

Simposio "Antimicrobials for GI Infections: Current and Future Developments"
tenutosi durante il 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia
a Bologna il 14-17 settembre 2011

Farmaci antibatterici per il trattamento delle infezioni intestinali: stato attuale e prospettive future

Introduzione

L'intestino umano rappresenta uno degli ecosistemi microbici con la maggiore densità di popolazione presente in natura. Nell'uomo le dimensioni del microbiota intestinale, con un carico di 10^{13} - 10^{14} microrganismi e un peso pari a circa 1 kg, superano di gran lunga quelle delle altre comunità microbiche associate alle superfici del corpo umano, e sono circa 10 volte superiori rispetto al numero totale delle cellule somatiche e germinali.

In termini quantitativi, esofago e stomaco presentano il carico batterico minore. Il normale microbiota esofageo è relativamente semplice in termini di composizione in specie, e i batteri predominanti, coltivabili, sono anaerobi facoltativi che derivano dalla cavità orale, quali streptococchi e lattobacilli (10^2 - 10^3 /cm² di superficie mucosale o /ml di aspirato luminale). Fatta eccezione per le poche ore immediatamente successive a un pasto, lo stomaco umano contiene solo livelli relativamente bassi di lattobacilli e di altri microrganismi acido resistenti (10^1 - 10^2 /ml di contenuto), generalmente provenienti dalla cavità orale. Il rapido flusso di materiale attraverso l'intestino tenue (con un tempo di transito del bolo alimentare compreso tra 2 e 4 ore) previene, in condizioni fisiologiche, una permanente colonizzazione microbica di questo tratto. Tuttavia, il numero di batteri

aumenta progressivamente lungo l'intestino parallelamente alla riduzione del potenziale ossidoriduttivo. L'intestino crasso rappresenta il sito del tratto gastrointestinale con il più alto numero di batteri e la maggiore diversità microbica (10^{11} - 10^{12} /ml di contenuto luminale, pari a circa il 60% della massa fecale). Si tratta per la maggior parte di anaerobi stretti, spesso non sporigeni, il 54-75% dei quali Gram-positivi.

La relazione tra la flora batterica e l'organismo umano è di tipo *mutualistico*, nella quale ciascuno dei due membri reca all'altro un vantaggio e ne trae al contempo un beneficio. L'organismo umano fornisce ai microrganismi un ambiente ideale (a pH e temperatura costanti), procura i nutrienti, garantisce l'anaerobiosi e un adeguato turnover cellulare. Essi da parte loro costituiscono un'importante linea di difesa contro i germi patogeni, attivano e modulano il sistema immunitario, sintetizzano vitamine e acidi grassi a catena corta (*short chain fatty acid*, SCFA), che derivano dal catabolismo delle fibre alimentari ed esercitano un effetto trofico sui villi intestinali, favoriscono l'eliminazione di sostanze oncogene e contribuiscono alla detossificazione di xenobiotici.

È facile immaginare come il potenziale metabolico di questa comunità microbica sia enorme, 10 volte più grande di quello di un sistema specializzato come il corpo

umano, e come d'altra parte l'alterazione di un tale potenziale possa determinare sia disturbi funzionali che vere e proprie patologie. Sono molte le condizioni cliniche, che – nell'apparato digerente – si associano ad alterazioni qualitative e/o quantitative della flora batterica, dalla gastrite cronica attiva all'ulcera da *Helicobacter pylori*, dalla sindrome dell'intestino irritabile alle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), dalla malattia diverticolare del colon alle intolleranze alimentari. Gli enterobatteri rappresentano quindi un importante *target* farmacologico per la terapia di molte patologie digestive.

Per fare il punto sullo stato attuale e sulle prospettive della terapia antimicrobica delle infezioni intestinali si è tenuto – durante il 35° Congresso della Società Italiana di Farmacologia, svoltosi a Bologna il 14-17 settembre 2011 – un Simposio dedicato all'argomento. Il Simposio è stato moderato dal Prof. Liberato Berrino e dal Prof. Francesco Rossi (entrambi della Seconda Università di Napoli) e ha visto la partecipazione di farmacologi e clinici. L'evento ha riscosso un notevole interesse sia da un punto di vista concettuale che pratico. Per rendere disponibili al medico di medicina generale le ultime novità in tema di antimicrobici intestinali, questa sezione riporta una sinopsi delle relazioni presentate.

