



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO

**LE RESISTENZE ANTIBIOTICHE SECONDARIE
DELL'HELICOBACTER PYLORI DOPO UNO O PIU'
TENTATIVI DI ERADICAZIONE FALLITI: UN'ANALISI
GENOTIPICA DELLE FECI**

Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

Dipartimento di Medicina di Precisione e
Rigenerativa e Area jonica (DiMePre-J)

Dottorato in Trapianti di Tessuti ed Organi e Terapie
Cellulari
XXXVII ciclo

Tutor: Prof. Alfredo Di Leo

Dottoranda: Francesca Celiberto

Co-tutor: Prof. Giuseppe Losurdo

**LE RESISTENZE ANTIBIOTICHE SECONDARIE
DELL'*HELICOBACTER PYLORI* DOPO UNO O PIU' TENTATIVI DI
ERADICAZIONE FALLITI: UN'ANALISI GENOTIPICA DELLE FECI**

1 INDICE

Capitolo 1 INTRODUZIONE	2
La resistenza antimicrobica	2
Capitolo 2 L'<i>HELICOBACTER PYLORI</i>	5
Caratteristiche generali	5
L'enzima ureasi	5
Lo stato VBNC di <i>H. pylori</i>	6
Meccanismi patogenici di infezione	8
Conseguenze patologiche dell'infezione da <i>H. pylori</i>	9
Diagnosi	10
Capitolo 3 SUSCETTIBILITA' ANTIBIOTICA	13
Resistenza e sensibilità antimicrobica	13
Valutazione della suscettibilità antibiotica	14
Capitolo 4 TERAPIE DI ERADICAZIONE	18
Molecole antibiotiche	18
I beta-lattamici	18
I fluorochinoloni	19
I macrolidi	19
I nitroimidazoli	20
Le tetracicline	20
Le rifamicine	20
Terapie di eradicazione	21
Capitolo 5 RESISTENZE ANTIBIOTICHE IN <i>H. PYLORI</i>	26
Mutazioni puntiformi associate alla resistenza antibiotica in <i>H. pylori</i>	26
Resistenze antibiotiche e azione dei farmaci	28

Identificazione delle resistenze antibiotiche	29
La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)	31
La nested PCR	34
La RT-PCR	34
La Real Time PCR	35
Pro e contro delle tecniche di biologia molecolare	35
ClariRes Assay	37
VIASURE Detection Kit	37
<i>H. pylori</i> and multi-antibiotic resistance real time PCR kit	38
Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS)	39
Capitolo 6 PARTE SPERIMENTALE	40
Obiettivi dello studio	40
Materiali e metodi	40
Risultati	44
Discussione	47
Conclusioni	51
BIBLIOGRAFIA	53

**LE RESISTENZE ANTIBIOTICHE SECONDARIE
DELL'HELICOBACTER PYLORI DOPO UNO O PIU'
TENTATIVI DI ERADICAZIONE FALLITI: UN'ANALISI
GENOTIPICA DELLE FECI**

Capitolo 1

INTRODUZIONE

La resistenza antimicrobica

Gli antimicrobici – comprensivi di antibiotici, antivirali, antifungini e antiparassitari – sono farmaci usati per prevenire e curare malattie infettive umane, animali e vegetali. La Resistenza Antimicrobica (AMR) si ha nel momento in cui batteri, virus, funghi e parassiti non rispondono correttamente a tali farmaci. In funzione di ciò, gli antibiotici e gli altri farmaci antimicrobici divengono inefficaci, generando un significativo aggravarsi delle infezioni ed un incremento della loro diffusione [1].

L'AMR è un processo naturale che si verifica quando, nel tempo, intervengono modifiche genetiche nei patogeni. Esso può essere incoraggiato dall'attività umana, per via dell'uso scorretto ed eccessivo di farmaci antimicrobici. L'AMR ha costi significativi sia per l'economia nazionale che per il sistema sanitario: si viene a creare richiesta di cure più costose, mettendo alla prova la produttività dei pazienti e dei loro caregiver in caso di prolungata degenza in ospedale; inoltre, viene coinvolta da questo fenomeno anche la produzione agricola. La resistenza antimicrobica è uno dei principali pericoli per la salute pubblica: è stato stimato che l'AMR è stata direttamente responsabile per 1.27 milioni di morti a livello mondiale, nel 2019 e ha contribuito alla morte di altre 4.95 milioni di persone. L'utilizzo improprio degli antimicrobici è il principale fattore di sviluppo di patogeni farmaco-resistenti. Altri fattori contribuenti sono rappresentati da carenza di acqua potabile; insufficiente igiene in esseri umani ed animali; cattiva gestione della prevenzione e dei controlli sanitari nelle case e sui luoghi di lavoro; impossibilità di accesso

economico a vaccini, strumenti diagnostici e farmaci; insufficiente livello di informazione; e legislazione inadatta o mancante [1].

La crescita globale delle resistenze antibiotiche è alla base dell'inefficacia degli antibiotici usati per le infezioni batteriche più comuni. I dati riportati in 76 paesi del 42% di *Escherichia coli* (*E. coli*) resistente alla terza generazione di cefalosporine e del 35% per lo stafilococco resistente alla meticillina. Per le infezioni del tratto urinario causate da *E. coli*, nel 2020, 1 caso su 5 ha mostrato una ridotta suscettibilità agli antibiotici standard (ampicillina, cotrimoxazolo e fluorochinoloni) [1].

E' complesso fare una stima dell'esatto impatto economico delle infezioni resistenti ai batteri, a livello globale. La resistenza antibiotica rappresenta un considerevole fardello economico per l'intero mondo: negli USA, ad esempio, le infezioni ospedaliere associate a patogeni antibiotico-resistenti sono la causa di 99000 morti all'anno. Le attuali stime relative ai costi delle resistenze antibiotiche hanno una portata limitata e non considerano l'ampio valore sociale degli antibiotici. Questi sono fattori che conducono ad una inaccuratezza nella stima dell'impatto che l'antibiotico-resistenza ha sull'economia mondiale. Al fine di migliorare tale condizione, gli studi futuri avrebbero bisogno di applicare metodi di macroeconomia, considerando tutti gli effetti che la crescente antibiotico-resistenza ha, specialmente la riduzione dell'efficacia degli antibiotici nella medicina moderna. Purtroppo, fino al momento in cui non saranno state risolte tali problematiche, l'esatta stima dell'impatto globale relativo all'antibiotico-resistenza non potrà essere calcolata in modo esaustivo [1].

Gli sforzi per ridurre la richiesta di antimicrobici puntano alla riduzione del loro utilizzo, per mezzo sia di vaccinazioni e misure sanitarie atte a diminuire l'incidenza delle infezioni; di educazione e regolazione legislativa

per le misure mediche e veterinarie, promuovendo il rispetto delle prescrizioni farmaceutiche (ed i relativi sforzi volti allo sviluppo di tecniche diagnostiche a sostegno di terapie mirate) e la riduzione al ricorso di antibiotici nel settore agroalimentare [2, 3, 4, 5].

Le problematiche collegate alla resistenza antibiotica hanno il potere di catalizzare gli sforzi, puntando il focus sulla sanificazione delle strutture nel quotidiano, sul bisogno di sorveglianza globale contro l'emergenza di infezioni più in generale ed infine, sui processi di prevenzione guidati da una buona pratica medica e veterinaria [5].

Capitolo 2

L'HELICOBACTER PYLORI

Caratteristiche generali

L'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) è un batterio Gram negativo che colonizza lo stomaco umano, rappresentando la causa più comune di disturbi gastrici come gastrite cronica attiva, ulcera peptica, adenocarcinoma, linfoma della zona marginale extranodale (MALT) ed anche manifestazioni extra gastriche [6] quali anemia, carenza di ferro, carenza di vitamina B12 e porpora trombocitopenica immune. Inoltre, *H. pylori* svolge un ruolo centrale nel generare condizioni precancerose (gastrite atrofica e metaplasia intestinale), che possono evolvere in adenocarcinoma gastrico [7].

Come tanti microrganismi, *H. pylori* è capace di modificare la sua morfologia allo scopo di sopravvivere a condizioni avverse (antibiotici, temperatura, pH e aumento di ossigeno) [6].

L'enzima ureasi

La tolleranza dell'*H. pylori* all'acidità dello stomaco è per gran parte dipendente dall'attività dell'ureasi, un metalloenzima citoplasmatico multisubunità ad alto peso molecolare [8, 9]. L'ureasi (enzima appartenente alla categoria delle idrolasi) catalizza l'idrolisi dell'urea, portando ad ammoniaca e carbammato. Quest'ultimo si decompone spontaneamente in una seconda molecola di ammoniaca ed acido carbonico. L'effetto finale di tale reazione è un aumento del pH a livello gastrico [9].

L'accesso dell'urea all'enzima è permesso, in condizioni di elevata acidità, dall'apertura di un poro *H⁺-gated (UreI)*: l'urea, in questo modo, dall'esterno della cellula, raggiunge lo spazio citoplasmatico e viene idrolizzata [8]. Più precisamente, l'urea è legata al sito enzimatico *His-221*, in coordinazione con uno ione nickel. Di conseguenza, il residuo proteico *His-322* attiva una molecola di acqua legata ad un secondo ione nickel. L'attacco dell'idrossido generatosi, all'atomo di carbonio del substrato porta alla formazione di un intermedio di reazione che si lega ai due siti del nickel. In ultimo, viene trasferito un protone all'intermedio di reazione che aiuta il rilascio di ammoniaca, mentre l'acqua rimuove un carbammato per completare il ciclo [9].

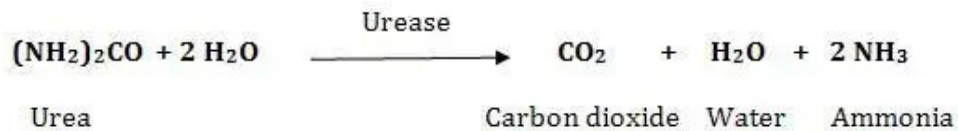


Figura 1. Schema della reazione catalizzata dall'enzima ureasi [10].

L'ureasi diviene attiva a pH acido. L'ammoniaca prodotta diffonde nello stomaco, dove è ionizzata ed intrappolata nel lume gastrico; mentre l'anidride carbonica raggiunge il circolo sanguigno e viene, infine, espirata [8].

Lo stato VBNC di *H. pylori*

La sopravvivenza del batterio *H. pylori* ad avverse condizioni avviene anche grazie alla sua capacità di entrare in uno stato detto “*Viable But Not Culturable*” (VBNC): si tratta di uno stato inattivo, indotto da situazioni di stress. Tale condizione è caratterizzata da un *blackout* metabolico e da un

abbandono della classica forma a spirale, indispensabile alla penetrazione del denso muco che ricopre la parete gastrica. Così, il batterio assume una forma coccoide e, pur passando ad un'attività metabolica minima, riesce a preservare i suoi fattori di virulenza: gli organismi in stato di VBNC esprimono i loro geni a bassi livelli e non possono essere coltivati usando tecniche di coltura convenzionali. Il batterio in fase inattiva è identificato dal termine “dormiente”: a questo stadio, le cellule del microrganismo mostrano una bassa attività metabolica e bloccano la replicazione per un lungo periodo, incrementando le probabilità di sopravvivenza dell'organismo. La capacità di *H. pylori* di entrare in stato dormiente ha implicazioni epidemiologiche e può essere considerata potenzialmente capace di diffusione e reinfezione batterica: difatti, nonostante questa condizione ibernata, i batteri mantengono una bassa attività ureasica [6].

Lo stato VBNC potrebbe rappresentare un ostacolo all'eradicazione di *H. pylori*. Il batterio, infatti, può rimanere in fase dormiente per più di un anno e, quando le condizioni mutano favorevolmente, è in grado di riprendere la forma a spirale, riattivando il metabolismo e divenendo nuovamente coltivabile. Alcuni studi hanno mostrato, inoltre, che la forma coccoide esprime tutti i geni di maggior virulenza (*ureA*, *ureB*, *hpaA*, *vacA*, *cagA*, *cagE*, *BabA*). In tale stadio, *H. pylori*, va ad invadere l'epitelio gastrico, aderendo ad esso, mediante l'inclusione in vescicole con membrana di *bilayer* lipidico. In conseguenza di ciò, le cellule gastriche divengono più vulnerabili e si raggiunge progressivamente l'erosione dello strato mucoso [6].

Meccanismi patogenici di infezione

L'infezione da *H. pylori* è coadiuvata sia da fattori derivanti dal microorganismo che da fattori ambientali e dell'ospite. Riguardo a questi ultimi, troviamo l'Interleuchina 8 (IL-8), una citochina coinvolta nel processo infiammatorio. Essa viene secreta dalle cellule epiteliali gastriche, attirando, in tal modo, verso il sito infiammatorio le cellule immunitarie (macrofagi, mastociti, linfociti e neutrofili). Queste ultime vanno ad amplificare la risposta immunitaria, producendo altri mediatori dell'infiammazione (Interferone γ ed α o Interleuchina 8). I granulociti neutrofili dell'ospite, coinvolti dall'infezione batterica, andranno incontro anche al fenomeno del burst ossidativo, causato dal rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come risposta alla situazione di stress. La conseguenza è un danno agli acidi nucleici delle cellule gastriche, con annesso danno tissutale. In risposta a ciò, lo stomaco diminuisce la secrezione acida, favorendo la diffusione di *H. pylori* ed altri microrganismi, generando, un aumento dell'infiammazione a livello locale [11].

Come detto in precedenza, esistono anche fattori ambientali che possono facilitare l'infezione da *H. pylori*: tra questi troviamo il fumo di sigaretta e le diete poco equilibrate, povere di antiossidanti e fibre (elementi noti per prevenire la carcinogenesi) [11].

