitoraggio dell'infezione sino ad ora adottati.

Materiali e Metodi

Sono stati presi in considerazione i *test* di sensibilità agli antibiotici eseguiti dal 1993 ad oggi sui ceppi di *Helicobacter pylori* isolati da biopsie gastriche provenienti da reparti dello Ospedale S.Orsola o da ambulatori di endoscopia.

Inoltre 66 pazienti con coltura positiva per *Helicobacter pylori* sono stati suddivisi, in base alla presenza di dati anamnestici, in tre gruppi: gruppo A (29 soggetti) che non erano mai stati sottoposti a nessun trattamento eradicante; gruppo B (9 soggetti) che erano stati sottoposti ad un precedente trattamento eradicante con la associazione amoxicillina+omeprazolo; gruppo C (28 pazienti) sottoposti a trattamento con amoxicillina, metronidazolo e citrato di bismuto colloidale e/o omeprazolo. Nei diversi gruppi sono state fatte valutazioni separate di sensibilità e resistenza agli antibiotici.

La coltura di *Helicobacter pylori* veniva effettuata secondo una variante metodologica messa a punto in laboratorio (4). Due frammenti di mucosa gastrica, prelevati durante endoscopia a livello dell'antro e del corpo gastrico erano raccolti direttamente in una piastra di terreno selettivo (*Helicobacter Selective Agar* + 7% Sangue lisato di cavallo, Becton Dickinson codice 254430, o *Pylori Agar Bio Merieux* codice 42263). Dopo che i campioni erano strisciati con un ago sterile sulla superficie della piastra di *agar*, erano posti ad incubare per 3 giorni a 37 °C in una giara con atmosfera microaerofila (GEN box microaerofilo Bio Merieux codice 96125). Le colonie venivano identificate in base alla loro morfologia macroscopica (colonie molto piccole, convesse, traslucide, giallo chiaro) microscopica (bacillette Gram negative ricurve ed a spirale) ed in base alla positività dei *test* biochimici ossidasi, catalasi ed ureasi.

L'antibiogramma veniva eseguito su agar sangue a partire da un inoculo di torbidità circa 3 Mc Farland ottenuto sospendendo una ansata piena della patina di una coltura di tre giorni in 1 cc di soluzione fisiologica. Venivano utilizzati dischetti impregnati di Tetraciclina 30 ug (Becton Dickinson Codice 231343) Azitromicina 15 ug (BD codice 231682), Eritromicina 15 ug (BD codice 231290) Amoxicillina 10 ug (BD codice 231264), Metronidazolo 5 ug (Oxoid codice CT067B) e Claritromicina (Oxoid codice CT 693B). Le piastre venivano lette dopo 3 giorni di incubazione in atmosfera microaerofila ed i ceppi considerati sensibili con un alone di inibizione > 30 mm per amoxicillina, tetraciclina e macrolidi e 20 mm per metronidazolo.

Risultati

In oltre 10 anni di attività sono stati isolati presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale S.Orsola Fatebenefratelli di Brescia 214 ceppi di *Helicobacter pylori*. Le percentuali di resistenza valutate su tutti gli isolati sono globalmente risultate per Metronidazolo del 54%, per Amoxicillina dello 0%, per Azitromicina ed Eritromicina del 24 %, per Claritromicina del 35%, per Tetraciclina del 7%.

Nel quinquennio 1993-1997 le percentuali di resistenza sono risultate per Metronidazolo del 55%, per Azitromicina, Claritromicina ed Eritromicina del 14%, per Tetraciclina del 9%.

Nel quinquennio successivo 1998-2002 le percentuali di resistenza sono risultate per Metronidazolo del 53%, per Claritromicina del 48%, per Tetraciclina del 6%.

Le percentuali di resistenza e la relativa numerosità della casistica presa in considerazione sono in dettaglio riportati nella tabella 1.

Nei 66 pazienti nei quali è stato possibile avere dei dati anamnestici che ne hanno permesso la suddivisione nei tre gruppi indicati in precedenza, tutti i pazienti che avevano subito un precedente trattamento, ovviamente inefficace, contenente Metronidazolo hanno presentato ceppi di *Helicobacter pylori* resistenti al Metronidazolo. Negli altri soggetti non trattati o trattati in precedenza con associazioni prive di metronidazolo (gruppi A e B) sono state riscontrate resistenze al Metronidazolo rispettivamente del 17% e del 33%.