Flora microbica e patologie digestive

Giovanni Barbara, Vincenzo Stanghellini
Dipartimento di Medicina Clinica,
Università di Bologna

Circa il 95% delle cellule del corpo umano sono di natura batterica. La flora batterica è principalmente localizzata a livello della cute e delle superfici mucose. La maggiore concentrazione di batteri, tuttavia, si ritrova nell'apparato digerente, dove essi costituiscono il cosiddetto *microbiota intestinale* (Fig. 1). A questo livello la loro distribuzione non è uniforme: nello stomaco, infatti, la concentrazione è molto bassa ($0-10^2$) per l'azione battericida dell'acido cloridrico, che rappresenta una vera e propria barriera che impedisce l'ingresso nel tubo digerente di molte specie batteriche. Lungo l'intestino tenue le concentrazioni crescono dal duodeno (10^2) verso l'ileo terminale (10^7-10^9). La concentrazione cresce notevolmente a livello del colon ($10^{11}-10^{12}$)

dove la flora batterica è rappresentata fondamentalmente da batteri anaerobi e Gram-negativi¹. Fino a non molti anni fa, la maggior parte delle nostre conoscenze sul microbiota intestinale derivava da studi effettuati su terreni di coltura. Tuttavia, è oggi noto che il 60-80% dei batteri intestinali non può essere coltivato *ex vivo*. Negli ultimi anni, metodiche di tipo molecolare hanno permesso di identificare un numero crescente di batteri gastrointestinali precedentemente non conosciuti e di ridisegnare pertanto l'albero filogenetico.

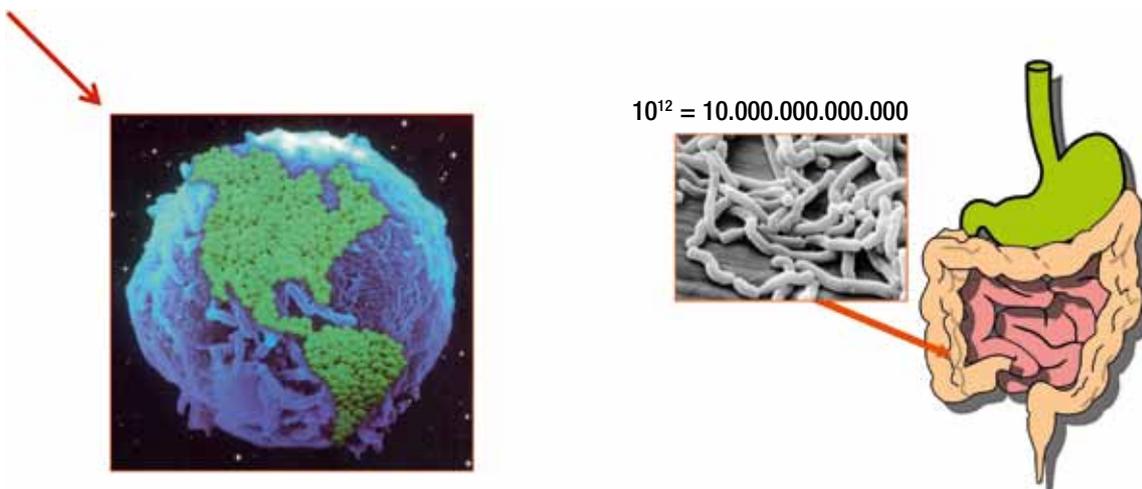
Uno studio recente², condotto in un'ampia casistica di soggetti di continenti diversi (Italia, Spagna, Giappone, America), ha evidenziato che vi sono due gruppi fondamentali di batteri, rappresentati da *Firmicutes* e *Bacteroides*, e una flora batterica subdominante (concentrazioni più basse) ma non per questo di minor importanza per le funzioni digestive. Valutazioni biostatistiche hanno permesso di identificare in questa casistica tre profili principali di batteri, rappresentati principalmente da *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococchi*. Questa classi-

ficazione in tre gruppi è risultata indipendente dalla nazionalità dei soggetti studiati e da altri fattori quali il *body mass index*, l'età o il sesso. Peraltro, è noto da tempo che fattori genetici e ambientali contribuiscono alla composizione della flora batterica gastrointestinale ovvero al tipo di batteri che colonizzano il tratto gastrointestinale. Entro pochi minuti dal parto, inizia la colonizzazione da parte dei germi dell'ambiente e in particolare della madre. A questo proposito risulta determinante la modalità con la quale avviene la nascita, ovvero i bambini nati con taglio cesareo hanno una flora batterica gastrointestinale più simile a quella della cute materna, mentre quelli nati con parto naturale hanno una flora batterica del tutto simile a quella vaginale³. Mentre, come atteso, non si riscontrano analogie tra la flora batterica dei bambini con quella orale della madre. Anche la dieta rappresenta uno dei fattori principali nella modulazione del microbiota intestinale. In particolare, studi recenti indicano come vi sia una significativa correlazione tra *Bacteroides*, ad esempio, e una dieta prevalentemente

FIGURA 1.

Interazione tra ospite e batteri.