Infine, i fattori propri del microorganismo sono fondamentali per l'instaurarsi dell'infezione gastrica. La motilità del batterio è garantita dai flagelli, i quali gli permettono di penetrare nello strato di muco dell'epitelio gastrico. La morfologia dell'*H. pylori*, inoltre, con la sua forma elicoidale, gli facilita tale compito. Il processo è promosso anche da diverse proteasi e fosfolipasi, che l'*H. pylori* utilizza per depolimerizzare le molecole di

muco, e dalle adesine di superficie, proteine che gli consentono di aderire alla superficie della mucosa [12].

Il batterio presenta un'attività citolesiva garantita dalla presenza di catalasi, superossido dismutasi, proteasi e citotossine come CagA (ad azione citotossica diretta) e VacA (ad azione vacuolizzante diretta). Le proteine associate alla virulenza CagA e VacA sono i due fattori maggiormente studiati, in quanto strettamente coinvolti nell'apoptosi delle cellule epiteliali. In particolare, la citotossina A vacuolizzante (VacA) è una tossina proteica oligomerica che forma canali anionici nella membrana cellulare, i cui effetti sulle cellule includono: la formazione di grandi vacuoli intracellulari derivati da endosomi tardivi; l'induzione della morte cellulare apoptotica (a seguito della perturbazione della membrana mitocondriale) o necrosi; l'attivazione dell'autofagia e l'inibizione della proliferazione delle cellule T e B. Complessivamente, questi fattori riducono le risposte immunitarie contro *H. pylori* e favoriscono la tolleranza dell'ospite nei confronti del batterio [12].

Conseguenze patologiche dell'infezione da *H. pylori*

La colonizzazione della mucosa gastrica da parte di *H. pylori* scatena una risposta infiammatoria nelle cellule epiteliali dello stomaco, che recluta diverse cellule immunitarie nella sottomucosa. Questo porta a una gastrite cronica-attiva, per lo più asintomatica in grado di persistere per decenni nel paziente. La gravità dell'infiammazione varia a seconda degli individui, essendo influenzata da fattori batterici, dell'ospite e ambientali. L'infiammazione cronica della mucosa gastrica innesca, con il tempo, l'atrofia gastrica ed infine può portare all'adenocarcinoma [13].

La sequenza di eventi che porta allo sviluppo del cancro è un processo multifattoriale e multistadio che inizia con la gastrite superficiale, progredisce verso la gastrite atrofica, la metaplasia intestinale e la displasia, e culmina in adenocarcinoma gastrico. In particolare, l'infiammazione cronica, l'atrofia gastrica e l'acloridria conseguente, portano ad alterazioni del microbioma gastrico, causando la neoplasia [14, 15, 16].

Esse, una volta provocate dall'infezione da *H. pylori*, hanno luogo nello stomaco distale (antro) e successivamente si estendono alla mucosa prossimale (fundica). Al contrario, la gastrite autoimmune (AIG) è per definizione limitata alla mucosa ossintica (fondo e corpo dello stomaco) [17].

L'*H. pylori* induce una gastrite cronica caratterizzata dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno, predisponenti all'infiammazione. In questi soggetti, l'infiammazione cronica continua finisce con il danneggiare le cellule parietali, responsabili della produzione di acido gastrico. La conseguente ipocloridria facilita la colonizzazione della mucosa gastrica da parte del batterio, che innesca la produzione di ulteriori metaboliti pro-infiammatori e cancerogeni. Questi ultimi possono agire direttamente sulle cellule epiteliali gastriche, inducendone la transizione in cellule maligne [18, 19, 20].

Diagnosi

Esistono due modalità con cui poter effettuare la diagnosi di *H. pylori*: i metodi invasivi e quelli non-invasivi [21].

Le tecniche invasive partono tutte dalla biopsia di tessuto, che potrà essere analizzato mediante esame istologico, coltura, Test Rapido dell'Ureasi (Rapid Urease Test – RUT) o tecniche di biologia molecolare. E' stato

dimostrato che i test diagnostici basati su campione tissutale gastrico, possono essere affetti da errore indotto da differenti fattori, quali il sito, il numero e le dimensioni del frammento bioptico [21].

L'istologia rappresenta l'unica possibilità di ottenere informazioni riguardanti la presenza di *H. pylori*, lo stato di infiammazione e le caratteristiche della mucosa gastrica. Il microrganismo può essere intercettato mediante una colorazione Giemsa oppure tramite un trattamento con anticorpi monoclonali che si legano specificamente al ceppo batterico [21].

Il RUT è un test indiretto della presenza di *H. pylori*, basato sul rilevamento di ureasi nella mucosa gastrica. L'esame consiste nel prelevare un campione di mucosa dall'antro dello stomaco e posizionarlo in un medium di coltura dove è presente urea, inducendo la reazione di idrolisi dell'urea da parte dell'enzima batterico ureasi, ottenendo in questo modo ammoniaca o diossido di carbonio. Si tratta di un test colorimetrico: viene sfruttata la proprietà del rosso fenolo, un indicatore di pH, il quale vira dal colore rosso verso il giallo nel momento in cui si verifica un aumento di pH. Tale situazione si riscontra nel momento in cui l'ureasi batterica è attiva ed idrolizza l'urea, presente nel mezzo, in CO₂ [22].

Tra le tecniche diagnostiche non invasive, troviamo l'Urea Breath Test (UBT), il test sierologico e la ricerca del batterio nel materiale fecale. Tali tecniche consentono di identificare una infezione da *H. pylori* senza rischi di complicazioni e procedure sgradevoli per il paziente. Esse sono indicate per monitorare l'eradicazione del batterio, o come prima battuta diagnostica prima di passare a test più invasivi. Infine, sono tecniche consigliate per i pazienti che non possono affrontare un'endoscopia (per esempio, donne incinte, bambini o persone con particolari patologie) [21].

L'UBT è uno dei metodi diagnostici più accurati: si tratta di una tecnica semplice, non invasiva e facilmente ripetibile. Il principio dell'UBT è correlato alla capacità del batterio di idrolizzare una soluzione di urea marcata (con ^{14}C o ^{13}C), somministrata oralmente al paziente, che porterà alla produzione di CO_2 marcata a sua volta. La CO_2 diffonde nel circolo sanguigno, viene escreta dai polmoni ed infine esalata con la respirazione. La misurazione dei livelli di CO_2 che, oltre a rilevare la presenza di *H. pylori*, forniscono anche informazioni sulla carica batterica, avviene mediante spettrometria di massa [23].

Infine, il test sierologico, è un esempio di tecnica diagnostica non invasiva che non identifica un'infezione attiva, bensì rileva anticorpi contro l'*H. pylori* presenti nel sangue. Il test dà informazioni su una eventuale presenza del batterio nel passato. Essa può essere basata su tecniche immunoistochimiche quali l'ELISA o il Western Blot [21].

Capitolo 3

SUSCETTIBILITA' ANTIBIOTICA

L'uso dei farmaci antibatterici nel trattamento delle infezioni è condizionato dal rapporto fra sensibilità del patogeno e la concentrazione che il farmaco raggiunge nella sede d'infezione [24].

Per una corretta terapia antibiotica è necessario conoscere, oltre alla specie batterica isolata, anche la sua sensibilità agli antibiotici. Per questo motivo è importante, mediante l'esecuzione di un antibiogramma, valutare in vitro il profilo di suscettibilità agli antibiotici di un ceppo batterico al fine di ottenere dati che guidino alla scelta dell'antibiotico più adeguato alla terapia. L'importanza dell'antibiogramma deriva dal principio per cui la sensibilità o la resistenza mostrate *in vitro* da un batterio nei confronti di un antibiotico prefigurano l'efficacia o meno della terapia antibiotica in vivo [25].

Resistenza e sensibilità antimicrobica

Da un punto di vista prettamente biologico, i termini “resistente” e “sensibile” possono essere usati per esprimere la capacità o meno di un microrganismo di moltiplicarsi in presenza di una data concentrazione di antibiotico. Nell'ambito della stessa popolazione batterica, tuttavia, alcuni batteri possono risultare resistenti all'antibiotico, mentre altri risultano sensibili alla stessa concentrazione. Un ceppo batterico può, pertanto, essere definito sensibile ad un antibiotico se la maggior parte della popolazione batterica è inibita da tale concentrazione [26].

Nella pratica, il grado di sensibilità di un germe nei confronti di un antibiotico viene spesso definito quantitativamente in termini di Concentrazione Minima Inibente (MIC) ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico, in un range di diluizioni, che permette la completa inibizione della crescita batterica [27, 25]. Generalmente, gli antibiotici inibiscono la replicazione batterica per un tempo abbastanza lungo così da permettere all'ospite di rimuovere il microorganismo infettante dalla sede d'infezione mediante i meccanismi naturali di difesa. Nel caso in cui tali meccanismi siano compromessi o non funzionino in maniera ottimale, l'infezione potrebbe non essere influenzata dalla terapia o rispondere temporaneamente ma ricomparire dopo la sua sospensione. Se i meccanismi cellulari o umorali di difesa sono compromessi, infatti, anche infezioni sostenute da microrganismi sensibili ad un antibiotico non rispondono in maniera efficace al trattamento. In casi come questo è più opportuno valutare la Concentrazione Minima Battericida (MBC) ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di uccidere il 99,9% della popolazione batterica iniziale [25].

Valutazione della suscettibilità antibiotica

Per una corretta valutazione della sensibilità di un antibiotico, oltre all'esecuzione dell'antibiogramma è necessario prendere in considerazione diversi fattori: 1) lo stato fisiopatologico del paziente (stato immunitario, sede e tipo di infezione); 2) le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche dell'antibiotico (tossicità, legame con le proteine, assorbimento, eliminazione, ecc.); 3) la concentrazione raggiunta dal farmaco nella sede d'infezione; 4) la natura e la gravità dell'infezione. Questi ed altri fattori non possono essere valutati con l'antibiogramma ma

devono essere presi in considerazione al momento della interpretazione dei risultati per la scelta della terapia farmacologia più appropriata [26].

I metodi attualmente utilizzati per la valutazione della suscettibilità antibiotica sono il metodo delle diluizioni e quello della diffusione [26].

Il primo metodo può essere eseguito sia in terreni liquidi (brodo-diluizione) sia in terreni solidi (agar-diluizione). Nella brodo-diluizione vengono eseguite diluizioni scalari dell'antibiotico in esame in serie di colture inoculate con una quantità standard di sospensione batterica. Dopo un'adeguata incubazione delle brodocolture a 37°C per 16–18 ore, si osserva la presenza o meno di intorbidimento, che indica la presenza di replicazione batterica. La MIC, ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico necessaria ad inibire la crescita batterica, viene valutata come assenza di torbidità [28]. Con questa tecnica, inoltre, è possibile determinare la MCB, allestendo colture su terreno solido a partire dalle brodocolture prive di crescita batterica. In questo caso la MBC è data dalla più bassa concentrazione di antibiotico che ha determinato la morte dei microrganismi presenti nella coltura, testimoniata dal mancato di sviluppo di colonie batteriche [29]. In questo caso la MIC è la minor concentrazione di antibiotico in grado di inibire la replicazione del 99% delle cellule batteriche piastrate e valutate come numero di CFU (Unità Formanti Colonia), determinando assenza di colonie sulla piastra. La seconda metodologia, la diffusione, si basa sul principio per cui un antibiotico diffonde in modo tridimensionale sulla superficie di un terreno solido sul quale cresce un ceppo batterico, creando una zona di agar in cui non si avrà sviluppo batterico ma un'area di inibizione. In tale area l'antibiotico raggiunge un gradiente di concentrazione superiore o uguale alla MIC, sufficiente quindi ad inibire la replicazione batterica [30]. La

formazione dell'area di inibizione è, pertanto, la risultante di due eventi dinamici contemporanei: la diffusione dell'antibiotico nell'agar e la crescita batterica. In base alla grandezza del diametro dell'alone di inibizione un ceppo batterico viene definito, rispetto ad un antibiotico, sensibile, moderatamente sensibile (intermedio), o resistente. Nel metodo della diffusione, l'antibiotico può essere posto in pozzetti scavati nello spessore dell'agar o, nella maggior parte dei casi, essere applicato sulla superficie dell'agar mediante dischetti di carta da filtro imbevuti con l'antibiotico [31].



Figura 2.

Coltura di *H. pylori* da campione biologico di feci umane. Colonie di *H. pylori* in un *medium* selettivo *Brucella Blood Agar (BBA)* [32].

Negli ultimi anni c'è stata una sempre maggior diffusione di sistemi automatizzati o semi-automatizzati per l'esecuzione dell'antibiogramma. Con il passare del tempo, si è reso necessario svolgere le operazioni in condizioni standardizzate, definendo meglio i limiti di prestazione dei terreni di crescita, delle condizioni di incubazione, delle concentrazioni degli inoculi batterici e di quelle degli antibiotici presenti nei dischetti usati per i test di diffusione, e dei parametri per i controlli di qualità [26]. Esistono strumentazioni in grado di leggere automaticamente i risultati degli antibiogrammi, utili sia per le prove di diffusione su piastra sia per la determinazione delle MIC nelle prove di diluizione. Ciò ha portato allo sviluppo di tecnologie sempre più sofisticate in grado di automatizzare i singoli passaggi, dalla preparazione degli inoculi batterici all'allestimento dei pannelli fino alla lettura e all'interpretazione dei risultati. Tali tecnologie sono presenti, oggi, in molti laboratori poiché presentano il vantaggio di fornire risultati rapidi ed aumentare, di conseguenza, il numero di campioni da analizzare [26].

