

# L'emergenza della resistenza batterica agli antibiotici e il suo impatto sul laboratorio di microbiologia clinica\*

**Pietro E. Varaldo**

*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche*

\*Le riflessioni qui riportate sono state elaborate, in parte, in occasione di riunioni dell'AMCLI Marche (Jesi, 19.10.2001) e del Comitato AMCLI per lo Studio degli Antibiotici (CoSA) (Milano, 11.12.2001 e Firenze, 11.4.2002) e, in parte, in un *Leading Article* su *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Varaldo PE. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 1-4).

Il problema ingravescente della resistenza batterica agli antibiotici, da tutti ormai percepito come uno dei grandi scenari di crisi della medicina moderna, ha enormi implicazioni anche di laboratorio, oltre che cliniche. Tali implicazioni riguardano sia le linee guida per l'attività diagnostica di routine, in continua evoluzione, sia la gestione nazionale e internazionale delle varie problematiche collegate.

A poco a poco, l'ottimismo, la fiducia, le illusioni di ieri riguardo alle possibilità degli antibiotici hanno lasciato il posto al disincanto e alla sfiducia di oggi (14, 34), con discorsi sempre più frequenti e inquietanti su guerre microbiche (16), nuove pesti (17), calamità planetarie (18), nuove apocalissi (1, 20, 33), e addirittura un'incombente era post-antibiotica (6). Ma al di là di vecchi e nuovi eccessi di ottimismo o di pessimismo, è un fatto che le resistenze sono in aumento, mentre le scoperte di nuovi antibiotici sono in declino da anni. Verso la fine degli anni '80, molte compagnie farmaceutiche cominciarono a perdere interesse per lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici, per progetti cioè sempre più costosi e destinati ad un mercato sempre più incerto e affollato (14), sicché i finanziamenti per questi progetti finirono per essere significativamente ridimensionati o limitati a settori molto specifici (29, 34). Questo ridimensionamento ha colpito soprattutto gli antibiotici realmente nuovi, quelli cioè attivi su bersagli totalmente nuovi, che insieme ai nuovi vaccini costituiscono la sola speranza di arginare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza (15, 34, 36). Insomma, se in passato c'era sempre un nuovo antibiotico nel nostro futuro, per l'avvenire non sarà più così (30). Come crudamente argomentato da Spratt, i batteri non si arrenderanno di certo, se mai saranno le compagnie farmaceutiche ad arrendersi (34).

Eppure, si fa fatica a contenere il consumo di antibiotici, oggetto di un approccio spesso quasi consumistico (*a pill for every ill*), in ciò favorito un po' da tutti (pazienti, medici, farmacisti, industrie

farmaceutiche). Paradossalmente, la crescente capacità dei batteri di resistere agli antibiotici è rafforzata dall'uso proprio di quegli stessi antibiotici (21). Per di più, recenti evidenze sperimentali suggeriscono che anche un'eventuale riduzione dell'uso degli antibiotici (e della relativa pressione selettiva) difficilmente potrà produrre una effettiva riduzione delle resistenze già presenti negli ospedali e nella comunità, in serbatoi umani ed animali (3, 29, 31). Un altro paradosso, d'altronde, è che non solo l'abuso, ma anche l'uso insufficiente degli antibiotici può essere altrettanto disastroso: un trattamento antibiotico inadeguato favorisce l'emergenza di batteri con una ridotta sensibilità agli antibiotici, che finiranno per andare a rinforzare il serbatoio dei batteri resistenti (21).