- Il 95% delle cellule del corpo umano sono batteri
- I geni del microbiota sono 100 volte superiori ai geni umani
- I batteri sono correlati con la pelle e altre superfici mucosali
- I principali batteri sono associati al tratto gastrointestinale (microbiota intestinale)
- Il numero di batteri associati al tratto gastrointestinale è superiore al numero di persone sul pianeta



lipidica. Al contrario, una dieta ricca di carboidrati si associa a un'alta concentrazione di *Prevotella*⁴. Le modificazioni della dieta possono indurre repentini cambiamenti del microbiota intestinale, talora rilevabili anche dopo sole 24 ore. Anche i farmaci sono in grado di variare in modo significativo la flora batterica. Due studi indipendenti dimostrano come un breve ciclo di antibiotici (7 giorni di clindamicina o un breve ciclo di ciprofloxacina) possano modificare in modo significativo per un lungo periodo i profili del microbiota intestinale (oltre 2 anni in un caso, oltre 6 mesi nell'altro)^{5,6}. Gli inibitori della pompa protonica possono, invece, aumentare l'*overgrowth* batterico a livello del piccolo intestino, prevalentemente riducendo la funzione di barriera rappresentata dall'acido cloridrico all'ingresso di germi introdotti dal cavo orale o con la dieta⁷.

Il microbiota intestinale svolge numerose funzioni fisiologiche (Fig. 2, Tab. I). Esse sono state studiate prevalentemente in modelli animali *germ-free*, vale a dire in animali nati in condizioni di sterilità. Da que-

sti studi è emerso come il microbiota svolga funzioni metaboliche importanti come la produzione di acidi grassi a catena corta (dall'inglese *Short Chain Fatty Acids, SCFA*) e di vitamine (K, B1, B6, B12, acido folico); agisce, inoltre, sullo sviluppo del sistema immunitario intestinale ed extraintestinale, ha funzioni protettive contro i patogeni e sulla crescita batterica intestinale, rappresentando una vera e propria barriera difensiva⁸. È noto anche come il microbiota sia in grado di trasformare i residui vegetali in fonti di energia, agendo come un vero e proprio bioreattore. A tal proposito è stato suggerito come particolari profili della flora batterica si associno a un'eccessiva produzione di energia e assorbimento di calorie introdotte con la dieta in soggetti predisposti, contribuendo pertanto ad alcuni aspetti dell'obesità e a influenzare la distribuzione del grasso corporeo. Tuttavia è bene sottolineare che quest'ultimo aspetto, sebbene di estremo interesse, rimane tutt'oggi ancora controverso. Dati recenti dimostrano anche che il microbiota intestinale è in grado di

influenzare le funzioni digestive agendo sia sull'attività motoria gastrointestinale che a livello cerebrale⁹ e, in particolare, attraverso la modulazione dell'asse cervello-intestino. Uno studio condotto nel topo⁹ ha dimostrato, inoltre, come una gastroenterite infettiva possa modificare in modo significativo il profilo del microbiota intestinale.

L'analisi molecolare (16sRNA) del microbiota intestinale, condotta a vari intervalli di tempo dopo un'infezione da *Citrobacter rodentium* nel topo, dimostra modificazioni significative a lungo termine della flora batterica intestinale con un aumento delle *Enterobacteriaceae* e una significativa riduzione di *Bacteroides*. Il ruolo significativo della componente microbica nell'omeostasi intestinale è sostenuto da dati ottenuti in ambito pediatrico in bambini prematuri con enterocolite necrotizzante, condizione gravata da un'alta mortalità e associata a disbiosi intestinale. In questi piccoli pazienti, l'utilizzo di probiotici (principalmente lattobacilli e bifidobatteri) è in grado di ridurre significativamente la mortalità¹¹.

FIGURA 2.

Funzioni fisiologiche del microbiota (da Bäckhed et al., 2005, mod.)¹⁰.