Capitolo 4

TERAPIE DI ERADICAZIONE

La dispepsia è la principale indicazione per l'eradicazione dell'*H. pylori*. Il trattamento può ridurre i sintomi, minimizzare il rischio di gravi complicazioni dell'infezione e ridurre il rischio di cancro gastrico [33]. Le linee guida di riferimento sono quelle di Maastricht VI secondo cui nella scelta della terapia iniziale è importante considerare una storia di allergia alla penicillina, la disponibilità di test di sensibilità, la prevalenza locale di resistenza agli antibiotici e la storia di precedenti terapie di eradicazione. La terapia contro *H. pylori* prevede l'utilizzo di una combinazione di diversi antibiotici. I regimi terapeutici più utilizzati sono la terapia sequenziale, concomitante, tripla e quadrupla con bismuto (BQT) [34].

Molecole antibiotiche

E' possibile dare uno sguardo più ravvicinato alle molecole antibiotiche più utilizzate nel trattamento dell'infezione da *H. pylori* [35].

I β -lattamici

Tra i β -lattamici, l'amoxicillina è la più utilizzata: dal momento in cui essa entra nel circolo sanguigno e raggiunge prima il succo e successivamente la mucosa gastrica, svolgerà la sua attività nel lume. Inoltre, come ausilio all'azione di questa molecola, viene prescritta una dose elevata di inibitori di pompa protonica (PPI). L'amoxicillina si lega alle proteine leganti la penicillina (PBP) nello spazio periplasmatico, interferendo con l'attività transpeptidasica necessaria per il cross-linking delle molecole nascenti di peptidoglicano. Questo processo compromette la stabilità meccanica della parete cellulare batterica, portando alla perdita di vitalità e alla lisi dei batteri durante la replicazione [35].

Nel complesso, la resistenza dei batteri Gram-negativi ai β -lattamici è dovuta principalmente alla produzione di β -lattamasi, alla ridotta penetrazione del farmaco nel sito bersaglio, alle alterazioni nei siti PBP e ai meccanismi di efflusso [36, 37].

I fluorochinoloni

I fluorochinoloni rappresentano un'altra categoria di molecole utilizzati nella terapia contro *H. pylori*. Essi agiscono meglio in condizioni di pH acido, divenendo efficaci a livello dello stomaco. In particolare, la loro farmacocinetica consiste nell'essere protonati, a basso pH, e disciolti nel succo gastrico. Successivamente saranno, assorbiti a livello dell'intestino [38].

I fluorochinoloni sono in grado di inibire due topoisomerasi batteriche: la DNA girasi e la topoisomerasi IV, indispensabili per il superavvolgimento del DNA durante la replicazione e la trascrizione. La molecola appartenente a questa categoria di antibiotici più utilizzata contro *H. pylori* è la levofloxacina [39].

I macrolidi

Oltre alla levofloxacina, importante è l'antibiotico claritromicina, appartenente alla classe dei macrolidi. I macrolidi sono batteriostatici che bloccano la sintesi proteica del microorganismo, stabilendo un legame reversibile al dominio V della peptidiltrasferasi delle molecole di rRNA 23S della subunità ribosomiale batterica 50S [39].

I macrolidi (es. claritromicina) esercitano un effetto batteriostatico interferendo con la sintesi proteica, legandosi reversibilmente al ciclo della peptidil transferasi nel dominio V delle molecole di RNA ribosomiale (rRNA) 23S nella subunità ribosomiale batterica 50S [40].

I nitroimidazoli

Il metronidazolo, appartenente al gruppo dei nitroimidazoli, viene rilasciato attivamente nel succo gastrico e la sua attività antimicrobica è solo marginalmente influenzata dal basso pH. Essendo un profarmaco (molecola inattiva), il metronidazolo subisce un'attivazione mediata dagli accettori di elettroni cellulari. Tra tutte le flavoproteine identificate come presunti accettori di elettroni nell'*H. pylori*, la NAD(P)H nitroreduktasi (RdxA) insensibile all'ossigeno sembra essere il diretto responsabile dell'attivazione del farmaco [41 – 45].

L'attivazione del metronidazolo produce derivati transitori, come i radicali liberi nitro-anionici, che mostrano proprietà citotossiche: le strutture cellulari ed il DNA del batterio subiscono danni diretti, per mezzo dell'inibizione della forza motrice protonica che porta alla riduzione di ATP cellulare [42].

Le tetracicline

Le tetracicline sono molecole stabili anche a basso pH e agiscono contro l'*H. pylori*, raggiungendo alte concentrazioni nel succo gastrico e nella mucosa. Si legano reversibilmente a una tasca dell'rRNA 16S nella subunità 30S dei ribosomi batterici, causando effetti batteriostatici e battericidi tramite l'inibizione della sintesi proteica e della crescita batterica [46].

Le rifamicine

Le rifamicine, come la rifampicina e la rifabutina, sono antibiotici battericidi che agiscono legandosi alla subunità β della RNA polimerasi DNA-dipendente batterica. Nello specifico questa classe di molecole

agisce su diverse specie batteriche, inibendo l'allungamento della catena di RNA nelle fasi iniziali della trascrizione.

Le rifamicine, in particolare la rifabutina, sono state sempre più utilizzate nelle terapie di salvataggio dopo il fallimento dei trattamenti iniziali per l'infezione da *H. pylori*. Il farmaco è chimicamente stabile in un ampio intervallo di pH e la sua attività antibatterica probabilmente non è ostacolata dall'ambiente acido dello stomaco [46].

Terapie di eradicazione

La terapia di eradicazione per l'infezione da *H. pylori* prevede la combinazione di antiacidi con due o più antibiotici [47]. Fino a poco tempo fa, la claritromicina era l'antibiotico utilizzato come prima linea contro *H. pylori*. Si tratta di una molecola in grado di inibire la biosintesi proteica, legandosi ai ribosomi batterici. Una seconda terapia coinvolge l'utilizzo del fluorochinolone levofloxacina, antibiotico che interferisce con la replicazione del DNA del batterio [49].

Secondo le linee guida attuali, la terapia quadrupla contenente bismuto (BQT) o la terapia concomitante (CT) sono indicate come terapie di prima linea in aree a elevata resistenza alla claritromicina. La terapia quadrupla consiste in una combinazione di metronidazolo, tetraciclina e bismuto subcitrato, associati ad un inibitore di pompa protonica (PPI). La CT, invece, prevede amoxicillina, claritromicina e metronidazolo da assumere assieme ad un inibitore di pompa protonica [48]. La terapia quadrupla contenente bismuto, conosciuta comunemente come Pylera™, presenta un'efficacia di eradicazione del 90% [49] ed ha una durata di trattamento di 14 giorni. I sali di bismuto, oltre ad essere degli efficaci battericidi, hanno proprietà benefiche per la guarigione di ulcera peptica, inattivando

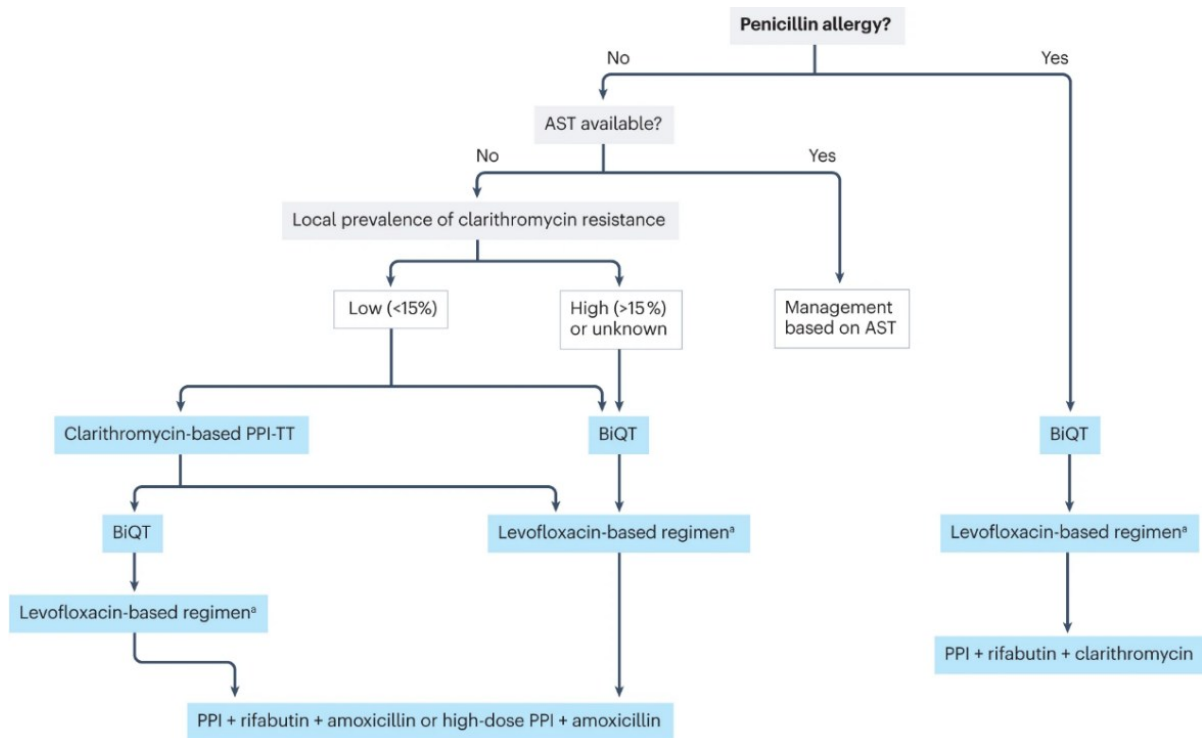
la pepsina, stimolando la sintesi delle prostaglandine e legandosi agli acidi biliari. Il subcitrato di bismuto regola positivamente l'espressione dei geni coinvolti nella crescita e nel metabolismo dell'*H. pylori* e impedisce l'ingresso dei protoni, prevenendo così l'abbassamento del pH citoplasmatico batterico. Si ritiene che questi meccanismi migliorino l'efficacia degli antibiotici [50]. La terapia quadrupla a base di bismuto è indicata nel trattamento di prima linea per le aree con elevata (>15%) o sconosciuta resistenza alla claritromicina oppure, in alternativa, può essere presa in considerazione una terapia quadrupla concomitante senza bismuto [33]. Inoltre, la BQT è raccomandata come trattamento di prima linea nelle aree dove è presente un alto tasso di doppia resistenza a claritromicina e metronidazolo, in sostituzione all'inefficace terapia concomitante [52]. Un regime alternativo in caso di elevata prevalenza (>15%) della doppia resistenza è la doppia terapia con PPI ad alto dosaggio e amoxicillina o la tripla terapia con rifabutina. Infine, il trattamento BQT è indicato in prima linea nei pazienti con allergia alla penicillina, soprattutto nelle aree con elevata resistenza a claritromicina e metronidazolo [52].

Le terapie quadruplici non-BQT includono terapie sequenziali, concomitanti (PPI, amoxicillina, claritromicina e metronidazolo prescritti contemporaneamente) e ibride. Lo svantaggio di questi regimi terapeutici è che prevedono tutti un antibiotico non necessario, che potrebbe essere evitato se fosse noto il profilo di sensibilità del batterio. Tali trattamenti vengono considerati quando non sono disponibili test di sensibilità antimicrobica o la BQT. Le terapie non-BQT funzionano bene contro i ceppi sensibili di *H. pylori*: il loro vantaggio risiede nel trattamento di infezioni con profili di suscettibilità sconosciuti o provenienti da regioni

con tassi relativamente elevati (>15%) di resistenza alla claritromicina. Quando si confrontano i diversi regimi non-BQT, è importante considerare la *compliance* del paziente, gli eventi avversi e il successo dell'eradicazione. Le terapie sequenziali e ibride sono più complesse rispetto a quelle concomitanti, poiché richiedono un cambiamento nella terapia a metà del ciclo di trattamento. Questo può comportare un rischio di errori nella prescrizione o nella distribuzione del farmaco e ridurre la *compliance* del paziente. Il regime della terapia sequenziale è costituito da 5 giorni di duplice terapia con PPI e amoxicillina, seguito da 5 giorni di triplice terapia con PPI, claritromicina e metronidazolo. Mentre, la terapia concomitante è generalmente raccomandata con una durata di 14 giorni, a meno che le terapie da 10 giorni non si dimostrino efficaci a livello locale [52].

A concludere lo scenario delle terapie, è la tripla terapia (PPI-TT). Essa include un PPI, claritromicina e amoxicillina, oppure metronidazolo come sostituto dell'amoxicillina o della claritromicina. Sono presenti poche aree con bassa resistenza alla claritromicina, perciò, con poche eccezioni, in tutto il mondo la presenza di tale resistenza impedisce l'utilizzo empirico di triple terapie contenenti claritromicina, metronidazolo o un fluorochinolone. In aree a bassa resistenza alla claritromicina e in presenza di prove di efficacia confermate localmente (>90%), la tripla terapia può essere ancora raccomandata come trattamento di prima linea con una durata di 14 giorni [52]. Tuttavia, i fallimenti sono sempre più frequenti, principalmente a causa della resistenza antibiotica, dell'insufficiente soppressione acida e della scarsa aderenza ai farmaci [53]. La soppressione acida con inibitori di pompa protonica (PPI) consente di aumentare il pH intragastrico a 6 o a valori superiori, ottimizzando così la stabilità, la

biodisponibilità e l'efficacia degli antibiotici. Infatti, un pH intragastrico elevato permette la replicazione batterica, aumentando così la suscettibilità dell'*H. pylori* agli antibiotici. La risposta ai PPI è fortemente influenzata da polimorfismi nel citocromo 2C19 che modificano la capacità dei pazienti di metabolizzare il farmaco. Questi polimorfismi possono incidere sul tasso di successo della terapia di eradicazione ed è stato suggerito di utilizzare dosi più elevate di PPI nella tripla terapia, controllando adeguatamente il pH gastrico [54]. Gli inibitori di pompa protonica attualmente disponibili non riescono generalmente a garantire un livello di soppressione acida sufficiente durante tutto l'arco delle 24 ore. Il vonoprazan, un bloccante acido competitivo del potassio (P-CAB), è l'unico farmaco in grado di assicurare l'inibizione di lunga durata della secrezione di acido gastrico, anche durante le ore notturne [33]. I P-CAB agiscono rapidamente e offrono una soppressione acida prevedibile, divenendo, in tal modo, un promettente strumento per migliorare il trattamento dell'infezione da *H. pylori*, semplificando i regimi terapeutici più complessi e incoraggiando lo sviluppo di una terapia duale [55].