Sempre in questo gruppo di pazienti non è mai stata riscontrata resistenza ad amoxicillina anche nei casi di precedente trattamento inefficace con lo stesso farmaco, la resistenza alla tetraciclina variava invece dallo 0% nei soggetti mai trattati allo 11% nei soggetti trattati con duplice terapia al 7% con triplice.

La resistenza infine alla Azitromicina è risultata rispettivamente del 9%, dello 0%, e del 25% nei tre

gruppi A, B, C, e sempre sovrapponibile a quella di Eritromicina e Claritromicina.

Tabella I. Percentuali di resistenza di *Helicobacter pylori* a diversi antibiotici nel periodo 1993-2002.

antibiotico	1993-1997	1998-2002	1993-2002
Metronidazolo N. ceppi testati	55% (92)	53% (122)	54% 214
Amoxicillina N. ceppi testati	0% (66)	0% (131)	0% (197)
Azitromicina N. ceppi testati	14% (87)	-	-
Eritromicina N. ceppi testati	14% (87)	-	-
Claritromicina N. ceppi testati	14% (83)	48% (131)	35% (214)
Tetraciclina N. ceppi testati	9% (83)	6% (122)	7% (205)

Discussione e Conclusioni

I risultati del nostro lavoro ci consentono di effettuare alcune considerazioni riguardanti le resistenze agli antibiotici di *Helicobacter pylori* di isolamento clinico sia in fase diagnostica che di monitoraggio della terapia.

Mentre Amoxicillina infatti è stata riscontrata praticamente sempre efficace in vitro, i macrolidi sia a 14 atomi di carbonio come Eritromicina e Claritromicina, che a 15 atomi come Azitromicina hanno presentato percentuali di resistenza di circa il 14% già nel periodo 1993-1997. Tale dato risulta sempre superiore a quello riportato dalla letteratura per i paesi occidentali (5), mentre è in accordo con analoghe valutazioni fatte nel Nord Italia (6).

Concordemente con quanto riportato in tutta la letteratura (7, 8, 9) anche nel nostro studio è emerso che quando un ceppo di *Helicobacter pylori* è resistente ad un macrolide è sempre resistente a tutti gli altri composti del gruppo per una resistenza crociata dovuta come è noto ad una modificazione del bersaglio ribosomico, dimostrata per primo da Versalovic e coll. nel 1996 (10). Questi Autori infatti hanno documentato la presenza di una mutazione puntiforme a livello dell'adenina in posizione 2058 e 2059 del rRNA 23S ed altri gruppi di ricerca hanno ulteriormente evidenziato come la resistenza ai macrolidi sia associata alla diminuzione della affinità dei macrolidi stessi per i ribosomi confrontando l'affinità di Eritromicina per i ribosomi estratti dagli sti-

piti resistenti rispetto agli stipti parentali sensibili, isolati prima del trattamento con macrolidi (5).

Un altro dato emerso nel nostro studio è il rilievo di percentuali di resistenza alla Claritromicina che negli ultimi cinque anni sono passate al 48% nettamente più elevate di quelle degli anni precedenti, ad indicare la significativa maggior diffusione con il tempo di ceppi di *Helicobacter pylori* resistenti ai macrolidi. Tale dato è ancora più preoccupante se si considera che nel 1994 le percentuali di resistenza riportate in letteratura per Claritromicina in Italia erano soltanto del 5% (5), altri Autori indicavano anche il 100% di sensibilità (11) e, come è noto, tra i macrolidi Claritromicina è quello che presenta la minima sensibilità al pH acido dello stomaco ed una buona diffusione e concentrazione a livello della mucosa gastrica, tutti elementi chiave per una buona attività in vivo contro *Helicobacter pylori*. Tutto ciò conferma quanto ipotizzato da diversi gruppi di ricerca (5, 9) secondo cui il sopravvento della resistenza ai macrolidi in *Helicobacter pylori* rischia di aumentare durante i prossimi anni e la sorveglianza di questa resistenza diventa assolutamente indispensabile.

Per Metronidazolo le percentuali di resistenza riscontrate nel nostro studio sono piuttosto alte, non dissimili da quelle riferite da Marchiaro e coll (12). in isolamenti del Piemonte, nettamente più basse rispetto ai risultati di D'Allotta e coll. (11), ma soprattutto è confortante il dato che con il passare del tempo non si siano verificati significativi aumenti. Gli

isolamenti poi ottenuti sul piccolo gruppo di pazienti già sottoposti a trattamento antimicrobico con Metronidazolo hanno poi sempre fatto riscontrare ceppi resistenti a tale farmaco, suggerendo di non prescrivere un secondo ciclo di terapia contenente Metronidazolo dopo il fallimento del primo.