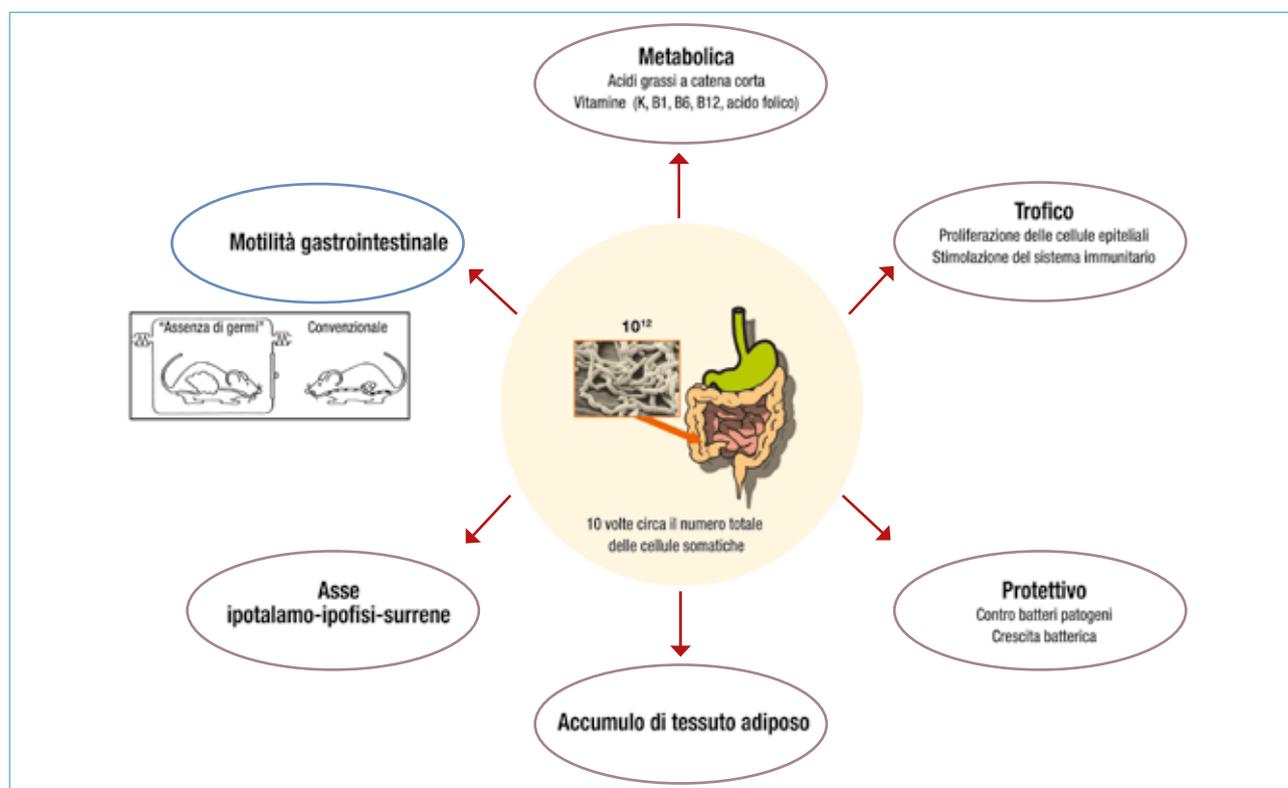


TABELLA I.
Effetti del microbiota nell'uomo.

Fisiologia	Condizioni patologiche
Sviluppo gastrointestinale	Infezioni gastrointestinali
Maturazione/stimolazione immunitaria	Enterocolite necrotizzante
Protezione contro gli agenti patogeni	Cancro colo-rettale
Digestione del polisaccaride	Malattia infiammatoria cronica intestinale
Assorbimento gastrointestinale	Proliferazione batterica nell'intestino tenue
	Sindrome dell'intestino irritabile
	Colite associata ad antibiotici
	Steatosi epatica
	Obesità
	Alterazione della sensibilità viscerale
	Disturbi psichici

Sebbene dibattuto, è stato proposto un ruolo protettivo di alcuni componenti del microbiota intestinale anche nelle varie fasi di sviluppo del cancro del colon, sia esso insorto in maniera classica (che prevede un iniziale stato iperproliferativo, la presenza di un microadenoma, quindi di un adenoma fino al cancro con alterazioni cromosomiche stabili) che correlato all'infiammazione intestinale (soprattutto nel cancro associato alle malattie infiammatorie intestinali che si sviluppa attraverso fasi di displasia di grado basso, moderato e alto). A conferma di tale ipotesi vi sono studi nell'animale *germ free* che dimostrano come l'assenza della componente microbica si associi maggiormente alla forma di cancro correlata a processi infiammatori cronici intestinali. I meccanismi collegati allo sviluppo del cancro coloretale e il ruolo del microbiota sono molto complessi e seguono fondamentalmente due vie: la prima coinvolge la produzione di enzimi batterici con sviluppo di carcinogeni che possono agire nella cellula a livello genetico, ovvero con modificazioni del DNA; l'altra dipende dall'attivazione di recettori specifici su queste cellule (MID88 e la via dell'infiammazione intestinale, NFκB e altre molecole che possono indurre la produzione di mediatori infiammatori e di