^aIndividual AST should be performed; levofloxacin-based regimen can be used if *H. pylori* is susceptible or community resistance is <15%; otherwise, use rescue therapy.

Figura 3. Diagramma che mostra le corrette modalità di utilizzo delle terapie contro *H. pylori*. AST= Test di Suscettibilità Antimicrobica; PPI = Inibitore di Pompa Protonica; PPI-TT =Triple Therapy; BQT = Terapia Quadrupla con Bismuto. [55]

Capitolo 5

RESISTENZE ANTIBIOTICHE IN *H. PYLORI*

La resistenza agli antibiotici standard, da parte dell'*H. pylori*, rappresenta un fenomeno in espansione nell'ultimo decennio. Essa porta ad una progressiva inefficienza delle terapie attuali e può essere divisa in tre tipologie: primaria, presente in soggetti che non hanno mai ricevuto una terapia contro *H. pylori*; secondaria, ovvero acquisita dopo uno o più trattamenti; etero resistenza, che si ha nel momento in cui coesistono nel medesimo soggetto un ceppo batterico suscettibile ed uno resistente [56].

La resistenza alla claritromicina, ad esempio, ha ridotto l'efficacia della terapia triplice sotto il 60%, mentre l'efficacia delle terapie a base di levofloxacina si è abbassata al di sotto dell'80%, a causa della resistenza di *H. pylori* a questa seconda molecola. Pertanto, il trattamento "perfetto" è ancora lontano dall'essere trovato. Tuttavia, l'utilizzo di un approccio basato sulla conoscenza della suscettibilità agli antibiotici sembrerebbe essere promettente. Una meta-analisi ha mostrato come i regimi guidati dalla suscettibilità antibiotica, siano più efficaci in prima linea, rispetto alle terapie empiriche standard di 7-10 giorni [57, 58].

Mutazioni puntiformi associate alla resistenza antibiotica in *H. pylori*

Le cause della resistenza sono da ricercare in mutazioni puntiformi presenti nel DNA batterico, le quali interferiscono con il meccanismo di azione dei diversi antibiotici [59]. Più nello specifico la resistenza dei batteri Gram-negativi alla classe molecolare dei macrolidi si sviluppa mediante tre meccanismi: con una modifica del bersaglio per mezzo di

metilazione post-trascrizionale, con meccanismo di efflusso del farmaco o con la disattivazione enzimatica del farmaco [59].

La claritromicina, che appartiene alla classe dei macrolidi, è stata utilizzata a lungo periodo come molecola-chiave di numerosi regimi. Essa inibisce la sintesi proteica dell'*H. pylori*, agendo sulla subunità 23S del ribosoma. Dozzine di mutazioni puntiformi in questo sito sono state descritte a livello mondiale: in Italia, ad esempio, è stata rilevata la presenza di sei mutazioni puntiformi. Nonostante tutto, solo tre di queste sono responsabili della maggior parte delle resistenze nei paesi sviluppati. Le mutazioni puntiformi A2142G/C e A2143G a carico del dominio V del gene 23S rRNA batterico, inducono resistenza alla claritromicina. Tuttavia, possono presentarsi differenze tra i paesi occidentali ed orientali, mostrando come esista uno scenario eterogeneo di resistenza a tale antibiotico, per quanto riguarda le diverse regioni del mondo [59, 60].

Le specie di *H. pylori*, le quali codificano per diverse proteine leganti la penicillina (PBP) e proteine simili alle β -lattamasi, sviluppano resistenza all'amoxicillina principalmente riducendo l'affinità di legame dell'antibiotico ad una specifica PBP chiamata PBP1A. Diverse mutazioni di resistenza che modificano i motivi di legame alla penicillina (SXXK, SXN e KTG) e la sequenza carbossi-terminale di PBP1A sono state identificate [61, 62].

La resistenza ai fluorochinoloni, invece, è principalmente guidata da meccanismi mediati dal bersaglio dovuti a mutazioni singole o doppie nei geni *gyrA* e *gyrB*, che codificano le subunità GyrA e GyrB [63, 64]. In questa categoria si posiziona la levofloxacina, una molecola che agisce inibendo l'enzima girasi, usato dall'*H. pylori* per la sintesi del DNA. Il gene

codificante per l'enzima è detto *GyrA* e sono cinque le mutazioni puntiformi che lo interessano, inducendo resistenza antibiotica [59].

Resistenze antibiotiche e azione dei farmaci

I meccanismi di resistenza al metronidazolo nelle specie batteriche a livello globale includono un ridotto assorbimento del farmaco, un aumentato efflusso del farmaco, una ridotta attivazione del farmaco ed una maggiore efficienza di riparazione del DNA che contrasta gli effetti dannosi dei metaboliti del metronidazolo. In *H. pylori*, la resistenza al metronidazolo negli isolati clinici è dovuta alla ridotta attivazione del farmaco, causata da un ampio repertorio di cambiamenti mutazionali (come frameshift, codoni di stop prematuri, inserimento di elementi trasponibili, cambiamenti di codone che comportano la sostituzione di amminoacidi e alterazioni del promotore) che si verificano nei geni che codificano per la NADPH nitroreductasi insensibile all'ossigeno (*RdxA*) e, con un livello di evidenza inferiore, per gli enzimi NAD(P)H flavina nitroreductasi (*FrxA*) [65, 66, 67]. Tuttavia, sono stati spesso segnalati isolati resistenti in cui *RdxA* e *FrxA* sono conservati. Si ipotizza che altri enzimi, come la proteina simile alla ferredossina (*FdxB*), la ferredossina (*FdxA*) e la flavodossina (*FldA*), possano essere responsabili della resistenza al metronidazolo [43]. Inoltre, sono stati sospettati o osservati sperimentalmente altri possibili meccanismi di resistenza al metronidazolo in *H. pylori*, tra cui mutazioni negli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA e nella risposta allo stress ossidativo. Questi enzimi includono la proteina *RecA*, la superossido-dismutasi (*SodB*), il regolatore dell'assorbimento ferrico (*Fur*) e il modulatore dell'attività del farmaco B (*MdaB*), che sono stati segnalati meno frequentemente negli isolati clinici [65].

Nelle specie batteriche, esistono diverse proteine, conosciute come "proteine della tetraciclina" (Tet), che mediano vari meccanismi di resistenza alla tetraciclina [46]. Questi includono: l'efflusso di complessi tetraciclina-catione tramite proteine come TetA, la sovraespressione di proteine ribosomiali protettive come TetO e l'inattivazione della tetraciclina tramite enzimi come TetX. Inoltre, la resistenza alla tetraciclina può derivare da mutazioni genetiche nel sito di legame della tetraciclina nel gene 16S rRNA [68].

Nel caso di *H. pylori*, i meccanismi molecolari alla base della resistenza alla tetraciclina sono stati studiati meno rispetto ad altri antibiotici come claritromicina e metronidazolo, principalmente a causa della minore diffusione di isolati resistenti. Anche se sono stati identificati diversi omologhi delle proteine Tet in *H. pylori*, i meccanismi principali di resistenza sono associati a mutazioni di singole, doppie o triple coppie di basi nel sito di legame primario della tetraciclina nel 16S rRNA. Tuttavia, è stata segnalata resistenza alla tetraciclina anche in assenza di mutazioni nel gene 16S rRNA, suggerendo che possa giocare un ruolo anche la limitazione dell'assorbimento del farmaco o l'aumento dell'efflusso [69].

Infine, l'*H. pylori* presenta mutanti resistenti alla molecola di rifabutina, come risultato della generazione di mutazioni puntiformi nella regione determinante la resistenza alla rifampicina del gene *rpoB* nelle posizioni del codone 149, 524–545, 585–586 e 701 in pazienti con una storia di trattamento con rifamicine [46, 70-75].

Identificazione delle resistenze

I metodi per identificare le resistenze antibiotiche in *H. Pylori* possono spaziare tra le tecniche colturali e quelle molecolari. I test basati su coltura

batterica sono la diluizione in agar, l'E-test ed il *breakpoint susceptibility test* [76]. Tali metodi sono quantitativi e forniscono indicazioni sulla suscettibilità fenotipica *in vitro*. Il loro scopo è quello di determinare la concentrazione minima di antibiotico da utilizzare, al fine di inibire la crescita batterica (attività batteriostatica) o ad eliminare il batterio (attività battericida), dopo 72h [77].

Per crescere, *H. pylori* necessita di un ambiente con bassa concentrazione di ossigeno (microaerofilia), con una concentrazione di CO₂ tra il 5% e il 10% e un alto livello di umidità. Anche se il suo habitat naturale è la mucosa gastrica acida, *H. pylori* sopravvive poco a pH inferiori a 4, preferendo un pH tra 5,5 e 8,0 e crescendo in modo ottimale a pH neutro [78]. *H. pylori* è un microrganismo esigente e per la sua crescita richiede terreni arricchiti, a base di sangue o siero bovino (agar sangue ed agar cioccolato) ai quali sono aggiunti antibiotici per renderli selettivi. Le tecniche basate sulla coltura sono i test standard per *H. pylori* e utilizzano il metodo di diluizione in agar o il metodo del test Epsilometrico (E-test), e sono tecniche che forniscono indicazioni sulla suscettibilità fenotipica *in vitro* [79].

Questi metodi quantitativi sono utili per determinare la concentrazione minima di un agente antimicrobico necessaria per uccidere (attività battericida) o per inibire la crescita (attività batteriostatica) di *H. pylori* dopo circa 72 ore di incubazione. Il metodo di diluizione in agar può essere modificato per testare più ceppi contemporaneamente sulla stessa piastra, permettendo un'analisi ad alta produttività. Il metodo E-test, invece, è meno complesso e più rapido. Tuttavia, entrambi i metodi hanno limitazioni significative se utilizzati per l'*H. pylori*. In primo luogo, il batterio richiede requisiti di crescita molto specifici, limitando l'uso dei test

fenotipici a laboratori ben attrezzati e con personale altamente qualificato. In secondo luogo, i risultati possono risultare non sempre riproducibili, poiché la loro interpretazione dipende fortemente dalle condizioni sperimentali. Nonostante la coltura sia un metodo diagnostico molto specifico, non sempre ha una massima resa, in quanto esistono condizioni in cui il batterio risulta non coltivabile [79].

La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

Nell'ambito delle tecniche molecolari, troviamo la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR), l'utilizzo di RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), il sequenziamento e l'ibridazione *in situ*. Nonostante questi procedimenti richiedano attrezzature sofisticate e dai costi elevati, il loro utilizzo prima di cominciare una terapia contro *H. pylori* nei pazienti affetti, è indubbiamente d'aiuto per aumentare le probabilità di eradicazione [76].

Ad esempio, *H. pylori* può essere identificato mediante ibridazione *in situ*, grazie all'utilizzo di specifiche sonde con alta specificità e sensibilità. Tuttavia, la tecnica più comune è la PCR, che può variare la sua sensibilità, a seconda che sia necessario diagnosticare la presenza del batterio partendo dai campioni biotipici, dalle feci, dalla placca dentale o dalla coltura batterica [76].

L'avvento della *Polymerase Chain Reaction*, dal momento in cui è stata messa a punto da Mullis, nel 1990, ha rivoluzionato il mondo della biologia. Le strategie basate sulla PCR hanno permesso lo sviluppo di grandi progetti scientifici, quali *Human Genome Project*. Tale tecnica è utilizzata in ambito clinico, diagnostico e genetico. Ad esempio, uno degli utilizzi più comuni della PCR è la rilevazione di patogeni. Inoltre, la PCR è indispensabile alla

medicina forense per l'identificazione di soggetti ricercati a partire da tracce del DNA [80, 81].

Tale tecnica ha lo scopo di amplificare uno specifico frammento di DNA, proveniente da tessuti, saliva, pelle, sangue o microrganismi, al fine di ottenere una grande quantità di materiale genetico. Essendo una tecnologia con alta sensibilità, è sufficiente una minima traccia di DNA per poter generare più copie, utili alle analisi di laboratorio [80, 81].

La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio che avviene in natura durante la duplicazione cellulare: la replicazione (sintesi) di un segmento di DNA a doppia elica a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire dalla serie di nucleotidi complementari a quelli del frammento interessato [80, 81].

La DNA polimerasi (o Taq polimerasi), è l'enzima chiave che permette tale processo: esso ha la funzione di legare i nucleotidi assieme, formando il prodotto della PCR. La DNA polimerasi è un enzima contenuto nel batterio termofilo *Thermus aquaticus* e definito termostabile, in quanto sopporta oltre i 100°C senza andare incontro a denaturazione [80, 81].

In secondo luogo, il frammento di DNA per poter essere amplificato, ha bisogno dei primers. Con il termine primer si definisce un piccolo frammento di RNA, con sequenze complementari alle estremità 5' e 3' dei due filamenti del segmento da riprodurre. Esso è in grado di legarsi in modo specifico al frammento di DNA target, facendo da innesco per la polimerasi [80, 81].

