

# Το Αντιβιόγραμμα στο *Helicobacter pylori*

Αναστασία Πάγκαλη

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αντιβιόγραμμα στο *H. pylori* παρουσιάζει ιδιομορφίες που πηγάζουν από το γεγονός ότι είναι ένα μικροαερόφιλο, απαιτητικό και βραδέως αναπτυσσόμενο μικρόβιο, για το οποίο δεν υπάρχουν προτυπωμένες μέθοδοι παραδεκτές από διεθνείς επιτροπές όπως η NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) στην Αμερική.

Αν και υπάρχουν εργασίες στις οποίες έχει ελεγχθεί η ευαισθησία του *H. pylori* σε πολλά αντιβιοτικά, όπως πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μακρολίδες, τετρακυλίνες, νιτροιμιδαζόλες, νιτροφουράνια και κινολόνες, στην πράξη ενδιαφέρει κυρίως ο έλεγχος της ευαισθησίας σε αμοξυκυλλίνη, τετρακυκλίνη, μετρονιδαζόλη και κλαριθρομυκίνη, δηλαδή αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori*.

Επειδή το *H. pylori* αναπτύσσεται βραδέως στα θρεπτικά υλικά δεν είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί η μέθοδος των δίσκων κατά Kirby-Bauer για τον έλεγχο της ευαισθησίας του στα αντιβιοτικά. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι ο προσδιορισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (ΕΑΠ ή MIC) και γίνεται με δύο τεχνικές:

1. Τη μέθοδο διαλύσεως του αντιβιοτικού στο άγαρ (Agar dilution) που

θεωρείται και μέθοδος αναφοράς και χρησιμοποιείται για έλεγχο πολλών στελεχών συγχρόνως.

2. Το E-test (AB Biodisk) που συνδυάζει τη μέθοδο προσδιορισμού της ΕΑΠ και τη μέθοδο των δίσκων.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τον έλεγχο της ΕΑΠ είναι η απομόνωση του *H. pylori* και η επιβίωσή του, πολλές φορές δύσκολη ή ανέφικτη. Για τούτο προτείνεται από πολλούς ερευνητές να γίνεται περιοδικά από Κέντρα Αναφοράς ο έλεγχος της ΕΑΠ σε στελέχη που απομονώνονται από διάφορες περιοχές και τα αποτελέσματα να χρησιμοποιούνται για εμπειρική θεραπεία.

## ΤΕΧΝΙΚΗ

### Μέθοδος διάλυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ

Κατά τη μέθοδο αυτή το υπό έλεγχο αντιβιοτικό ενσωματώνεται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό, το οποίο είναι συνήθως το Muller Hinton agar εμπλουτισμένο με απινιδωμένο αίμα αλόγου (5-10%), ή απινιδωμένο αίμα προβάτου με Isonitalex. Χρησιμοποιούνται υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού από 0,008 έως 64 µg/ml και κάθε αραιώση ενσωματώνεται σε ένα τρυβλίο. Το ενοφθάλμισμα εφαρμόζεται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με ειδικό εφαρμοστή χειροκίνητο ή αυτοματοποιημένο (steers applicator). Σε κάθε αραιώση ελέγχονται συγχρόνως 15-25 στελέχη.

Το **ενοφθάλμισμα** γίνεται σε ζωμό TSB (Tryptone Soy Broth) και η θολερότητά του πρέπει να είναι 3-4 της κλίμακας Mac Farlan. Μεγάλη σημασία εκτός από τη θολερότητα έχει και η βιωσιμότητα του *H. pylori* στο ενοφθάλμισμα που εξασφαλίζεται με τη χρησιμοποίηση καλλιεργημάτων δύο ημερών. Προτείνεται το ενοφθάλμισμα να μικροσκοπείται πριν από τη χρήση του και εάν περιέχει κύτταρα αποστρογγυλωμένα ή ακίνητα περισσότερα από 25% να μη χρησιμοποιείται.

Η **επώαση** γίνεται σε μικροαερόφιλες συνθήκες χρησιμοποιώντας είτε φιάλες Gas Pak με τους ειδικούς αναγεννητές (π.χ. Campy Pak microaerophilic system envelope, BBL), είτε ατομικά σακουλάκια BioBags (π.χ. Campy pouch microaerophilic system, BBL), σε θερμοκρασία 35°C η οποία παρατείνεται για 72 ώρες.

Η **ανάγνωση** γίνεται με καλό φωτισμό και σαν ΕΑΠ ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη του μικροβίου.

Η μέθοδος είναι αξιόπιστη με επαναλήψιμα αποτελέσματα αλλά χρονοβόρος και δαπανηρή. Δεν συνιστάται στην καθημερινή πρακτική.

