

Tendens till ökning av resistens mot klaritromycin

Under åren 1990–96 undersöktes resistensutvecklingen hos *Helicobacter pylori*-isolat från tio kliniskt mikrobiologiska laboratorier. Resultaten visar en tendens till ökning av klaritromycinresistensen. I studien ingick även en jämförelse av tre metoder för resistensbestämning. Som rutinmetod för bestämning av resistens hos *Helicobacter pylori* rekommenderas här »E-test«.

Antibiotikabehandling vid magsår har idag blivit ett etablerat behandlingsalternativ i Sverige. Den trippelbehandling som rekommenderas av Läkemedelsverket omfattar två antibiotika (amoxicillin, klaritromycin, metronidazol) kombinerade med en protonpumpshämmare (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol).

I en nyligen publicerad artikel i Läkartidningen redovisas antibiotikaresistens hos *Helicobacter pylori*-stammar i Göteborgsområdet i en prospektiv studie [1]. I ett öppenvårdsmaterial undersöktes över 200 konsekutiva patienter som remitterats för endoskopiundersökning. Ingen av dessa patienter hade tidigare behandlats för *Helicobacter pylori*-infektion.

I denna studie framkom att cirka 3 procent av stammarna var resistenta mot makrolider och 40 procent av stammarna var resistenta mot metronidazol. Ingen resistens mot amoxicillin eller tetracyclin kunde påvisas. Resistensnivån inom denna region i Sverige var således låg, men i artikeln påpekades att detta inom några år kan förändras drastiskt.

Vi har i en retrospektiv studie kartlagt resistensutvecklingen hos *Helicobacter pylori* i Sverige under åren 1990–96. Vi ville även i samråd med »Referensgruppen för antibiotikafrågors metodgrupp» ta fram underlag för rekommendationer om lämplig resistensbestämningsmetod.

De kliniskt mikrobiologiska laboratorier i Gävle, Kalmar, Linköping, Lund, Malmö, Uppsala, Visby, Väs-

terås, Växjö och Örebro deltog i studien. Materialet som undersöktes var kliniska *Helicobacter pylori*-isolat, som förvarats frysta vid varje laboratorium. De tio första isolaten från vart och ett av åren 1990–96 skickades in till Smittskyddsinstitutet. Isolaten skulle ej häröra från patienter som tidigare behandlats för *Helicobacter pylori*-infektion. Alla laboratorier hade inte tio isolat från alla år sparade och ett antal av de inskickade isolaten växte ej upp på Smittskyddsinstitutet. Totalt kunde vi odla fram och resistensbestämma 415 isolat.

Metoder för resistensbestämning

Tre olika metoder för resistensbestämning jämfördes: MIC-bestämning (minsta inhiberande koncentration) med agarspädning och med E-test (en kommersiellt tillgänglig testmetod, AB Biodisk), samt diskdiffusion. Fyra antibiotika som används vid behandling av *Helicobacter pylori*-infektion testades: ampicillin (representerar amoxicillin), klaritromycin, tetracyclin och metronidazol.

Agarspädningsmetoden, som är referensmetod för resistensbestämning och bygger på fasta koncentrationer av antibiotika i agarplattor, modifierades för att passa långsamväxande *Helicobacter pylori*. Odlingen utfördes på PDM-agar (AB Biodisk) med 5 procent hästblod. Stammarna suspenderades i fosfatbuffert till cirka $5 \cdot 10^8$ bakterier/ml. Med hjälp av en replikator applicerades 1–2 µl av suspensionen på en serie plattor med stegvis stigande koncentrationer av antibiotika. För diskdiffusion och E-test spreds suspensionen på agarplattor. E-test utgörs av en plastremsa med en koncentrationsgradient av antibiotika. MIC-värden mot-

Författare

KARIN WREIBER

fil mag, forskningsassistent

BARBRO OLSSON-LILJEQUIST

docent, chefsmikrobiolog

LARS ENGSTRAND

docent, laborator; samtliga Smittskyddsinstitutet, Solna.

svarande de spädningssteg som används i agarspädningsmetoden kan avläsas där hämningszonen korsar remsan. Plattorna inkuberades mikroaerofilt (5 procent O₂, 10 procent CO₂) 3–4 dygn. Vid tolkning av resultaten användes gränsvärden för MIC enligt SIR-systemet (S=sensitiv, I=intermediär, R=resistent)-systemet.