Infine, devono essere disponibili i nucleotidi da polimerizzare, sotto forma di desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP).

Al fine di un corretto svolgimento della PCR, il frammento di DNA di interesse deve essere denaturato. Importanti sono le condizioni di pH e temperatura, per la buona riuscita dell'amplificazione.

Fase di denaturazione

La soluzione contenente il DNA da replicare, i dNTP, i primers e la Taq polimerasi, viene portata ad una temperatura compresa tra i 96 e i 99°C. Di conseguenza, la doppia elica di DNA viene aperta totalmente ed i due filamenti divengono liberi.

Fase di annealing

La temperatura si abbassa tra i 40 e i 55°C. Questo permette ai primers di legarsi alle regioni complementari dei filamenti di DNA denaturati.

Fase di allungamento

Infine, la temperatura viene portata a 65-72°C, per coadiuvare l'azione dell'enzima Taq polimerasi, il quale va ad aggiungere dNTP ai primer legati, utilizzando come stampo il singolo filamento di DNA.

Ripetendo tale ciclo per 25-30 volte, si arriverà ad un plateau dovuto all'insufficiente quantità di oligonucleotidi usati come inneschi o al consumo dei dNTP. Al termine dei cicli di PCR, da un piccolo frammento di DNA, avremo milioni di copie dello stesso, riuscendo ad ottenere materiale in quantità idonea a successive analisi.

Esistono, tuttavia, alcune varianti della medesima tecnica, con protocolli messi a punto per le differenti applicazioni in biologia molecolare [80, 81].

La *nested* PCR

La *nested* PCR, ad esempio, è utilizzata in situazioni in cui è necessario incrementare la sensibilità e la specificità della PCR, al fine di amplificare uno specifico gene appartenente ad una famiglia di geni polimorfici. Oppure, ancora, la *nested* PCR trova la sua applicazione quando è necessaria l'amplificazione di un cDNA o di un mRNA presente in piccola dose, all'interno un campione contenente popolazioni eterogenee di cellule. In breve, la tecnica si basa su due reazioni di amplificazione consecutive, ognuna delle quali utilizza una diversa coppia di primers. Il prodotto finale della prima amplificazione viene usato come stampo per la seconda, che è innescata dagli oligonucleotidi presenti nella prima coppia di primers. Tale modalità permette un maggior numero di cicli di amplificazione ed incrementa la sensibilità dell'analisi. La maggior specificità, invece, deriva dal legame di due set di primer separati che si legano ad uno stesso stampo [82].

La *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR)

La reazione a catena della polimerasi inversa, detta RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), è un'altra variante della tecnica classica. Essa consiste nella sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento a partire da uno stampo di RNA. La nuova molecola è definita cDNA ed è sintetizzata mediante retrotrascrizione. La RT-PCR trova la sua applicazione negli studi di trascrittomica, in cui è necessario convertire in DNA l'intero pool di trascritti di una cellula o di un individuo in una specifica fase dello sviluppo. Spesso, la tecnica è impiegata in studi di espressione genica. Una volta ottenuto il cDNA, può essere poi amplificato nuovamente, utilizzando una normale PCR oppure, viene quantificato con la Real Time PCR [82].

Simile alla PCR tradizionale, la Real Time PCR, ha una funzione quantitativa, in quanto ad ogni ciclo è possibile misurare la concentrazione di prodotto. Assieme a tutti gli elementi necessari per la PCR, vengono aggiunti dei marcatori o sonde fluorescenti (ad esempio il colorante SYBR Green) [83].

La *real time* PCR

La *real time* PCR è effettuata in modo del tutto simile alla tradizionale PCR, con la differenza che, per via dell'utilizzo di marcatori o sonde fluorescenti, è possibile osservare in tempo reale (*real time*), dopo ogni ciclo, l'eventuale aumento della concentrazione di DNA. Le sonde fluorescenti sono composte da un *enhancer* e da un *quencher*, rispettivamente la prima molecola emette fluorescenza mentre la seconda va a smorzare la prima. La sonda viene legata al primer e fino a che *enhancer* e *quencher* sono vicini, non verrà emanata alcuna fluorescenza. Nel momento in cui, però, inizia l'amplificazione, le due molecole saranno progressivamente allontanate dall'aggiunta dei nucleotidi, inducendo l'*enhancer* ad emettere segnale [83].

Il rilevamento può avvenire direttamente se durante i cicli sono state usate delle sonde marcate, oppure indirettamente se viene utilizzato un agente intercalante marcato che si lega stabilmente alla doppia elica [83].

L'alta sensibilità ed il basso rischio di contaminazione nella Real Time PCR la rendono una tecnica ideale per la diagnosi di *H. pylori*. Questa tecnica ha mostrato il 5% in più di risultati positivi, rispetto alla coltura batterica da campioni biotici [84].

Pro e contro delle tecniche di biologia molecolare

Questi metodi si fondano principalmente sulla rilevazione di mutazioni specifiche di *H. pylori* che conferiscono resistenza, ma differiscono per

tempi di risposta, tipi di campioni analizzati e prestazioni complessive. A livello globale, le tecniche molecolari basate sulla PCR sono altamente riproducibili, più rapide delle tecniche colturali e in grado di fornire risultati il giorno dell'endoscopia. I metodi molecolari possono essere eseguiti sia su campioni coltivati che senza coltura, se applicati direttamente a campioni bioptici (freschi, congelati o in paraffina), fecali o di succhi gastrici [77].

Nonostante l'alta affidabilità, la precisione delle tecniche molecolari può essere influenzata da contaminazioni o degradazioni del DNA in analisi. In alcuni casi in un campione fecale può essere presente un insufficiente quantitativo di acido nucleico che rende necessaria l'applicazione di tecniche estrattive particolarmente avanzate; in altri casi è possibile imbattersi in falsi negativi, nel caso di campioni inclusi in paraffina nei quali il DNA può frammentarsi a causa del fissativo utilizzato; infine, persino una eccessiva sensibilità dei test può intaccare i risultati delle analisi, poiché potrebbero essere rilevati microrganismi morti o non di interesse [85].

Esistono numerosi metodi basati sulla PCR che possono rilevare solo alcune mutazioni specifiche e offrono vantaggi economici, specialmente per la resistenza a claritromicina, tetraciclina e levofloxacina. Ad esempio, sono disponibili sul mercato diversi kit che rilevano sia la presenza di *H. pylori* sia le mutazioni associate alla resistenza alla claritromicina. Questi kit possono fornire risultati in poche ore e sono adatti per l'uso in laboratori di microbiologia [86].

ClariRes Assay

A tal proposito, è doveroso citare lo studio di Mucignat et al. del 2010 [87] nel quale è stata valutata la resistenza dell'*H. pylori* ai macrolidi mediante l'utilizzo di un saggio *Clari Res Assay*. Le mutazioni puntiformi associate alla resistenza di *H. pylori* ai macrolidi conosciute in letteratura sono 19 (A2143G, A2144G, A2142G, A2142C, T2182C, A2143C, T2183C, T2717C, A2144T, C2195T, T2221C, C2147G, C2245T, G1939A, G2224A, T1942C, T2245C, T2289C, C2611A), e sono legate al *domain V* del rRNA 23S. Lo studio ha individuato queste mutazioni per mezzo della tecnica di sequenziamento, al fine di conoscere quanta parte di esse fossero evidenziabili con il kit commerciale *Clari Res Assay* e, contemporaneamente, ha verificato la frequenza di ceppi con mutazioni legate alla resistenza alla claritromicina in un campione di popolazione (59 pazienti in tutto) afferente al servizio di Gastroenterologia di Pordenone, per definire la dimensione locale di dette resistenze. È stato, inoltre, utilizzato il kit "*H. pylori ClariRes Assay*" (Ingenetix GmbH, Vienna) per la ricerca delle mutazioni A2142C, A2142/3G mediante *Real Time PCR*, su strumento *LightCycler 2.0* (Roche). Su 52 dei 59 pazienti è stato eseguito il sequenziamento della regione 23S rRNA, dove si concentrano le mutazioni che conferiscono resistenza alla Claritromicina per ricercare eventuali altre mutazioni non evidenziate dal Kit "*ClariRes Assay*" in *Real Time PCR*. Il risultato dello studio ha permesso l'individuazione di due mutazioni puntiformi dell'rRNA 23S associate alla resistenza di *H. pylori* verso i macrolidi: A2143G e A2142G [87].

VIASURE Detection Kit

Un altro kit utile all'identificazione della resistenza alla claritromicina in *H. pylori* è il *VIASURE Detection Kit*. Esso si basa sulla *Real Time PCR* ed è

pensato per rilevare la resistenza alla claritromicina in biopsie di tessuto gastrico di pazienti che presentano sintomi di infezione al batterio. Dopo una fase di estrazione del DNA dal campione bioptico, si passa all'amplificazione mediante Real Time PCR, con l'utilizzo di specifici *primers* e sonde *reporter* fluorescenti in grado di identificare le mutazioni puntiformi a carico dei geni dell'rRNA 23S, responsabili della resistenza di *H. pylori* alla claritromicina [88].

Lo studio condotto da Mommersteeg et al. (2023) [89] rappresenta una testimonianza dell'utilità del VIASURE *Detection Kit* nell'identificazione della resistenza alla claritromicina in *H. pylori*: la ricerca prende in esame un campione di pazienti che hanno eseguito l'UBT per confermare l'eradicazione del batterio e che, in seconda battuta, hanno raccolto campioni fecali testati, in seguito, per l'antigene fecale di *H. pylori* (SAT). Il tipo di trattamento antibiotico e la sua durata sono stati registrati dai pazienti, in precedenza. Questi dati sono stati comparati con la resistenza alla claritromicina valutata mediante Real Time PCR sui campioni fecali, grazie al kit VIASURE [89].

***H. pylori* and Multi-Antibiotic Resistance Real-Time PCR Kit**

Infine, un ultimo kit comunemente commercializzato è quello della AB ANALITICA, noto come *H. pylori and Multi-Antibiotic Resistance Real-Time PCR Kit*. Anch'esso si basa sulla tecnica di biologia molecolare Real Time PCR ed ha lo scopo di identificare i geni di resistenza di *H. pylori* responsabili della resistenza del batterio verso la claritromicina ed i chinoloni. Il dispositivo si applica su DNA estratto da campioni di feci ed è in grado di eseguire l'amplificazione in sole due ore. Il test distingue simultaneamente, tra *H. pylori* non mutato ed *H. pylori* resistente a

claritromicina e chinoloni, attuando anche un processo di controllo per la prevenzione dei falsi negativi [90].

Al contrario, la creazione di test per la resistenza a metronidazolo e amoxicillina rimane ostica, a causa della grande variabilità dei meccanismi molecolari coinvolti.

Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS)

Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) sono emerse come validi strumenti per la previsione e la sorveglianza della resistenza antibiotica. Gli approcci NGS possono essere utilizzati in combinazione con la coltura batterica per il sequenziamento dell'intero genoma batterico (WGS) o con altre tecniche molecolari come il sequenziamento *deep-amplicon* basato su PCR. Rispetto ai metodi molecolari tradizionali, l'NGS offre diversi vantaggi: la resistenza agli antibiotici negli isolati clinici di *H. pylori* spesso deriva da mutazioni sparse in posizioni di sequenza specifiche (ad esempio, in geni come *pbp1A* e *rdxA*), il che richiede un'approfondita copertura della sequenza per massimizzare le prestazioni. I metodi tradizionali basati su PCR hanno limitazioni poiché possono mirare solo a un numero ristretto di nucleotidi, non coprendo tutte le possibili varianti strutturali dei genotipi correlati alla resistenza (ad esempio, grandi delezioni o inserzioni nel gene *rdxA*). Al fine di evitare falsi negativi, l'approccio NGS si mostra più idoneo poiché, oltre a fornire risultati in 24-72, offre una panoramica completa dei genotipi batterici ed è particolarmente utile sia per identificare i fattori genetici che per l'individuazione di rari meccanismi di resistenza antibiotica [91].

Capitolo 6

PARTE SPERIMENTALE

Obiettivi dello studio

Obiettivo del presente studio è stato impostare un protocollo di ricerca finalizzato all'identificazione della resistenza genotipica agli antibiotici sviluppata da *H. pylori*, in pazienti con alle spalle almeno un regime di eradicazione fallito. Hanno parte dello studio persone provenienti dalla specifica area geografica dell'Italia meridionale (provincia di Bari), le quali, mediante il THD fecal test, hanno raccolto campioni fecali per l'analisi genotipica con Real Time PCR. A questo è seguita l'individuazione delle resistenze a differenti antibiotici, grazie all'identificazione delle mutazioni puntiformi di specifici geni. La resistenza all'amoxiciclina è stata valutata sulle mutazioni puntiformi del sito PBP-1A; quella alla claritromicina tramite individuazione delle mutazioni che coinvolgono il gene 23S rRNA; lo stesso è stato fatto per quanto riguarda la ricerca di resistenza alla tetraciclina nella quale è coinvolto il gene 16S rRNA; ed infine, sono stati presi in analisi i geni RdxA/FrxA per la resistenza al metronidazolo [91].