D'altra parte, molti concetti convenzionali stanno cambiando, per esempio riguardo ai rapporti fra resistenza e patogenicità. Per un batterio, oggi, è probabilmente più vantaggioso essere resistente che essere virulento, soprattutto in ambiente ospedaliero (7). E ciò che vediamo non è che la classica punta dell'*iceberg*: il serbatoio per la diffusione dei patogeni resistenti nosocomiali consiste infatti in un numero relativamente piccolo di pazienti con infezione clinicamente evidente, a fronte di un numero molto più vasto di pazienti asintomatici colonizzati (11); per non parlare di animali ed altri serbatoi, come nel caso ormai eclatante degli enterococchi vancomicina-resistenti, responsabili di infezioni considerate da alcuni vere e proprie zoonosi (32). Relazioni nuove e imprevedute fra resistenza e patogenicità stanno emergendo anche a livello comunitario. Basti pensare alla recentissima scoperta di un'associazione tanto stretta quanto insospettata, in ceppi clinici di *Streptococcus pyogenes*, fra la resistenza all'eritromicina e la capacità di invadere cellule respiratorie umane (10). Questi ceppi possono sfuggire contemporaneamente alle due principali classi di antibiotici antistreptococchi: ai  $\beta$ -lattamici (farmaci strettamente extracellulari)

grazie alla localizzazione intracellulare, e ai macrolidi (capaci di penetrare e concentrarsi nelle cellule) grazie alla resistenza. Ciò può renderne difficile l'eradicazione, e può essere alla base dell'elevata diffusione nel nostro Paese (che non ha eguali al mondo) di popolazioni streptococciche eritromicina-resistenti (10, 27, 35).

Quanto ai test di sensibilità, il cuore del problema rimane il tenue, e talora ambiguo, legame fra i fenomeni *in vitro* e i fenomeni *in vivo*, fra il dato di laboratorio e la sua valenza clinica (nel paziente). La questione del valore predittivo dei test di sensibilità *in vitro* è stata messa a fuoco con acutezza da Phillips (25, 26) che, confrontando le ragioni del "sano scetticismo" (così lo definisce) espresso dagli epigoni di Greenwood – autore anni fa di un editoriale molto critico significativamente intitolato *In vitro veritas?* (13) – con quelle di altri microbiologi (la maggioranza, con cui egli si schiera), conclude che si può senz'altro riuscire a trovare una soluzione accettabile per i vari problemi. È ovvio che, in termini di predittività del dato *in vitro*, il dato "resistenza" è più affidabile e predittivo del dato "sensibilità" (28). È infatti risaputo e accettato che, se i test di laboratorio indicano che un ceppo batterico isolato da un'infezione è resistente *in vitro* ad un particolare antibiotico, è praticamente da escludere che quell'antibiotico possa essere efficace per il trattamento di quell'infezione. Mentre non è necessariamente vero l'inverso: se cioè un ceppo clinico risulta sensibile ad un particolare antibiotico nei test *in vitro*, non abbiamo nessuna reale garanzia che la terapia con quell'antibiotico risulterà efficace (l'efficacia terapeutica dipende infatti anche da una molteplicità di altri fattori, come la sede dell'infezione, le proprietà farmacologiche dell'antibiotico, la concomitanza di altre condizioni morbose, l'efficienza delle difese specifiche e aspecifiche, ecc...). Sicché, mentre la "resistenza" *in vitro* è condizione sufficiente per una decisione clinica (ancorché di segno negativo, trattandosi di escludere l'antibiotico in questione), la "sensibilità" *in vitro* è condizione necessaria ma non sufficiente alla decisione clinica (in positivo, riguardo cioè a quale antibiotico usare). Anche da ciò derivano la diffusione e la fortuna di strategie di laboratorio intese a privilegiare la valutazione della resistenza piuttosto che della sensibilità (dai test per la  $\beta$ -lattamasi alla determinazione molecolare di specifici geni di resistenza).