Diskdiffusion gav svåravlästa zoner

Resultaten av MIC bestämt med E-test överensstämde väl med MIC med agarspädningsmetoden för både klaritromycin och tetracyclin, men något sämre för ampicillin, där två spädningsstegs skillnad var vanligt (Tabell I). Vi såg en tendens till något lägre MIC med E-test än med agarspädning, utom för metronidazol där det var tvärtom. Dessa skillnader medförde inte en felaktig tolkning av resultatet annat än för metronidazol, där andelen resistenta stammar blev betydligt större med E-test än med agarspädning. Tänkbara förklaringar diskuteras nedan.

Flera tidigare jämförande studier har visat att E-test är en lämplig metod för resistensbestämning av *Helicobacter pylori* [2–4]. Diskdiffusion gav generellt stora zoner som var svåra att läsa av, trots att vi valt antibiotikalapp med

Tabell I. Jämförelse mellan MIC-bestämning med agarspädning och MIC-bestämning med E-test för alla isolat. Tabellen visar andelen isolat där resultatet skilde sig åt mellan dessa båda metoder med mindre än eller lika med ett respektive två spädningssteg.

| Antibiotikum | ≤1 spädningssteg | ≤2 spädningssteg |
|---------------|------------------|------------------|
| Ampicillin | 51 procent | 90 procent |
| Klaritromycin | 86 procent | 97 procent |
| Tetracyclin | 75 procent | 97 procent |
| Metronidazol | 41 procent | 60 procent |

Tabell II. Antalet klaritromycinresistenta isolat varje år relaterat till det totala antalet isolat från samma år. Alla tre resistensbestämningsmetoderna gav samma resultat (gränsvärde för resistens MIC ≥ 2 mg/l).

| År | Antal isolat | Antal klaritromycinresistenta isolat |
|---------------|--------------|--------------------------------------|
| 1990 | 40 | 1 |
| 1991 | 38 | 0 |
| 1992 | 48 | 0 |
| 1993 | 58 | 2 |
| 1994 | 82 | 2 |
| 1995 | 74 | 1 |
| 1996 | 75 | 7 |
| Totalt | 415 | 13 |

mindre mängd antibiotika (2–5 μg) än normalt. Vår bedömning var att denna metod ej bör användas på grund av svåravlästa zoner och svårighet att jämföra resultaten med övriga metoder. För rutinmässig resistensbestämning av *Helicobacter pylori* rekommenderas därför E-test.

Hög resistens mot metronidazol

För metronidazol skilde sig resultaten åt mellan E-test och agarspädning ($S \leq 8$ mg/l, $R \geq 16$ mg/l). På grund av gles inväxt i hämningszonen lästes ofta det högsta värdet av MIC, 32 mg/l, med E-test. Denna inväxt gav upphov till så få kolonier med agarspädning att minsta hämmande koncentrationen där bedömdes som lägre. Resultaten av diskdiffusionsmetoden (metronidazol, 5 μg) korrelerade väl med MIC med E-test, men sämre med MIC med agarspädning. Detta berodde sannolikt på att avläsningen av växt i hämningszonen gjordes på likartat sätt för de två första metoderna, medan MIC med agarspädning bedömdes utifrån växt på en mycket liten yta.

Även om de två MIC-bestämningsmetoderna för vissa stammar gav olika resultat uppskattade vi andelen metronidazolresistenta isolat som relativt konstant under denna tidsperiod under givna testbetingelser. Resistensnivån låg i genomsnitt på 26 procent med agarspädningmetoden, men på 50 procent med E-test. Detta överensstämde med resultaten från Göteborgsstudien, där 40 procent av isolaten var resistenta mot metronidazol med E-test [1].