### Μέθοδος E-test (AB Biodisk)

Κατά τη μέθοδο αυτή το θρεπτικό υλικό και το ενοφθάλμισμα παρασκευάζονται όπως και στη μέθοδο 1. Χρησιμοποιούνται τρυβλία διαμέτρου 9 cm ή 15 cm για τον έλεγχο ενός μόνο ή τεσσάρων αντιβιοτικών συγχρόνως. Το ενοφθάλμισμα χρησιμοποιείται μέσα σε 15 λεπτά από την παρασκευή του, επιστρώνεται στο θρεπτικό υλικό με βαμβακοφόρο στυλεό και αφήνεται να απορροφηθεί τελείως. Το αντιβιοτικό είναι προσροφημένο σε συνεχείς πυκνότητες πάνω σε ειδικές ταινίες. Για κάθε αντιβιοτικό αντιστοιχεί μια ταινία. Οι ταινίες τοποθετούνται πάνω στο τρυβλίο και ακολουθεί επώαση σε 35°C και μικροαερόφιλες συνθήκες, κατά τα γνωστά, για 72 ή περισσότερες ώρες ή έως ότου υπάρξει ορατή ανάπτυξη του μικροβίου. Η ανάγνωση γίνεται προσεκτικά με προσπίπτοντα φωτισμό και η ΕΑΠ ορίζεται από εκείνη την πυκνότητα στην οποία η ελλειψοειδής αναστολή της ανάπτυξης τέμνει την ταινία.

Η μέθοδος είναι αναπαραγώγιμη και ελεγχόμενη με άριστη συσχέτιση προς τη μέθοδο αναφοράς και προσφέρεται για την καθημερινή πρακτική των Νοσοκομειακών Εργαστηρίων.

Κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη, και με τις δύο μεθόδους, προηγείται αναερόβια επώαση για 24 ώρες και ακολουθεί η μικροαερόφιλη έως τις 72 ή περισσότερες ώρες.

### Έλεγχος ποιότητας (Quality Control)

Για τον έλεγχο της ποιότητας χρησιμοποιούνται τα στελέχη *H. pylori* ATCC 43504 και ATCC 43576 τα οποία δίνουν ενδεικτικές και υπό μελέτη ΕΑΠ στις 72 ώρες για την Amoxicillin 0,008-0,06 µg/ml, για την Clarithromycin 0,016-0,25 µg/ml αντίστοιχα και για την Tetracycline 0,125-1 µg/ml και 0,06-1 µg/ml αντίστοιχα. Τα όρια αυτά πιθανόν να αλλάξουν, για δε τη μετρονιδαζόλη δεν αναφέρονται όρια.

### ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Με αυτές γίνεται προσπάθεια αναζήτησης των μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για την αντοχή του *H. pylori* στα διάφορα αντιβιοτικά εις τρόπο ώστε ο χαρακτηρισμός τους να επιτρέπει την άμεση διάγνωση της αντοχής με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

### Αντοχή του *H. pylori* σε διάφορα αντιβιοτικά

Κυρίως παρατηρείται αντοχή στην κλαριθρομυκίνη και μετρονιδαζόλη που ποικίλλει από χώρα σε χώρα, την ηλικία και το φύλλο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η μεγάλη διακύμανση της αντοχής στα αντιβιοτικά αυτά και ιδίως τη μετρονιδαζόλη οφείλεται στη μεθοδολογία. Αναφέρονται αντοχή του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη μέχρι και 60% στις αναπτυγμένες χώρες που φθάνει έως και 95% στις αναπτυσσόμενες. Η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη είναι χαμηλή ενώ συνυπάρχουν και συνδυασμένη αντοχή σε μετρονιδαζόλη και κλαριθρομυκίνη. Η αντοχή σε τετρακυκλίνη και αμοξικιλίνη είναι αμελητέα.

Συμπερασματικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι υπάρχει αναγκαιότητα ελέγχου της ευαισθησίας του *H. pylori* στα χρησιμοποιούμενα για τη θεραπεία εκρίζωσης αντιβιοτικά υπό τον όρον ότι εφαρμόζεται σωστή μεθοδολογία και τηρούνται σχολαστικά όλες οι προϋποθέσεις και κανόνες για την παραγωγή αξιόπιστου και αναπαραγώγιμου αποτελέσματος.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μεντής Α. (1998). Αντοχή στα αντιβιοτικά σε Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (Σύγχρονες απόψεις), Θεόδωρος Α. Ροκκάς, Αθήνα.
2. European Study Group on antibiotic susceptibility of *H. pylori*. Results of a multicenter European survey in 1991 on metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11(9):777-81.
3. Glupczynski Y, Labbe M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of E-test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1991; 29(9):2072-5.
4. Hirschl AM, Hirschl MM, Rotter ML. Comparison of three methods for the determination of the sensitivity of *Helicobacter pylori* to metronidazole. J Antimicrob Chemother 1993; 32:45-9.