Ma è proprio vero che la resistenza *in vitro* sia così tassativamente predittiva di un fallimento terapeutico? In un recente e vasto *trial* clinico in Italia, la maggior parte dei ceppi macrolido-resistenti di *S. pyogenes* isolati da pazienti poi trattati con macrolidi risultavano nondimeno eradicati

(35). E sempre in tema di infezioni streptococciche, è il caso di ricordare la documentata capacità della penicillina di aver ragione di polmoniti causate da ceppi moderatamente penicillino-resistenti di *Streptococcus pneumoniae* (3, 23). Che significa tutto ciò? Che un ceppo può essere resistente *in vitro* a un antibiotico a cui risponde *in vivo*? Ma evidentemente no: se il ceppo davvero risponde vuol dire che non è resistente, se mai è la sua resistenza *in vitro* che andrà riconsiderata. In fin dei conti, la resistenza e la sensibilità *in vitro* non sono che convenzioni, strettamente dipendenti dai *breakpoint* adottati. Già più di 10 anni fa Sanders parlava di "magici" *breakpoint* (28), per sottolinearne il significato tanto cruciale quanto incontrollabile ed arcano per il comune laboratorio, dove ci si limita ad etichettare come resistenti i ceppi che superano questa "magica" soglia. In effetti, sebbene vi sia chi ha suggerito di riportare solo la distribuzione delle MIC anziché le categorie di sensibilità (36), la risposta del laboratorio riguardo ai test di sensibilità si basa di regola sul cosiddetto sistema SIR (sensibile, intermedio, resistente).

D'altra parte, l'antibiotico-resistenza non è quel fenomeno definitivo che molti credono che sia (26). In particolare, se sugli aspetti qualitativi della resistenza siamo sempre più e meglio edotti, sui suoi aspetti quantitativi le nostre conoscenze restano invece alquanto carenti, e ciò vale in particolare per i nostri tentativi di stabilire dei *breakpoint* che abbiano un valore clinico (26). Purtroppo, la necessità di fornire dati *in vitro* che siano sempre più affidabili e predittivi non ha certo portato, né tanto meno porterà, ad una semplificazione, ma semmai ad una sempre più complessa, laboriosa e difficile interpretazione dei risultati *in vitro*. Indicativo di questo *trend* è il moltiplicarsi dei documenti al riguardo del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Nei primi di tali documenti (fine anni '70-primi anni '80), tutti i *breakpoint* erano elencati in un'unica tabella, semplice anche se di grandi dimensioni: la famosa tabella 2 (M2-A, 1984; M7-A, 1986). Più tardi, nei documenti di fine anni '80-metà anni '90, cominciano a uscire delle tabelle aggiuntive con *breakpoint* differenziati per particolari microrganismi: prima l'emofilo (tabella 2A) (M2-T4, 1988; M7-T2, 1988), poi il gonococco (tabella 2B) (M2-A4, 1990; M7-A2, 1990), poi lo pneumococco (tabella 2C) (M2-A5, 1993; M7-A3, 1993) a cui sono successivamente aggiunti gli altri streptococchi (M100-S6, 1995). Nel 1998 cambia tutto e si passa ad un approccio totalmente nuovo, con l'abolizione abolizione della mega-tabella 2, che viene scorporata in nove tabelle distinte per gruppi di batteri: le tabelle 2A