Metronidazolresistensens betydelse

Mekanismen för resistens mot metronidazol hos *Helicobacter pylori* är inte fastställd. Det krävs att bakterien uppnår en tillräckligt låg redoxpotential för att metronidazol skall kunna reduceras till den aktiva formen. Detta sker normalt endast i anaerob miljö, vilket kan förklara att bakterien ofta är resistent efter mikroaerofil inkubering.

Inkubationsmiljöns påverkan på in vitro-aktiviteten av metronidazol har beskrivits tidigare [5]. Vi upprepade dessa försök med ett dygns anaerob miljö följt av två dygns normal mikroaerofil inkubering av agarplattorna för tio stammar som varit resistenta efter enbart mikroaerofil inkubering och fann då att alla visade sig vara känsliga.

Då det finns studier som visat att in vitro-resistens mot metronidazol ej påverkar resultatet vid kombinationsbehandling med makrolid och protonpumpshämmare kan man ifrågasätta nyttan av att analysera metronidazolresistens hos *Helicobacter pylori* när denna typ av behandling används [6]. Vid behandling med andra typer av trippelterapi (vismut, metronidazol och amoxicillin eller tetracyklin) har däremot metronidazolresistens visat sig ha betydelse för behandlingsresultatet [7].

Ingen resistens mot ampicillin och tetracyklin

Inga isolat i vårt material var resistenta mot ampicillin ($S \leq 0,5$ mg/l, $R \geq 2$ mg/l, eller tetracyklin ($S \leq 2$ mg/l, $R \geq 4$ mg/l). Det finns idag inga studier som visat att amoxicillinresistenta *Helicobacter pylori* förekommer. Däremot finns enstaka stammar med något högre MIC-värden än normalt (0,25–0,5 mg/l), vilket vi också fann. Tetracyklinresistens har observerats hos enstaka stammar i Storbritannien och Australien [8]. Resistensmekanismen är ännu ej undersökt.

Ökar makrolidresistensen?

Klaritromycinresistens är en vanlig orsak till att eradikering av *Helicobacter pylori* misslyckas. I cirka 90 procent av fallen beror resistensen på någon av två punktmutationer i bakteriens 23S rRNA. Dessa mutationer leder till konformationsförändringar som gör att makroliden inte kan binda till ribosomerna och därmed förhindra bakteriens proteinsyntes.

Totalt 13 stammar i denna studie var resistenta mot klaritromycin ($S \leq 0,5$

mg/l, $R \geq 2$ mg/l). De resistenta stammarna var spridda mellan laboratorier. Flertalet var isolerade under 1996, vilket antyder en ökning av resistensen sedan klaritromycin introducerades i Sverige 1992 (Tabell II). Även korsresistens med andra makrolider kan ha betydelse. Vid närmare efterforskningar har det visat sig att två av de sju patienterna med resistenta *Helicobacter pylori*-stammar från 1996 hade behandlats med klaritromycin innan stammarna isolerades.

I Frankrike, där användningen av makrolider länge varit hög, har också andelen klaritromycinresistenta *Helicobacter pylori*-stammar varit cirka 10 procent de senaste åren. I Belgien har man sett en ökning från 1,7 procent före 1992 till cirka 10 procent under senare år [8].

Fortsatta studier

Den tendens till ökning av klaritromycinresistens som vi sett under 1996 medför att vi bör följa uppkomst och spridning av makrolidresistens hos *Helicobacter pylori* även framöver. Smittskyddsinstitutet kommer därför att fortsätta med konsekutiva insamlingar av *Helicobacter pylori*-isolat från patienter som inte tidigare behandlats med trippelregim inkluderande klaritromycin.

Vad gäller metod för resistensbestämning av *Helicobacter pylori* så rekommenderar vi E-test. Nyttan av att bestämma metronidazolresistens vid kombinationsbehandling med makrolid är dock tveksam. Fler studier kring metronidazolresistensens betydelse behövs dock innan några generella slutsatser kan dras. Helt klart är att diskdiffusion inte är ett fullgott alternativ, eftersom denna metod ger stora svåravlästa zoner och ett osäkert resultat.