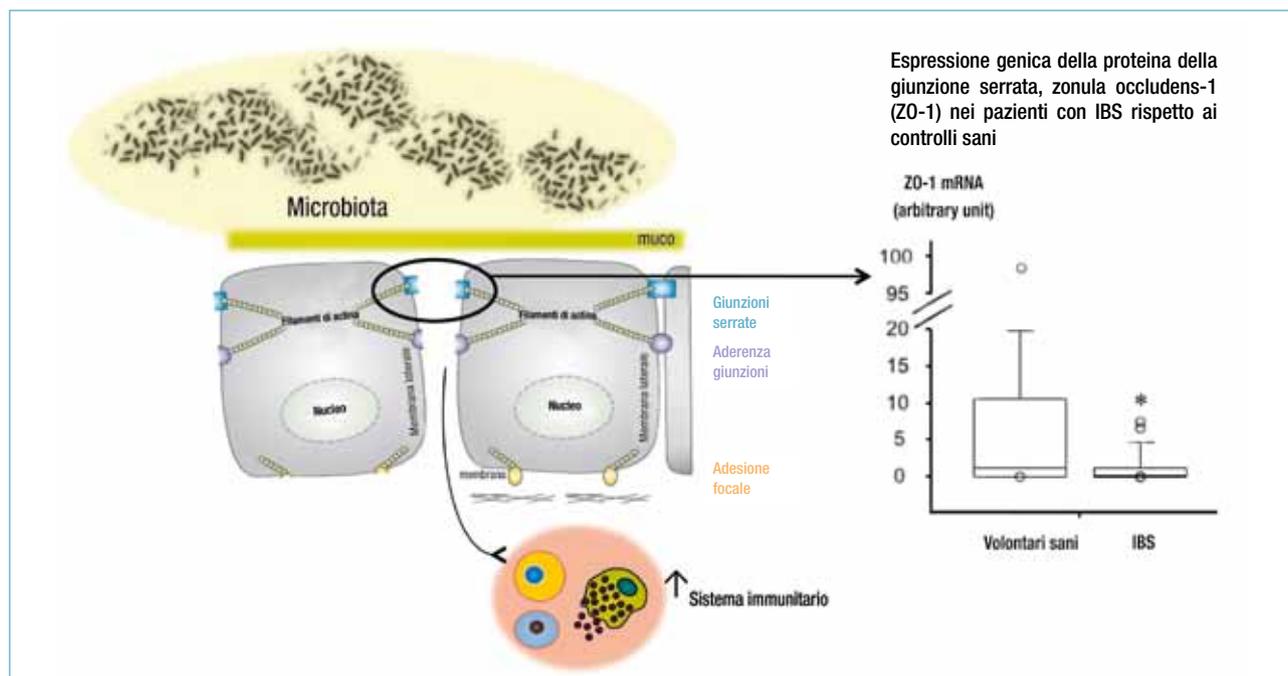
fattori di crescita)¹². Il ruolo del microbiota intestinale sembra essere centrale anche nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (morbo di Crohn e colite ulcerosa). Esistono nuove evidenze, infatti, derivate anche da dati clinici, che dimostrano come le lesioni delle malattie infiammatorie intestinali si localizzano prevalentemente nei siti di maggiore concentrazione batterica, come l'ileo terminale o il colon nel morbo di Crohn e nella colite ulcerosa. Inoltre, vi sono numerose prove a sostegno del concetto che modelli animali di infiammazione intestinale, allevati in condizioni *germ free*, non sviluppano le lesioni infiammatorie riscontrate, invece, nei topi cresciuti in condizioni normali¹³. Tali dati sono inoltre consolidati da evidenze, sebbene tutt'oggi non completamente esaustive, dell'efficacia della modulazione batterica (probiotici, antibiotici) nelle malattie infiammatorie intestinali (prevalentemente nel morbo di Crohn e nella paucite). Nella sindrome dell'intestino irritabile (*Irritable Bowel Syndrome*, IBS), una patologia molto comune, si ritiene che lo sviluppo dei sintomi sia legato fondamentalmente ad alterazioni a livello dell'asse cervello-intestino. Nella sua patogenesi possono infatti essere implicati sia fattori che coinvolgono il sistema nervoso centra-

le (come ad esempio ansia e depressione), che fattori periferici, come l'alterazione della motilità o un aumento della sensibilità viscerale. L'IBS post-infettivo rappresenta forse l'esempio più rilevante per comprendere il ruolo dei batteri (in questo caso patogeni) e delle modificazioni della flora batterica intestinale nella patogenesi dell'IBS. Infezioni acute da *Campylobacter*, salmonella, *Shigella* e altri agenti patogeni, si associano infatti allo sviluppo di IBS in circa il 10% dei pazienti esposti a tali infezioni. La gastroenterite infettiva acuta rappresenta di fatto oggi il maggior fattore di rischio per lo sviluppo di IBS. È stato stimato che l'IBS post-infettivo possa rappresentare fino al 10% di tutti i pazienti con sindrome dell'intestino irritabile. Nella patogenesi dell'IBS post-infettivo sono implicati fattori centrali (ansia, depressione, ipocondria) ma anche fattori periferici, come la gravità dell'evento infiammatorio intestinale iniziale e la persistenza di un processo infiammatorio di grado lieve a livello intestinale¹⁴.