(*Enterobacteriaceae*), 2B (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.), 2C (*Staphylococcus* spp.), 2D (*Enterococcus* spp.), 2E (*Haemophilus* spp.), 2F (*Neisseria gonorrhoeae*), 2G (*Streptococcus pneumoniae*), 2H (*Streptococcus* spp. diversi da *S. pneumoniae*), e 2I (*Vibrio cholerae*) (M100-S8, 1998). Una decima tabella (2J), relativa a *Helicobacter pylori* e limitata ai test di diluizione, viene aggiunta nel 2000 (M7-A5, 2000). E non è finita. Oltre che in base al tipo di microorganismo, i *breakpoint* cominciano ora ad essere differenziati in base al sito di infezione: negli ultimi documenti NCCLS (M100-S12, 2002; M7-A6, 2003), nella tabella degli pneumococchi sono forniti *breakpoint* diversi per taluni  $\beta$ -lattamici a seconda che lo pneumococco in esame provenga da una meningite o da altra infezione. Ed è probabile che in futuro ci toccherà considerare anche ulteriori parametri: ad esempio, lo stesso valore di MIC per lo stesso tipo di microorganismo potrebbe avere un significato diverso a seconda del meccanismo di resistenza (per es. degradazione enzimatica, o modificazione del bersaglio, o efflusso). E infatti già vi è chi raccomanda che il laboratorio sia in grado non solo di segnalare la resistenza, ma anche di distinguere fra i diversi meccanismi di resistenza (22) e di discernere il livello (alto o basso) con cui la resistenza stessa si esprime (2). Quello del livello della resistenza è un altro problema emergente, anche perché il progressivo aumento delle resistenze a basso livello, prodotto dall'enorme diffusione ambientale di basse concentrazioni di antibiotici, favorisce la selezione secondaria di meccanismi di resistenza più specifici ed efficaci, particolarmente nei pazienti in trattamento antibiotico (2).

Insomma, più si procede e più il discorso si fa complesso, soprattutto intorno al punto topico e dolente dei "magici" *breakpoint*. I quali, ovviamente, dovranno essere stabiliti con estrema cura all'inizio da chi ne ha l'onere (in base a dati microbiologici, farmacologici, statistici, clinici) e poi sottoposti a periodici riesami qualora intervengano cambiamenti riguardo alle resistenze (particolarmente insidiose se acquisite gradualmente da patogeni comuni), ai test di sensibilità, alle formulazioni antimicrobiche (12, 24). Per di più, i *breakpoint* possono variare a livello internazionale, sicché uno stesso batterio può risultare sensibile in un Paese e resistente in un altro (8, 19). Infatti, il problema dell'interpretazione dei test di sensibilità (ossia la determinazione dei *breakpoint*) resta affidato a comitati nazionali, ed è molto difficile anche in prospettiva (e per ora di fatto impossibile, e forse neppure auspicabile) pervenire ad una standardizzazione generale, cioè

a linee guida internazionalmente riconosciute e valide ovunque.

Perché comitati nazionali? Essenzialmente (e in estrema sintesi) perché se già era difficile trovare accordi internazionali sui metodi per i test di sensibilità (oggetto negli anni '60 di diversi convegni internazionali sponsorizzati dall'OMS), era impossibile trovarli sull'interpretazione dei dati. Sicché fin dal 1961 una direttiva dell'OMS stabilì di demandare tali aspetti interpretativi ad autorità nazionali (5). In Europa, sono attivi almeno sei diversi comitati nazionali (inglese, francese, tedesco, olandese, svedese, e norvegese) che forniscono linee guida per i *breakpoint*. Altri Paesi europei (come l'Italia) hanno in pratica adottato le linee guida americane (NCCLS). C'è da qualche tempo un comitato europeo operativo nell'ambito dell'ESCMID (lo *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST), che include un sottocomitato per i *breakpoint* che recentemente ha emanato il suo primo documento, proprio sulla determinazione dei *breakpoint* (9). Questo comitato europeo resta tuttavia legato, in termini operativi, ai vari comitati nazionali. L'Italia non ha mai avuto un proprio comitato nazionale: forse i tempi sono maturi per una nuova e serena riflessione al riguardo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ash C. Antibiotic resistance: the new apocalypse? *Trends Microbiol* 1996; 4: 371-2.
2. Baquero F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updates* 2001, 4: 93-105.
3. Bishai W. The *in vivo*-*in vitro* paradox in pneumococcal respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 433-6.
4. Björkman J, Andersson DI. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updates* 2000; 3: 237-45.
5. Chabbert YA. Why a National Committee? *Clin Microbiol Infect* 1996; 2, Suppl 1: 1-2.
6. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-5.
7. Courvalin P. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 855-69.
8. Degener JE, Phillips I. Comparison of antimicrobial susceptibility test breakpoints of national societies. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 51-4.
9. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 570-2.
10. Facinelli B, Spinaci C, Magi G, Giovanetti E, Varaldo PE. Association between erythromycin resistance and ability to enter human respiratory cells in group A streptococci. *Lancet* 2001, 358: 30-3.
11. Farr BM, Salgado CD, Karchmer TB, Sherertz RJ. Can antibiotic-resistant nosocomial infections be