Vi följer också den pågående europeiska ambitionen att standardisera resistensbestämningsmetoder. Resultat från dessa förhandlingar kommer att presenteras på vår hemsida (www.smittskyddsinstitutet.se).

*

Följande personer på de kliniskt mikrobiologiska laboratorerna deltog i insamlandet av isolat: *Håkan Gnarpe*, Länssjukhuset, Gävle; *Ingvar Eliasson*, Länssjukhuset, Kalmar; *Lennart Nilsson*, Universitetssjukhuset, Linköping; *Ann-Cathrine Pettersson*, Universitetssjukhuset Lund; *Mats Walder*, Universitetssjukhuset MAS, Malmö; *Ulla Zettersten*, Akademiska sjukhuset, Uppsala; *Inger Törnblom*, Lasarettet, Visby; *Ivo Mares*, Centrallasarettet, Västerås; *Gunnar Kahlmeter*, Centrallasarettet, Växjö; *Dan Danielsson*, Regionsjukhuset, Örebro.

Referenser

1. Jaup BH, Brandberg Å, Stenquist B, Norrby A. Antibiotikaresistens hos stammar av *Helicobacter pylori* i Göteborg: Bakterierna resistenta mot metronidazol. *Läkartidningen* 1998; 95: 279-81.
2. Glupczynski Y, Labbé M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2072-5.
3. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh Å. The E test for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 65-71.
4. Piccolomini R, di Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1842-6.
5. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh Å. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 115-20.
6. Moayyedi P, Sahay P, Tompkins DS, Axon ATR. Efficacy and optimum dose of omeprazole in a new 1-week triple therapy regimen to eradicate *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 835-40.
7. Noach LA, Langenberg WL, Bertola MA, Dankert J, Tytgat GNJ. Impact of metronidazole resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 321-7.
8. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 suppl 1: 43-53.

Summary

Development of resistant *Helicobacter pylori* in Sweden; tendency toward increasing resistance to clarithromycin

Karin Wreiber, Barbro Olsson-Liljequist, Lars Engstrand

Läkartidningen 1999; 96: 582-4

This study was designed to investigate the development of antibiotic resistance in Swedish *H pylori* isolated 1990-96. A total of 415 isolates collected from 10 clinical microbiology laboratories were examined. Three different methods of susceptibility testing were compared: agar dilution, the E-test and disc diffusion. None of the isolates was resistant to ampicillin or tetracycline, but approximately 30 per cent were resistant to metronidazole. An increase in resistance to clarithromycin was noted during 1996 (9% resistant strains), though the significance of this finding needs further investigation. The comparison of susceptibility tests suggested disc diffusion to be of doubtful value, but the E-test to be appropriate for testing *H pylori*. However, the number of isolates resistant to metronidazole was higher with the E-test than with agar dilution. The value of testing susceptibility to metronidazole is discussed.

Correspondence: Associate Professor Lars Engstrand, Swedish Institute for Infectious Disease Control, SE-171 82 Solna, Sweden. E-mail: lars.engstrand@smi.ki.se

KORTKLIPPT

Trippelterapi vid dyspepsi hjälper inte 70 procent

Är eliminering av *Helicobacter pylori* till nytta för patienter som besväras av sk funktionell dyspepsi, dvs inte har magsår? Två studier ger motstridande svar på den frågan (*New England Journal of Medicine* 1998; 339: 1869-81, 1928-30).

I en brittisk undersökning ledde en tvåveckorskur med omeprazol och två antibiotika till att 21 procent av de 154 patienterna sluppit besvären ett år senare mot 7 procent bland dem som fick enbart omeprazol. Effekten var bäst bland dem som haft besvär länge. En multicenterstudie med liknande uppläggning, men hälften så lång kur, visade emellertid inte någon signifikant skillnad i symtomlindring (27,4 efter trippelkur mot 20,7 procent av dem som fått enbart omeprazol).