I dati sul microbiota intestinale nell'IBS sono in continua espansione. Uno studio pubblicato recentemente¹⁵ dimostra che i pazienti con IBS hanno di fatto alterazioni significative del microbiota. L'analisi molecolare evidenzia come, rispetto ai controlli sani, il microbiota intestinale dei pazienti con IBS sia significativamente differente e sostanzialmente distinguibile in maniera netta da quello dei controlli. In questo e in altri studi sono state identificate anche correlazioni tra i profili del microbiota e profili sintomatologici, basati prevalentemente sull'alvo dei pazienti. Altri studi hanno inoltre documentato come vi sia un incremento della flora adesa all'epitelio intestinale nell'IBS rispetto ai controlli¹⁶. Dati recenti indicano inoltre come la flora adesa possa interagire con recettori specifici per varie strutture batteriche presenti a livello delle cellule epiteliali, e in particolare con il *Toll Like Receptor 4*, che risulta essere iperespresso in un'ampia proporzione di pazienti con IBS¹⁷. Le *defensine* sono peptidi con attività antimicrobica (dei veri e propri "antibiotici" prodotti dalle cellule di Paneth) che sono state recentemente implicate nella patogenesi sia delle malattie infiammatorie intestina-

FIGURA 3.

Barriera mucosa, microbiota e IBS (da Piche et al., 2009, mod.)²⁰.



li che dell'IBS. Infatti, le concentrazioni di defensina umana 2 risultano aumentate in entrambe le condizioni, suggerendo la presenza di un'alterazione nei rapporti tra microbiota e sistemi di difesa immunitaria intestinali^{18 19}.

Alcuni studi ipotizzano che la flora batterica potrebbe penetrare attraverso breccie dell'epitelio causate da una lassità delle giunzioni serrate tra le cellule epiteliali, che causano un aumento della permeabilità intestinale²⁰. Questo evento consentirebbe il passaggio di sostanze batteriche nella mucosa con stimolazione del sistema immunitario mucosale e conseguente induzione di una lieve infiammazione intestinale. Tale ipotesi è confermata da studi effettuati su biopsie di colon ottenute da pazienti con IBS con un incremento della permeabilità intestinale rispetto ai con-

trolli. Questa condizione si associa a una riduzione dell'espressione delle principali strutture delle giunzioni serrate epiteliali preposte al controllo della permeabilità. Inoltre, nell'IBS il numero di cellule infiammatorie risulta superiore rispetto ai controlli²¹ (Fig. 3). L'attivazione immunitaria presente in questi pazienti è verosimilmente importante nella genesi dei sintomi e ha un'influenza sulla fisiologia e sulla sensibilità viscerale intestinale. È stato proposto che alcune delle alterazioni descritte nell'IBS possano essere ridotte dall'utilizzo di antibiotici non assorbibili, probiotici o anche di inibitori di molecole con attività infiammatoria.

Il microbiota intestinale ha dunque assunto un ruolo di crescente importanza in varie patologie sia gastrointestinali che extraintestinali. Questi studi suggeriscono come la

flora batterica intestinale interagisca con il sistema immunitario della mucosa, e come le alterazioni del microbiota intestinale comportino modificazioni dell'epitelio, con un aumento della permeabilità, alterazioni della fisiologia intestinale e della risposta neuronale locale o sistemica, mediante attivazione di vie sensoriali molto importanti nello sviluppo dei sintomi. Vari studi clinici controllati e studi sperimentali stanno oggi fornendo risultati incoraggianti per quanto riguarda la modulazione del microbiota nelle patologie intestinali. Tra gli approcci più promettenti si annoverano l'impiego di probiotici e prebiotici, utilizzati per le loro proprietà stimolanti sulla flora batterica intestinale con effetto benefico sulle funzioni intestinali e gli antibiotici non assorbibili come la rifaximina.

Bibliografia

- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:13780-5.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature 2011;473:174-80.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:11971-5.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science 2011;334:105-8.
- Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, et al. *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. ISME J 2007;1:56-66.
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. *The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing*. PLoS Biol 2008;6:e280.