- controlled? *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 38-45.
12. Ferraro MJ. Should we reevaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis* 2001; 33, Suppl 3: 227-9.
  13. Greenwood D. *In vitro veritas?* Antimicrobial susceptibility tests and their clinical relevance. *J Infect Dis* 1981; 144: 380-5.
  14. Greenwood G. Tarnished gold: sixty years of antimicrobial drug use and misuse. *J Med Microbiol* 1995; 43: 395-6.
  15. Jaroff L. Counterattack: how drugmakers are fighting back. *Time* 1994, September 12th, 54.
  16. Koshland DE Jr. The microbial wars. *Science* 1992; 257: 1021.
  17. Krause RM. The origin of plagues: old and new. *Science* 1992; 257: 1073-8.
  18. Kunin CM. Resistance to antimicrobial drugs - a worldwide calamity. *Ann Intern Med* 1993; 118: 557-61.
  19. Leegaard TM, Caugant DA, Frøholm LO, Høiby EA. Apparent differences in antimicrobial susceptibility as a consequence of national guidelines. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 290-3.
  20. Levy SB. Balancing the drug-resistance equation. *Trends Microbiol* 1994; 2: 341-2.
  21. Levy SB. *The antibiotic paradox*. Perseus Books 2002. Reading, MA, USA.
  22. Low DE. The era of antimicrobial resistance - implications for the clinical laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8, Suppl 3: 9-20.
  23. Musher DM, Bartlett JG, Doern GV. A fresh look at the definition of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2538-44.
  24. Phillips I. Reevaluation of antibiotic breakpoints. *Clin Infect Dis* 2001; 33, Suppl 3: 230-2.
  25. Phillips I. Resistance as a cause of treatment failure. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18, Suppl C: 255-60.
  26. Phillips I. The subtleties of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 5-12.
  27. Ripa S, Zampaloni C, Vitali LA, et al. SmaI macrorestriction analysis of Italian isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and correlations with macrolide-resistance phenotypes. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 65-71.
  28. Sanders CC. A problem with antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* 1991; 57: 187-90.
  29. Schrag SJ, Perrot V. Reducing antibiotic resistance. *Nature* 1996; 381: 120-1.
  30. Shlaes DM. Vancomycin-resistant bacteria. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13: 193-4.
  31. Spratt BG. Antibiotic resistance: counting the cost. *Curr Biol* 1996; 6: 1219-21.
  32. Sundsfjord A, Simonsen S, Courvalin P. Human infection caused by glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp.: are they a zoonosis? *Clin Microbiol Infect* 2001; 7, Suppl 4: 16-33.
  33. Tabaqchali S. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: apocalypse now? *Lancet* 1997; 350: 1644-5.
  34. Travis J. Reviving the antibiotic miracle. *Science* 1994; 264: 360-2.
  35. Varaldo PE, Debbia EA, Nicoletti G, et al. Nationwide survey in Italy of treatment of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis in children: influence of macrolide resistance on clinical and microbiological outcomes. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 869-73.
  36. Walker RD, Thornsberry C. Decrease in antibiotic susceptibility or increase in resistance? *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 1-4.
  37. Wise R. Science, medicine, and the future: the development of new antimicrobial agents. *Br Med J* 1998; 317: 643-4.

**Pietro E. Varaldo**

Via Ranieri, Monte d'Ago

60131 Ancona

Tel.: +39 071 2204694; Fax: +39 071 2204693

E-mail: [pe.varaldo@unian.it](mailto:pe.varaldo@unian.it)