La resistenza a Tetraciclina non ha evidenziato significative variazioni nei due lustri presi a confronto, anzi sembra passata da percentuali del 9% durante il periodo 1993-1997 al 6% nel 1998-2002. Ciò indicherebbe una relativa stabilità nei confronti di un farmaco che continua ad avere precise indicazioni nella terapia antinfettiva.

Anche nel nostro studio l'antibiotico più efficace in vitro si è dimostrato Amoxicillina, che praticamente non ha mai mostrato resistenze *in vitro* anche se, come è ben noto, a ciò non corrisponde sempre successo *in vivo*. I risultati comunque ottenuti nel gruppo di pazienti precedentemente trattati senza successo con Amoxicillina, non hanno mai evidenziato ceppi resistenti per cui è lecito pensare che un trattamento con questo antibiotico può essere ripetuto in associazione diversa anche dopo terapie inefficaci che lo contengano.

In conclusione il nostro studio ha confermato la presenza di resistenze agli antibiotici nei ceppi di *Helicobacter pylori* di isolamento clinico che, per alcune classi come i macrolidi si sono andate accentuando con il passar del tempo e l'aumento della pressione selettiva.

Il rispetto di qualche semplice regola potrebbe comunque permettere di limitarne la diffusione, in particolare saranno da evitare le monoterapie, trattamenti troppo corti o con posologie troppo basse, evitando l'uso del Metronidazolo se anamnesticamente si rileva l'impiego di tale antimicrobico in corso di infestazioni protozoarie (es. Trichomoniasi vaginale) o di pregresse infezioni anaerobiche. Resta in ogni caso da suggerire l'esecuzione di un antibiogramma in tutti i casi di isolamento colturale di *Helicobacter pylori*, soprattutto prima di prescrivere un antibiotico della famiglia dei macrolidi.

Bibliografia

1. Warren JR, Marshall BJ Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis Lancet 1983, i: 1273-75
2. Gruppo Italiano di Studio dell'*Helicobacter pylori* Gut 1995; 37: 212
3. Glupczynski Y Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing In Lee A, Megraud F: *Helicobacter pylori: technique for clinical diagnosis and basic research* Ed. Saunders Company Ltd 1996 pp 17-28
4. Savio A. Alternative method for transporting and storing gastric biopsy cultures of *Helicobacter pylori* J Clin. Pathol. 1994, 47(2): 189-90
5. Occhialini A., Megraud F Resistenza di *Helicobacter pylori* ai macrolidi Microbiologia Medica 1997, 4: 481-487
6. Zanetti M.V., Pieramico O. Prevalenza dell'attività in vitro di metronidazolo e claritromicina nei confronti di colture *Helicobacter pylori* positive da biopsie gastriche Microbiologia Medica 1997, 2: 145-146
7. Glupczynsky Y, Van den Borre C, Devaster C, Butzler JP, Burette A, Goutier S Evaluation of metronidazole and claritromycin screening agar plates for in vitro susceptibility testing of *H. pylori* Gut 1997, 41 (suppl 1): a71 (08/255)
8. Hartzel S, Andersen LP, Bremmelgard A, Colding H, Kristiansen J The determination of Antimicrobial Susceptibility of 230 *H. pylori* strains by agar dilution and the E test Clin. Microbiol. Infect. 1997; 3 (suppl 2): 230: P944
9. Megraud F, Lehn N, Lind TN *Helicobacter pylori* resistance to antimicrobial agents and its influence on clinical outcome Gastroenterology 1997; 112; A 216
10. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K., Griffy MV, Beyer J, Flamm RK et al. Mutations in 23 rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 477-80
11. D'Allotta P, Pilotto A, Rassa M, Furlan F, Bragagnolo L, Scagnelli M *Helicobacter pylori* in un gruppo di pazienti ospedalizzati per patologie gastro-duodenali Microbiologia Medica 1995, 3, 305-306
12. Marchiaro G, Serra R., Sanseverino P Attività in vitro di 4 antibiotici nei confronti di *Helicobacter pylori* Microbiologia Medica 1995; 3, 214-215