- ⁷ Lombardo L, Foti M, Ruggia O, et al. *Increased incidence of small intestinal bacterial overgrowth during proton pump inhibitor therapy.* Clin Gastroenterol Hepatol 2010;8:504-8.
- ⁸ Barbara G, Stanghellini V, Brandi G, et al. *Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease.* Am J Gastroenterol 2005;100:2560-8.
- ⁹ Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. *Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae.* Cell Host Microbe 2007;2:204.
- ¹⁰ Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. *Host-bacterial mutualism in the human intestine.* Science 2005;307:1915-20.
- ¹¹ Lin HC, Su BH, Chen AC, et al. *Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants.* Pediatrics 2005;115:1-4.
- ¹² Arthur JC, Jobin C. *The struggle within: microbial influences on colorectal cancer.* Inflamm Bowel Dis 2011;17:396-409.
- ¹³ Maloy KJ, Powrie F. *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease.* Nature 2011;474:298-306.
- ¹⁴ Spiller R, Garsed K. *Postinfectious irritable bowel syndrome.* Gastroenterology 2009;136:1979-88.
- ¹⁵ Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, et al. *Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome.* Gastroenterology 2011;141:1792-801.
- ¹⁶ Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, et al. *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease.* J Clin Microbiol 2005;43:3380-9.
- ¹⁷ Brint EK, MacSharry J, Fanning A, et al. *Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome.* Am J Gastroenterol 2011;106:329-36.
- ¹⁸ Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa.* Semin Immunol 2007;19:70-83.
- ¹⁹ Langhorst J, Junge A, Rueffer A, et al. *Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome.* Am J Gastroenterol 2009;104:404-10.
- ²⁰ Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. *Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators.* Gut 2009;58:196-201.
- ²¹ Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, et al. *Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms.* Am J Gastroenterol 2009;104:392-400.

Antibiotici per le infezioni gastrointestinali: possibilità attuali e prospettive future

Francesco Scaglione
Dipartimento di Farmacologia,
Chemioterapia e Tossicologia,
Università di Milano

Ancora oggi, anche nei Paesi industrializzati, la diarrea costituisce un problema molto importante e non molte sono le differenze per quanto riguarda le infezioni gastrointestinali tra paesi industrializzati e Paesi in via di sviluppo (a esclusione del tifo addominale).

Intestino e rene sono gli organi regolatori della cinetica dell'acqua. Nell'intestino, vengono secreti e riassorbiti circa 50 l di acqua al giorno. Se dunque vi è un'alterazione del riassorbimento, si può correre il rischio di perdere addirittura 50 l di acqua al giorno. Nella diarrea grave, la mortalità è elevatissima. La reidratazione costituisce senza dubbio un mezzo indispensabile per il suo trattamento: 90 millimoli/l di sodio, 20 millimoli/l di potassio, 80 millimoli/l di cloruro, 30 millimoli/l di bicarbonato e 111 millimoli/l di glucosio possono ridurre notevolmente la mortalità per diarrea. Senza

l'idratazione non è ipotizzabile l'impiego di nessun farmaco antimicrobico (anche la mortalità per tifo addominale è stata ridotta grazie all'idratazione).

Quasi tutti i patogeni intestinali interferiscono con questo meccanismo di riassorbimento dell'acqua producendo tossine (ad esempio, Stafilococco, *Escherichia coli* enteroemorragica). Alcuni patogeni producono tossine che hanno anche un effetto necrotizzante (vi è un meccanismo misto: vale a dire il germe produce una tossina che altera il riassorbimento dell'acqua ma invade anche la mucosa; ad esempio *Shigella*, *Clostridium difficile*, alcuni ceppi di *Escherichia coli*).

Nel primo caso, ovvero quando si produce la tossina senza che vi sia invasione, l'antibiotico risulta perlopiù inutile; nell'infezione mista, invece, l'antibiotico è efficace (ma deve penetrare nella mucosa).

Una revisione della Cochrane ha analizzato quattro farmaci ¹, vale a dire il metronidazolo (ha buona concentrazione fecale, esposizione sistemica e apprezzabile penetrazione nella mucosa), la vancomicina (ha una concentrazione fecale elevata, un assorbimento sistemico trascurabile e una discreta concentrazione nella mucosa per retrodiffusione), la rifaximina (ha una concentrazione fecale elevata, un assorbimento sistemico

trascurabile e una concentrazione discreta nella mucosa per retrodiffusione) e la bacitracina (si concentra solo nella massa fecale, vale a dire è un "topico puro": non ha assorbimento e non ha concentrazione nella mucosa).

Nell'infezione da *Clostridium difficile* (un'infezione enteroinvasiva con produzione di tossine), confrontando un farmaco antibiotico vs. placebo è emerso che il placebo non funziona. Dunque, l'antibiotico è necessario qualora vi sia un'invasione tissutale. Confrontando, invece, metronidazolo e vancomicina (vale a dire un farmaco con assorbimento sistemico, concentrazione fecale e intestinale rispetto a un farmaco solo con concentrazione fecale e intestinale) è emerso che non vi è quasi nessuna differenza nell'esposizione al farmaco, ma c'è differenza nell'eradicazione dell'infezione. Questo dimostra che una buona concentrazione fecale e intestinale è sufficiente e che non è necessario avere un'esposizione sistemica per ottenere un risultato terapeutico.