Enligt en ledarkommentar innebär eliminering av *H pylori* uppenbarligen inte ett genombrott vid dyspepsi, eftersom mer än 70 procent inte blev hjälpta av terapin. Skillnaden i effekt mellan studierna kan bero på att varken de inkluderade grupperna eller sättet att mäta symptom var identiska. Andra studier har visat att magsår utvecklas hos omkring 15 procent av *H pylori*-infekterade patienter som först får diagnosen funktionell dyspepsi.

Ledarskribenten förordar diagnostisk endoskopi för dyspepsi-patienter över 45 år och även för yngre som har andra riskfaktorer för cancer, inklusive oförklarlig viktneidgång, kräkningar, dysfagi, gastrointestinal blödning eller anemi. För övriga patienter 45 år och yngre kan det vara kostnadseffektivt att efter serologiska test för *H pylori* eliminera infektionen, om inte endoskopi är billigt och lätt tillgängligt. För alla bör man förstås först leta efter andra orsaker som livsstil, kost- och miljöfaktorer.

Rapporter om ulcus-psykosomatiskens död är våldsamt överdrivna. Inte heller vid ulcus är det bara fråga om *H pylori* och icke-steroida antiinflammatoriska medel, understryker en kvartett skribenter i en översikt om stress och magsår (*JAMA* 1999; 281: 10-1). Allt fler studier klarlägger biologiska mekanismer som kan förklara samband mellan magsår och stress, rökning, alkoholmissbruk och sömnbrist. Stress kan försämra immunfunktion, blodflöde och gastrointestinal motilitet, och dessutom påverkas hormoner, cytokiner etc. Sår-läkningen försämras och tillväxten av *H pylori* främjas.

Nya medel mot influensa slår mot både A- och B-typ

Ännu en begränsad studie av den nya gruppen av antivirala medel – hämmare av influensavirusenzymet neuraminidas – bekräftar tidigare lovande resultat. Medlen kan förkorta symtomtiden med 1,5 dag vid både influensa typ A och B, medan amantadin och rimantadin inte verkar mot virus av B-typen. De nya medlen måste emellertid ges inom 30 timmar efter symtomdebuten, och även om biverkningsrisken förfaller vara liten har de inte prövats på äldre, som drabbas hårdast av en infektion.

I den nya studien, som är randomiserad, dubbelblind och placebokontrollerad, prövades neuraminidashämmaren zanamivir på drygt 200 patienter som fick det inom 36 timmar efter symtomdebuten. Medlet inhalerades två gånger per dag under fem dagar. Bäst effekt nåddes hos högriskpatienter: 2,5 dagars förkortad symtomtid, färre komplikationer och mindre bruk av antibiotika (*Lancet* 1998; 352: 1872-3, 1877-81).

Kontrollera njurfunktionen när äldre tar ACE-hämmare

Fall av uremi i samband med behandling med ACE-hämmare förekommer fortfarande och upptäcks ofta sent därför att man missar att kontrollera njurfunktionen hos sårbara, ofta äldre patienter, särskilt när de drabbas av nya sjukdomar. Den slutsatsen dras i en studie, där 69 procent av 400 brittiska allmänläkare besvarade en postenkät. Denna kompletterades med journalstudier i en allmänläkarpraktik och på en njurmedicinsk klinik (*BMJ* 1999; 318: 234-7).

Av allmänläkarna kontrollerade 85 procent enligt enkäten njurfunktionen innan de satte in ACE-hämmare men bara 34 procent vid en senare tidpunkt; 15 procent gjorde det aldrig. Journalstudierna avslöjade ännu lägre kontrollfrekvens. 7 procent av de 135 uremifallen på kliniken ansågs vara orsakade av behandling med ACE-hämmare. Hos ingen av dessa patienter hade njurfunktionen kontrollerats tidigare.

Frågan om hur omfattande kontrollen bör vara har tidigare analyserats i *BMJ* (1998; 316: 1921), en analys som nu följs av kritiska inlägg (1999: 318: 257-8.)

Yngve Karlsson