Materiali e metodi

Selezione pazienti

E' stato effettuato un arruolamento di pazienti dispeptici consecutivi nel periodo compreso tra giugno 2021 e giugno 2023 [92], che avevano fallito almeno una terapia antibiotica contro *H. pylori*. Il fallimento terapeutico è stato dimostrato da una persistente positività a test non invasivi, quali UBT o test fecale, eseguiti almeno quattro settimane dopo la conclusione della somministrazione di antibiotici. I pazienti sono stati arruolati in due diversi centri: l'Unità di Gastroenterologia del Policlinico di Bari, e l'Istituto

Nazionale di Gastroenterologia IRCCS “S. De Bellis”. Nello specifico, sono stati coinvolti soggetti volontari che hanno superato i 18 anni, con sintomi dispeptici, quali sazietà postprandiale, sensazione di sazietà precoce, dolore e bruciore epigastrico. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con un passato di cancro gastrico o extragastrico e coloro che hanno rifiutato di partecipare, non donando il loro consenso.

Criteri di esclusione aggiuntivi sono stati rappresentati dall'utilizzo di antiacidi o inibitori di pompa o antagonisti dei recettori istaminici, da parte dei pazienti, durante le due settimane precedenti all'arruolamento; oppure dall'uso di antibiotici o sali di bismuto per le precedenti quattro settimane; ed infine, dalla presenza di diarrea cronica che avrebbe impedito una corretta raccolta delle feci. I dettagli riguardanti il regime di eradicazione, ai quali sono stati sottoposti i pazienti prima dello studio, sono stati registrati. La ricerca è stata condotta in accordo con le indicazioni della Dichiarazione di Helsinki. Inoltre, il comitato etico locale ha approvato il protocollo (AOU Consorziiale Policlinico di Bari, protocol no. 74413, approved 16 November 2016). A tutti i soggetti è stato fatto firmare un consenso informato.

Valutazione della resistenza antibiotica

I campioni fecali sono stati raccolti dai pazienti utilizzando il THD Fecal Test Device (THD S.p.a., Correggio, Reggio Emilia, Italy), che ha mostrato una sensibilità del 90.2% e una specificità del 98.5% nel rilevare le sequenze geniche di *H. pylori* [93,94]. Lo strumento per la raccolta delle feci è costituito da una spazzola in plastica da immergere nel materiale fecale. Tale spazzola viene posta in una camera dotata di chiusura a vite, con all'interno una soluzione in grado di stabilizzare gli acidi nucleici. La camera presenta, ad un'estremità, una membrana che viene forata da un

ago al momento del prelievo. Questo dispositivo, inoltre, presenta un filtro in grado di bloccare la reazione a catena della polimerasi, inibendo l'emoglobina ed i suoi prodotti di degradazione, i metalli pesanti, i complessi polisaccaridici, le proteine e molecole ad alto peso molecolare come le fibre. La soluzione è stata prelevata dal serbatoio e processata per l'estrazione del DNA utilizzando il QIAmp DNA Stool Minikit (Quiagen, Hilden, Germany).

E' stata allestita una Real Time PCR al fine di identificare le mutazioni del genoma batterico, responsabili delle resistenze antibiotiche in *H. pylori*.

Durante la fase preparativa è stato estratto il DNA di *H. pylori* dai campioni fecali dei pazienti. Sono stati pesati circa 220 mg di feci, poi trasferite in un tubo da microcentrifuga e tenute in ghiaccio.

Successivamente, al tubo è stato aggiunto 1 ml di inhibitex Buffer, lasciando il campione in sospensione a 70°C per 5 min. Esso è stato, quindi, portato alla temperatura di lisi (95°C). Dopo 1 min in centrifuga è stato scartato il pellet.

Sono stati prelevati 25 µl di proteinasi K e posti in un nuovo tubo da microcentrifuga da 2 ml. Ad essi sono stati aggiunti 600 µl di sovrinatante e 600 µl di Buffer di Lisi (AL). Dopo 10 min di incubazione a 70°C, sono stati versati nel lisato 600 µl di etanolo.

600 µl di lisato sono stati trasferiti in una colonna di spin, centrifugando per 1 min. La colonna è stata poi trasferita in un nuovo tubo, eliminando il vecchio contenente il filtrato. Tale passaggio è stato ripetuto più volte, fino a terminare tutto il lisato disponibile.

Nella colonna di spin sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW 1, centrifugando per 1 min. La colonna è stata spostata su un nuovo tubo da

2 ml, scartando il vecchio con il filtrato. Il procedimento è stato ripetuto utilizzando 500 µl di buffer AW2, centrifugando per 3 min ed eliminando il filtrato.

In un nuovo tubo da microcentrifuga, nel quale è stata trasferita la colonna di spin, sono stati pipettati 200 µl di buffer di eluizione (ATE). A seguito di una incubazione di 1 min a TA, il DNA è stato eluito mediante centrifuga a 20.000 g per 1 min.

La presenza e la concentrazione di DNA è stata valutata mediante analisi spettrofotometrica nell'UV, utilizzando, per la lettura del bianco, un campione contenente solo buffer ATE.

Per l'allestimento della Real Time PCR è stato preparato il mix di reazione con:

- il sample del DNA (1-4 µl)
- la nucleasi free water
- PrimePCR Assay (1 µl)
- il SsoAdvanced Universal Supermix contenente Sybr Green (10 µl)

I volumi utilizzati sono riferiti ad una piastra da 96 pozzetti.

E' stata avviata la Real Time PCR:

- fase di attivazione: 2 min a 95°C per 1 ciclo;
- fase di denaturazione: 5 sec a 95°C per 40 cicli
- fase di annealing/estensione: 30 sec tra 60 °C per 40 cicli;
- comparsa della curva di melting: 5 sec tra 65 e 95°C per 1 ciclo.

La Real Time PCR ha permesso di identificare le mutazioni puntiformi di *H. pylori* legate alla resistenza a claritromicina, metronidazolo, levofloxacina e tetraciclina [95, 96, 97]. In particolare, sono stati amplificati i seguenti geni: *pbp1* per l'amoxicillina; *rdxA/frxA* per il metronidazolo; l'rRNA 23S per la claritromicina; *gyrA* per la levofloxacina e l'rRNA 16S per la tetraciclina [98]. Dopo la Real Time PCR è stata eseguita un High Resolution Melting Analysis (HRM) per identificare le mutazioni. Le curve grafiche prodotte dalla HRM sono state comparate a quelle standard riferite ai geni *wild-type*, ovvero i geni non mutati derivati da un ceppo batterico suscettibile [99- 101].

Statistica

I dati continui sono espressi come deviazione standard media e variabili categoriche come proporzioni/percentuali. La distribuzione normale è stata valutata mediante test di Kolmogorov-Smirnov. Le parti grafiche sono state realizzate mediante Excel nella versione per Windows, Microsoft (Microsoft Italia, Milan, Italy).

Risultati

In totale, sono stati arruolati cinquanta pazienti. Il rapporto maschi/femmine è stato di 17/33, e l'età media di $53,3 \pm 13,6$ anni. Di questi, il 72% di loro aveva fallito un regime di eradicazione con terapia antibiotica, il 16% ne aveva fallite due, il 10% tre ed il 2% quattro.

La terapia che ha mostrato il maggior numero di insuccessi è stata la BQT (Pylera), in undici casi, seguita dalla terapia sequenziale (n=9), la terapia tripla con la claritromicina (n=7), la concomitante (n=5) e la tripla terapia con levofloxacina (n=3). Alcuni pazienti si sono sottoposti ad altri trattamenti non previsti dalle attuali linee guida (per esempio, la tripla

terapia solo con amoxicillina o tetraciclina o metronidazolo, oppure la sequenziale con levofloxacin), mentre i rimanenti non hanno ripetuto i precedenti trattamenti. Il 6% dei pazienti ha, invece, terminato in anticipo la terapia dopo aver riscontrato effetti collaterali.

Il tasso di resistenza secondaria agli antibiotici è stato del 16% per la claritromicina (n=8), 18% per il metronidazolo (n=9), 14% per l'amoxicillina (n=7), 14% per la levofloxacin (n=7) e 2% per la tetraciclina (n=1). In nove pazienti (18%) è stata riscontrata una multi-resistenza, mentre quella più comune è stata la doppia resistenza che associava la claritromicina al metronidazolo (n=5). I risultati sono mostrati nella Figura 4.

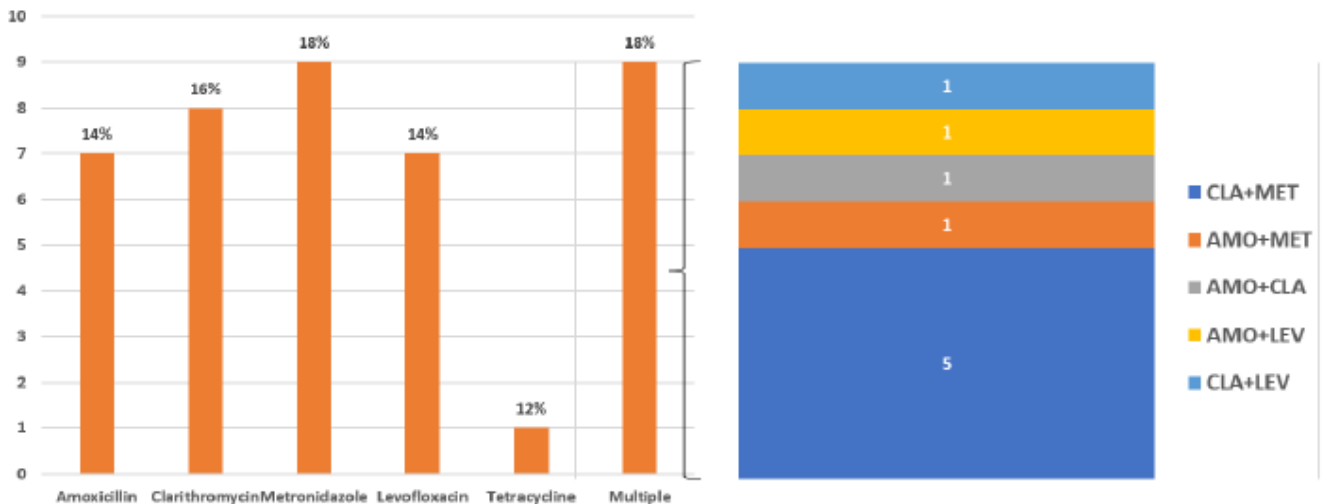


Figura 4. Tassi di resistenza antibiotica secondaria. La multi-resistenza è mostrata in dettaglio nel diagramma.

Nell'ambito dei pazienti con un precedente fallimento al regime contenente amoxicillina (Tabella 1), è stata rintracciata resistenza all'amoxicillina in 4 su 20 pazienti (20%). Tra i pazienti con un precedente fallimento di terapia che hanno aderito ad un regime contenente

claritromicina, la resistenza a questo antibiotico è stata riportata in 6 su 19 pazienti (31,6%). Tra i pazienti con precedente fallimento di terapia che hanno aderito ad un regime a base di metronidazolo (n=21), è stata riportata resistenza a tale molecola in tre casi (14,3%). Un regime basato su levofloxacin era stato somministrato a tre pazienti, i quali non hanno eradicato il batterio tuttavia alcuna resistenza è stata identificata (0%). Infine, nell'ambito dei pazienti con precedente fallimento terapeutico, che hanno portato avanti una terapia con tetraciclina, è stata osservata resistenza alla molecola in 1 su 12 pazienti (8,3%), come riportato nella Tabella 1.

D'altro canto, tra i sette pazienti resistenti all'amoxicillina, tre di loro (42,8%) hanno ricevuto una terapia contenente amoxicillina. All'interno del gruppo di nove pazienti resistenti al metronidazolo, tre (33,3%) avevano fallito una terapia basata su metronidazolo. Degli otto pazienti resistenti alla claritromicina, cinque (62,5%) avevano eseguito in passato una terapia contenente claritromicina. Nessuno dei sette soggetti resistenti alla levofloxacin ha ricevuto terapie basate su questa molecola. In conclusione, è stata riportata resistenza alla tetraciclina in una sola persona, che ha fallito il trattamento con Pylera™.

Antibiotico	Numero di pazienti con resistenza secondaria	Numero di pazienti che hanno fallito un regime contenente un antibiotico a cui erano resistenti	Tasso (%)
Amoxicillina	4	20	20%
Claritromicina	6	19	31%
Metronidazolo	3	21	14%
Levofloxacin	0	3	0%
Tetraciclina	1	12	8,3%

Tabella 1. Proporzioni di resistenza secondaria agli antibiotici in base al tipo di terapia precedentemente fallita.

Discussione

Il trattamento dell'infezione da *H. pylori* è diventato un problema complesso a causa della diffusione della resistenza antimicrobica [102]. Argueta et al. nel 2021 hanno riscontrato, negli Stati Uniti, un tasso di resistenza per claritromicina e levofloxacin molto vicino al 30%, confermando ciò che era riportato precedentemente per quanto riguarda i paesi del sud Europa ed in Italia durante gli ultimi quattro anni [103].

Come precedentemente detto, l'infezione da *H. pylori* può essere diagnosticata mediante metodi invasivi e non invasivi, a seconda che richiedano o meno l'endoscopia [104-106].

Il primo test di suscettibilità era basato su isolati di *H. pylori* e colture, sebbene anche le linee guida correnti lo raccomandino solo dopo ripetuti fallimenti terapeutici [33]. Infatti, è spesso possibile utilizzarlo come prima fase di selezione. Tuttavia, presenta un alto tasso di falsi-negativi nei risultati, a causa della sua bassa sensibilità. Questa complessità è principalmente dovuta all'esigenza di generare e mantenere un ambiente

microaerofilo, in cui il batterio può crescere. Altri fattori che fino ad ora hanno limitato la diffusione della coltura di *H. pylori* sono correlati alla metodologia: il numero di biopsie gastriche, procedure endoscopiche lunghe, condizioni e trasporti dei sample bioptici, le caratteristiche del laboratorio, tempi lunghi e non precisi per l'ottenimento dei risultati [104, 107, 108].

Inoltre, la coltura non riesce a identificare le eteroresistenze in *H. pylori*, come ad esempio, la presenza contemporanea di un ceppo batterico sensibile ed uno resistente [105, 109, 110]. Come alternativa alla coltura batterica ed al test di suscettibilità, esistono tecniche basate sulla Real Time PCR (Genotypic Resistance Detection) [111]. Esse si basano sul principio di amplificazione ed identificazione delle mutazioni puntiformi responsabili della resistenza antibiotica sul DNA di *H. pylori* estratto e purificato a partire da campioni di biopsie gastriche. Questi approcci diagnostici che non utilizzano colture batteriche sono molto accurati nel rilevare anche minime tracce di ceppi resistenti o mascherati dalla presenza di etero-resistenze [112, 113]. I test molecolari offrono vantaggi e garantiscono attuabilità se comparati alle tecniche colturali. Poiché il loro utilizzo era strettamente legato ad invasivi esami endoscopici, tali tecniche non erano molto diffuse in passato. Tuttavia, un importante progresso in questo campo è rappresentato dalla possibilità di identificare le mutazioni di resistenza in campioni fecali, dai quali viene estratto il DNA batterico. Tra il 2003 ed il 2021, diversi studi si sono concentrati sui test fecali per la diagnosi di *H. pylori*. Il DNA batterico viene utilizzato per la Real Time PCR, la quale serve per la diagnosi di infezione ed il test di suscettibilità antibiotica [114]. La rilevazione delle mutazioni genetiche puntiformi che conferiscono resistenza antibiotica al batterio, può essere effettuata

utilizzando campioni di feci, rendendo, così, possibile una diagnosi ed una identificazione delle resistenze (per esempio, a claritromicina e chinoloni) non invasiva per i pazienti [115, 33]. Queste procedure, se impiegate prima di una terapia di prima linea, consentono l'identificazione di ceppi batterici ancora sensibili a questi farmaci e, pertanto, si rivolgono a tutti quei pazienti che beneficiano dei vecchi regimi (tripla e sequenziale) sconsigliati dalle linee guida attuali [33]. D'altro canto, l'analisi molecolare di campioni fecali ha il vantaggio di aumentare la compliance dei soggetti che si sottopongono all'esame, riducendo i costi ed il tempo necessario sia per la procedura diagnostica che per la somministrazione di una terapia adatta [95]. Infine, in tal modo si potrebbe ridurre il potenziale rischio di futuro incremento della resistenza alla terapia quadrupla (trattamento di prima linea, secondo le linee guida), derivante dall'utilizzo sconsiderato degli antibiotici [116]. Nel presente studio, è stato valutato, per mezzo di analisi molecolare su campioni fecali, il quadro delle resistenze antibiotiche secondarie in soggetti affetti da infezione da *H. pylori* che avevano alle spalle uno o più trattamenti fallimentari. Nonostante il campione di modeste dimensioni, è stato osservato, nell'ambito dei pazienti arruolati, che il tasso riferito alle resistenze secondarie era piuttosto basso. Difatti, la percentuale della resistenza antibiotica secondaria era per il 18% al metronidazolo, per il 16% alla claritromicina, per il 14% alla levofloxacina e per il 2% alla tetraciclina. E' stata rilevata una multiresistenza nel 18% del campione in analisi: la doppia resistenza a claritromicina e metronidazolo è stata la più comune. Per questo motivo, l'andamento generale dei tassi di resistenza secondaria in seguito a fallimento di uno o più regimi terapeutici, è risultato essere più basso di quanto prospettato [117].

Tra i soggetti con un precedente fallimento alla terapia contenente amoxicillina, è stata rintracciata resistenza a tale antibiotico nel 20% dei casi; allo stesso modo tra i pazienti che hanno ricevuto una terapia a base di metronidazolo, la resistenza antibiotica è stata rilevata nel 14.3% di essi; infine, i pazienti che hanno fallito un trattamento contenente tetraciclina hanno mostrato resistenza nell'8.3% dei casi. Questi risultati suggeriscono che la claritromicina induce una resistenza secondaria molto più facilmente rispetto ad altri antibiotici, nonostante anche l'assunzione del metronidazolo, possa essere seguita da resistenza secondaria in una percentuale abbastanza alta. Una precedente esposizione alla claritromicina rappresenta un fattore di rischio per la resistenza secondaria: esiste, infatti, un modello matematico che ha dimostrato come la resistenza alla claritromicina, nel 96.7% dei casi sia originata dalla trasmissione di batteri resistenti, mentre nell'1.3% dei casi, derivi da mutazioni spontanee [118]. Il tasso di resistenza secondaria per questo antibiotico è abbastanza eterogeneo e si aggira tra il 27.2% [119] e l'82.9% dei casi [120]: questo ci suggerisce che, per quanto riguarda il fenomeno delle resistenze, anche i fattori geografici sono importanti [121]. La resistenza secondaria per la levofloxacina è stata del 14% nel nostro studio, mentre era vicina al 16% in un secondo studio [122]. Sorprendentemente, è stato rilevato che la terapia basata su levofloxacina non ha indotto resistenza alla molecola. Tale dato, nonostante resti da confermare su un campione più grande, potrebbe suggerire che la resistenza alla levofloxacina sia frutto di un utilizzo precedente di per scopi diversi dall'eradicazione dell'*H. pylori*, poiché è risaputo che i chinoloni inducono resistenza crociata. Infine, un basso tasso di resistenza alla tetraciclina è un dato concordante con l'attuale letteratura [123]. Tuttavia, i bassi livelli di resistenza secondaria potrebbero avere diverse spiegazioni: in primis, tre

pazienti su cinquanta hanno abbandonato la terapia prima della fine, a causa degli effetti collaterali; per tanto, in questi soggetti, non sarebbe emersa resistenza secondaria. Un'altra ragione possibile potrebbe essere legata al metodo di biologia molecolare utilizzato per l'analisi: la PCR con l'*High Resolution Melting* (HRM) va ad identificare ogni variazione nella sequenza genetica, ma, a differenza del sequenziamento NGS, non definisce precisamente la mutazione puntiforme [124, 125]. Nonostante la miglior performance del sequenziamento, le tecnologie NGS sono molto costose e non accessibili a tutti i laboratori. Sulla base di ciò, per il presente studio si è preferito utilizzare l'HRM, essendo una tecnica rapida e conveniente per un'analisi su larga scala. Infine, nell'ambito delle limitazioni, è necessario riconoscere che non tutte le mutazioni genetiche si traducono in resistenza fenotipica [126].

Conclusioni

In conclusione, il nostro studio ha mostrato come, nonostante le resistenze secondarie non fossero così alte come ci si aspettava, l'utilizzo precedente di claritromicina ha aumentato drasticamente il rischio generale di nuove resistenze: per questo motivo, il suo riutilizzo non è da incoraggiare. Non è stata osservata una nuova resistenza alla levofloxacina: ciò potrebbe implicare che queste resistenze siano state acquisite dopo l'utilizzo di chinoloni, presumibilmente anche con l'induzione di una resistenza crociata. Il fatto che il tasso di resistenza alla tetraciclina sia relativamente basso potrebbe essere un risultato confortante, spiegato dal suo basso utilizzo in anni recenti. Tuttavia, deve essere mantenuta particolare attenzione al corretto utilizzo degli antibiotici, al fine di evitare la diffusione di nuove resistenze in futuro [117]. Per finire, è bene evidenziare come i sali di bismuto rappresentino una indispensabile arma

contro l'*H. pylori*, avendo essi intrinseche proprietà antibatteriche senza indurre resistenza antimicrobica. E' stato, infatti, dimostrato che aggiungere bismuto alla terapia di eradicazione, assicura il 30-40% di successo in più nel caso delle infezioni resistenti [97]. Ecco perché, quando è possibile, l'aggiunta di bismuto dovrebbe essere sempre considerata nei casi di terapie eradicanti particolarmente difficoltose.

BIBLIOGRAFIA

1. Aslam B, Wang W, Arshad M I, Khurshid M, Muzammil S, et al. Antibiotic resistance: a rundown of global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018. 11:1645-1658.
2. Podolsky S H. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Nature.* 2018.
3. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen J, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet.* 2016. 387(10014):168-75.
4. Dyar O J, Lund M, Lindsjö C, Stålsby Lundborg C, Pulcini C. Preparedness to prescribe antibiotics responsibly: a comparison between final year medical students in France and Sweden. *European J of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2019. Volume 38, p. 711-717.
5. World Health Organization, 2018.
6. Ierardi E, Losurdo G, Mileti A, et al. The Puzzle of Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*: Beyond Basic Science. *Antibiotics*, 2020.
7. Losurdo G, Francioso F, Pricci M, et al. A prospective study on *Helicobacter pylori* rapid urease test false negativity: is it time for its use in restricted situations? *Minerva Gastroenterol.* 2023.
8. Graham D Y, Miftahussurur M. *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review. *J Adv Res.* 2018.
9. H L T Mobley, L H Hu, P A Foxall. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scandinavian J of Gastroenterol.* 1991. Volume 26, p 39-46.
10. Tankeshwarin A. Urease Test: Principle, Procedure, Results. *Biochemical Tests.* 2022
11. Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini G M. Principi di microbiologia medica, terza edizione. 2017.
12. Malfertheiner P, Constanza Camargo M, El-Omar E, Liou J, Peek R, Schulz C, Stella I. Smith & Sebastian *Helicobacter pylori* infection. *Nature.* 2023, p.24.
13. Robinson K et al. *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut.* 2008.
14. Ferreira R M et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut.* 2018. 67, 226–236

15. Guo Y et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastrointestinal microbiota: a population-based study in Lingu, a high-risk area of gastric cancer. *Gut*. 2020. 69, 1598–1607.
16. Kwon S K et al. Human gastric microbiota transplantation recapitulates premalignant lesions in germ-free mice. *Gut*. 2022. 71, 1266–1276.
17. Sugano K, Tack J, Kuipers E J, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015. 64:1353–67
18. Wang Z. et al. Changes of the gastric mucosal microbiome associated with histological stages of gastric carcinogenesis. *Front. Microbiol*. 2020. 11, 997.
19. Song P, Wu L, Guan W. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Nutrients*. 2015. 7, 9872–9895.
20. Lucker S. et al. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2010. 13479–13484.
21. Vaira D, Holton J, Menegatti M et al. Review article: invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000. 3:13-22.
22. Uotani T, Graham D Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann Transl med*. 2015. 3(1):9.
23. Gisbert J P, Prajers J M. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004. 20(10):1001-17.
24. Lilenbaum W, Nunes E L C, Azeredo M A I. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Applied microbiology*. 1998. Volume 27, Issue 4.
25. Gattringer R, et al. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J of Antimic Chemotherapy*. 2002. Volume 49, Issue 4, p 651-659.
26. Felmingham D, Brown D F J. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *J of antimic Chemotherapy*. 2001. Volume 48, p. 81-85.
27. Greenwood D, Detection of antibiotic resistance in vitro. *Int J of Antimic Agents*. 2000. Volume 14, p. 303-306.
28. De Oliveira A P, Watts J L, Salmon S A, Aeresstorp F M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci*. 2000. 83;855-862.
29. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000. 44: 1549-1555.

30. Aerestrup F M, Agers Y, Aherens P, Jorgensen J C, Madsen M, Jensen L B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in *staphylococci* from poultry. *Vet Microbiol.* 2000. 74: 353-364
31. Brosnikoff C, Kastner P, Rennie R, Turnbull L. Side by side by side evaluation of Dade Microscan Walkaway 96, BD Phoenix and bioMérieux Vitek 2 for 1 antimicrobial susceptibility testing of a challenge set of clinical strains. *General Meeting of the American Society for Microbiology.* 2002. 25-727.
32. Guaman J F, Favian B, Arcos V, Tigre A. Detection of *Helicobacter pylori* from Human Biological Samples (Feces) by Antigenic Screening and Culture. *Jundishapur J of Microbiology.* 2018.
33. Melfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert J, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut.* 2022. p. 71: 1724-1762.
34. Losurdo G, Mezzapesa M, Ditunno I, et al. Helicobacter pylori Secondary Antibiotic Resistance after One or More Eradication Failure: A Genotypic Stool Analysis Study. *Antibiotics.* 2024.
35. Sugano K Tack J, Kuipers E J, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut.* 2015. 64:1353–67.
36. Livermore, D M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol Rev,* 1995. 8, 557–584.
37. Gerrits M M et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori.* *Helicobacter.* 2006. 11, 181–187.
38. Drusano G et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect.* 1998. 4, 2S27–2S41.
39. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo J L & Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Med Microbiol.* 2017. 66, 551-559.
40. Gaynor M., Mankin, A S. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003. 3, 949–960.
41. Dingsdag, S A, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother,* 2018. 73, 265–279.
42. Hoffman, P S, Goodwin A, Johnsen J, et al. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J. Bacteriol.* 1996. 178, 4822–4829.
43. Kwon D H et al. Analysis of RdxA and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of

- Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. 44, 2133–2142.
44. Kwon D H, Kato M, El-Zaatari F A, et al. Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (FrxA) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. 188, 197–202.
 45. Martínez-Júlvez M et al. Structure of RdxA—an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *FEBS J.* 2012. 279, 4306–4317.
 46. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. 65, 232–260.
 47. Losurdo G, Pricci M, De Bellis M, Celiberto F et al. Effect of metronidazole resistance on *Helicobacter pylori* eradication regimens. *J of Digestive Disease.* 2022.
 48. Losurdo G, Giorgio F, Pricci M, Girardi B, Russo F, et al. *Helicobacter pylori* Primary and Secondary Genotypic Resistance to Clarithromycin and Levofloxacin Detection in Stools: A 4-Year Scenario in Southern Italy. *Antibiotics.* 2020. 9, 723.
 49. Malfertheiner P, Constanza Camargo M, El-Omar E, Liou I M, et al. *Helicobacter pylori* infection. *Nature reviews disease primers.* 2023. p.24.
 50. Marcus E A, Sachs G, Scott D R. Colloidal bismuth subcitrate impedes proton entry into *Helicobacter pylori* and increases the efficacy of growth-dependent antibiotics. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2015. 42, 922-933
 51. Gisbert J P. Eradication of *Helicobacter pylori* infection with non-bismuth quadruple concomitant therapy. *Frontiers in anti-infective drug discovery* Bentham science publishers, 2020. 1-34.
 52. Malfertheiner P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut.* 2017. 66, 6-30.
 53. Boyanova L, Hadzhiyski P, Gergova R, Markovska R. Evolution of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a topic of increasing concern. *Antibiotics.* 2023. 12, 332.
 54. Scott D Weeks D, Melchers K et al. The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1998. 43:S56–60.
 55. Malfertheiner P, Constanza Camargo M, El-Omar E et al. *Helicobacter pylori* infection. *Nature reviews disease primers.* 2023. Article number: 19.
 56. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med.* 2006;144(2):94-100.

57. Hsu P I, Tsai F W, Kao S S, Hsu W H et al. Ten-Day Quadruple Therapy Comprising Proton Pump Inhibitor, Bismuth, Tetracycline, and Levofloxacin is More Effective than Standard Levofloxacin Triple Therapy in the Second-Line Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: A Randomized Controlled Trial. *Am J Gastroenterol*. 2017; 112(9):1374-1381.
58. López-Góngora S, Puig I, Calvet X, Villoria A et al. Systematic review and meta-analysis: susceptibility-guided versus empirical antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(9):2447-55.
59. Ierardi E, Giorgio F, Iannone A, Losurdo G et al. Noninvasive molecular analysis of *Helicobacter pylori*: It is time for tailored first-line therapy? *World J Gastroenterol*. 2017, 23(14):2453-2458
60. Gaynor M, Mankin A S. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem*, 2003. 3, 949–960
61. Livermore D M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol Rev*, 1995. 8, 557–584.
62. Gerrits M M. et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2006. 11, 181–187.
63. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo J L, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol*. 2017. 66, 551–559.
64. Moore R A, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan L E. Nucleotide sequence of the *gyr A* gene characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995. 39, 107-111.
65. Tshibangu-Kabamba Y E & Y *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance — from biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021. volume 18, p. 613–629
66. Kwon D H, Kato M, El-Zaatari F A, Osato M S, Graham D Y. Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (FrxA) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol. Lett*, 2000. 188, 197–202.
67. Martínez-Júlvez, M. et al. Structure of RdxA—an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *FEBS J*, 2012. 279, 4306–4317.
68. Ross J I, Eady E A, Cove J H, Cunliffe W J. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1998. 42, 1702–1705.

69. Wu J Y et al. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49, 578–583.
70. Nishizawa T. et al. *Helicobacter pylori* resistance to rifabutin in the last 7 years. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. 55, 5374–5375.
71. Kunin, C M. Antimicrobial activity of rifabutin. *Clin. Infect. Dis.* 1996. 22, S3–S14.
72. Heep M, Beck D, Bayerdörffer E, Lehn N. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. 43, 1497–1499.
73. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutation in the beginning of the rpoB Gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. 44, 1075–1077.
74. Mori H, Suzuki H, Matsuzaki J, et al. 10-Year trends in *Helicobacter pylori* eradication rates by sitafloxacin-based third-line rescue therapy. *Digestion.* 2019. 101, 644-650.
75. Sisson G. et al. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents chemotherapy.* 2002. 46, 2116-2123
76. Ierardi E, Giorgio F, Losurdo G, Di Leo A, Principi M. How antibiotic resistances could change *Helicobacter pylori* treatment: A matter of geography? *World J Gastroenterol.* 2023. 19(45):8168-80.
77. Şen N, Yilmaz O, Şimşek I, Küpelioglu A A, Ellidokuz H. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a Simple Stool PCR Method in Adult Dyspeptic Patients. *Helicobacter.* 2005. 10, 353–359.
78. Megraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1997. 11, 43-53.
79. Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini G M. Principi di microbiologia medica, terza edizione. 2017.
80. Valones M A A, Guimaraes R L, Cavalcanti Brandao L A, Eleutério de Souza P R, et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol.* 2009. 40(1):1–11.
81. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013. 133(3):e6
82. Green R M, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2019.
83. Artika I M, Dewi Y P, Nainggolan I M, et al. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel).* 2022. 13(12):2387.
84. Bénéjat L, Ducournau A, Lebours P, Mégraud F. Real-Time PCR for *Helicobacter pylori* diagnosis. The best tools available. *Helicobacter.* 2018. 23(5):e12512.

85. Tang H L, Li Y, Hu Y F, Xie H G, Zhai S D. Effects of CYP2C19 loss-of-function variants on the eradication of *H. pylori* infection in patients treated with proton pump inhibitor-based triple therapy regimens: a meta-analysis of randomized clinical trials *PLoS ONE*. 2013. 8, e62162
86. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007. 20, 280–322
87. Mucignat G, Baragiotta A M, Benedetti G, Lagatta A, Crovatto M. Evaluation of the “CLARI-RES ASSAY” by real-time for the detection of clarithromycin -resistant *Helicobacter pylori* in the upper gastrointestinal biopsies. *Microbiologia medica*. 2010. Vol 25 (4).
88. *H. pylori* + Clarithromycin resistance. VIASURE Real Time PCR Detection Kits. *CerTest Biotec*. 2024.
89. Mommersteeg M C, Nieuwenburg S A V, Wolters L M M, Rooyers B H C M, et al. The use of non-invasive stool tests for verification of *Helicobacter pylori* eradication and clarithromycin resistance. *United European Gastroenterol J*. 2023. 11(9):894-903.
90. *H. pylori* and Multi-Antibiotic Resistance Real-Time PCR Kit. *Analitica advanced biomedicine*.
91. Iannone A, Giorgio F, Russo F, Riezzo G, Girardi B, et al. New fecal test for non-invasive *Helicobacter pylori* detection: A diagnostic accuracy study Clinical Trials Study. *World J Gastroenterol*. 2018. 24(27): 3021-3029.
92. Ebell, M H. *H. pylori* Eradication: Effective for Cure or Improvement of Functional Dyspepsia, Especially if Eradication Is Confirmed. *Am. Fam. Physician*. 2023. 107.
93. Giorgio F, Ierardi E, Sorrentino C, Principi M, Barone M, et al. *Helicobacter pylori* DNA isolation in the stool: An essential prerequisite for bacterial noninvasive molecular analysis. *Scand. J. Gastroenterol*. 2016. 51, 1429-1432.
94. Iannone A, Giorgio F, Russo F, Riezzo G et al. New fecal test for non-invasive *Helicobacter pylori* detection: A diagnostic accuracy study. *World J Gastroenterol*. 2018. 24, 3021-3029.
95. Losurdo G, Giorgio F, Pricci M, Girardi B, Russo F, et al. *Helicobacter pylori* Primary and Secondary Genotypic Resistance to Clarithromycin and Levofloxacin Detection in Stools: A 4-Year Scenario in Southern Italy. *Antibiotics*, 2020. 9, 723.
96. Losurdo G, Pricci M, De Bellis M, Celiberto F, et al. Effect of metronidazole resistance on *Helicobacter pylori* eradication regimens. *J. Dig. Dis*. 2022, 23, 561–567.
97. Mégraud, F. *H. pylori* antibiotic resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 2004. 53, 1374-1384.

98. Kaya A D, Ozturk C E, Akcan Y, Behcet M, Karakoc A E, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in symptomatic patients and detection of clarithromycin resistance using melting curve analysis. *Curr. Ther. Res.* 2007. 68, 151-160.
99. Oleastro M, Ménard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthélémy P, Mégraud, F. Real-Time PCR Assay for Rapid and Accurate Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41, 397-402.
100. Puz S, Innerhofer A, Ramharter M, Haefner M, Hirschl A M, Kovách Z, Rotter M, Makristathis A A. novel noninvasive genotyping method of *Helicobacter pylori* using stool specimens. *Gastroenterology.* 2008. 135, 1543-1551.
101. Dore M P, Lu H, Graham D Y. Role of bismuth in improving *Helicobacter pylori* eradication with triple therapy. *Gut.* 2016. 65, 870-878.
102. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park J Y, et al. . Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016. 43, 514-533.
103. Argueta E A, Alsmman M A, Moss S F, D'agata E M. Impact of Antimicrobial Resistance Rates on Eradication of *Helicobacter pylori* in US Population. *Gastroenterology.* 2021. 2181-2183.e1.
104. Goodbole G, Mégraud F, Bessède E. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2020. 25 (Suppl. S1), e12735.
105. Bénéjat L, Ducournau A, Lehours P, Mégraud F. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* diagnosis. The best tools available. *Helicobacter.* 2018. 23, e12512.
106. Costa S, Soares J B, Goncalves R. R. Efficacy and tolerability of culture-guided treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017. 29, 1258 – 1263.
107. Yuen B, Zbinden R, Fried M, Bauerfeind P, Bernardi M. Cultural Recovery and Determination of Antimicrobial Susceptibility in *Helicobacter pylori* by Using Commercial Transport and Isolation Media. *Infection.* 2005. 33, 77-81.
108. Taylor K J, Edward-Jones V, Armitage M. Metronidazole sensitivity testing of *Helicobacter pylori*: The importance of media. *Br. J. Biomed. Sci.* 1998. 55, 118-122.
109. Nguyen T C, Le G K N, Pham D T H, Van Pham B, et al. Antibiotic resistance and heteroresistance in *Helicobacter pylori* isolates from symptomatic Vietnamese children: A prospective multicenter study. *Helicobacter.* 2023. 28, e13009.

110. Sun L, Talarico S, Yao L, He L, Self S, You Y, et al. Droplet Digital PCR-Based Detection of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates Reveals Frequent Heteroresistance. *J. Clin. Microbiol.* 2018. 56, e00019-18
111. Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia E S, Galante A, Favalli C. Detection of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* in Stool Samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41, 3636–3640.
112. Brennan D E, Omorogbe J, Hussey M, Tighe D, Holleran G, et al. Molecular detection of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in stool vs biopsy samples. *World J. Gastroenterol.* 2016. 22, 9214–9221.
113. Marrero Rolon R, Cunningham S A, Mandrekar J N, Polo E T, Patel R. Clinical evaluation of a Real-Time PCR assay for simultaneous detection of *Helicobacter pylori* and genotypic markers of Clarithromycin resistance directly from stool. *J. Clin. Microbiol.* 2021, 59, e03040-20.
114. Celiberto F, Losurdo G, Pricci M, Girardi B, Marotti A, Di Leo A, Ierardi E. The state of art of molecular fecal investigations for *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) antibiotic resistances. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24, 4361.
115. Nogouchi N, Rimbara E, Kato A, Tanaka A, Tokunaga K, et al. Detection of mixed clarithromycin-resistant and susceptible *Helicobacter pylori* using nested PCR and direct sequencing of DNA extracted from feces. *J Med. Microbiol.* 2007. 56 Pt 9, 1174-1180.
116. Ng H Y, Leung W K, Cheung K S. Antibiotic Resistance, Susceptibility Testing and Stewardship in *Helicobacter pylori* Infection. *Int J. Mol. Sci.* 2023. 24, 11708.
117. Li S, Li J, Dong X, Tegn G, Zhang W, et al. The effect of previous eradication failure on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*: A retrospective stud over 8 years in Beijing. *Helicobacter.* 2021. 26, e12804.
118. Kocsmár É, Buzàs G M, Szirtes I, Kocsmár I, Kramer Z, et al. Primary and secondary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and mathematical modeling of the role of macrolides. *Nat. Commun.* 2021. 12, 2255.
119. Tuzun Y, Bayan K, Yilmaz S, Dursun M, Ozekinci T. The prevalence of primary and secondary *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and probable contributing cofactors: Data from southeastern Anatolia. *Hepatogastroenterology* 2008. 55, 289–293.
120. Wang Y M, Chen M Y, Chen J, Zhang X H, Feng Y, Han Y X, Li Y L. Success of susceptibility-guided eradication of *Helicobacter pylori* in a region with high secondary clarithromycin and levofloxacin resistance rates. *World J. Gastroenterol.* 2024. 30, 184–195.

121. Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010. 8, 59–70.
122. Karczewska E, Wojtas-Bonior I, Sito E, Zwolińska-Wcisło M, Budak A. Primary and secondary clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to *Helicobacter pylori* in southern Poland. *Pharmacol. Rep.* 2011. 63, 799–807.
123. Lee J Y, Kim N, Nam R H, Choi S I, Lee J W, Lee D H. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 to 2018. *Helicobacter.* 2019. 24, e12660.
124. Nezami B G, Jani M, Alouani D, Rhoads D D, Sadri N. *Helicobacter pylori* Mutations Detected by Next-Generation Sequencing in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Gastric Biopsy Specimens Are Associated with Treatment Failure. *J. Clin. Microbiol.* 2019. 57, e01834-18.
125. Egli K, Wagner K, Keller P M, Risch L, Risch M, Bodmer T. Comparison of the Diagnostic Performance of qPCR, Sanger Sequencing, and Whole-Genome Sequencing in Determining Clarithromycin and Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020. 10, 596371.
126. Xiong M, Aliaberi H S M, Ansari N K, Sun Y, Yin S, et al. Phenotype and genotype analysis for *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in outpatients: A retrospective study. *Microbiol. Spectr.* 2023. 11, e0055023.