Confrontando rifaximina con vancomicina, è emerso che sono praticamente sovrapponibili, con risultati clinici e microbiologici identici. Analizzando rifaximina con bacitracina, quindi un farmaco che non ha assorbimento sistemico né penetrazione nella

mucosa, emerge che un topico puro non è sufficiente a eradicare l'infezione: non è sufficiente, dunque, un'azione battericida nel lume, ma è necessaria anche un'azione a livello della mucosa.

I trattamenti antibiotici sono raccomandati anche nella diarrea del viaggiatore (infezione mista), nella shigellosi, nell'infezione da *Campylobacter* e nella febbre tifoide.

Nelle infezioni intestinali è molto importante non utilizzare farmaci che riducano la motilità: è importante, infatti, non tanto ridurre la diarrea, ma eliminare le tossine responsabili del danno (in un'infezione da *Escherichia coli* enteroemorragica, per esempio, utilizzare un farmaco che riduce la motilità, come loperamide, può addirittura favorire un esito fatale).

Per quanto riguarda l'infezione da *Shigella*, gli antibiotici raccomandati sono trimetoprim, fluorochinoloni, rifaximina, acido nalidixico e ceftriaxone. Nelle salmonellosi, la terapia antibiotica dovrebbe essere riservata soltanto ai bambini, a soggetti con più di 50 anni di età che abbiano protesi valvolari o altri fattori di rischio e a soggetti immunocompromessi (i farmaci indicati sono trimetoprim, cotrimoxazolo e rifaximina).

Nella febbre tifoide i farmaci di scelta sono i fluorochinoloni; particolarmente utile risulta anche il cloramfenicolo, il cui assorbimento avviene per via linfatica (proprio dove le salmonelle si sviluppano). La febbre tifoide è una malattia sistemica: spesso si ha un'invasione che determina sepsi e per questo motivo il trattamento con antibiotici a distribuzione fecale o intestinale non serve, ma è necessario utilizzare antibiotici sistemici.

L'infezione da *Campylobacter* rappresenta un problema emergente nei Paesi industrializzati. È infatti un'infezione sempre più frequente non solo nei bambini ma anche negli adulti. Il farmaco di scelta è l'eritromicina; per quanto riguarda i fluorochinoloni è emersa, invece, resistenza. Una valida alternativa è rappresentata certamente dalla rifaximina.

L'infezione da *Escherichia coli* enterotossica generalmente non necessita di trattamenti; qualora vi sia una diarrea particolarmente grave, sono indicati fluorochinoloni e rifaximina, così come per l'infezione da *Escherichia coli* enteropatogena ed *Escherichia coli* enteroinvasi-

va. *Escherichia coli* enteroemorragica ha, invece, acquisito una tossina necrotizzante (in questo caso il rischio di mortalità è elevato). Essa determina delle vere e proprie epidemie. I dati sulla terapia antibiotica sono contrastanti; tuttavia, è certo che non devono essere impiegati farmaci antimotilità, mentre è necessario idratare per via perfusionale e per via orale.

Aeromonas e *Pseudomonas* non sono patogeni per l'uomo. Sono germi che vivono nell'acqua, anche in quella potabile. Solitamente aumentano soltanto la consistenza delle feci, ma possono provocare patologie in soggetti particolarmente immunocompromessi (pazienti con neoplasie e leucemie). Il trattamento con cotrimoxazolo, fluorochinoloni o rifaximina solitamente è risolutivo.

Anche nel caso di infezioni da *Yersinia*, gli antibiotici non sono necessari a meno che non ci si trovi di fronte a soggetti particolari nei quali sono indicati doxiciclina, aminoglicosidi, trimetoprim, fluorochinoloni. L'infezione da *Vibrio cholerae*, invece, può condurre a morte per disidratazione in 7-8 ore. La tossina prodotta blocca, infatti, il riassorbimento dell'acqua. Senza dubbio l'idratazione è indispensabile, ma sono utili in associazione trattamenti antibiotici ed è molto importante la precocità del trattamento. Nessun trattamento può, tuttavia, essere efficace senza idratazione. I farmaci impiegati sono doxiciclina, trimetoprim, fluorochinoloni e rifaximina.

La colite pseudomembranosa da *Clostridium difficile*, prima sporadica, è arrivata alla clinica con l'avvento della terapia antibiotica. Gli antibiotici hanno determinato, infatti, una vera e propria selezione del *Clostridium*. Soprattutto in ospedale, la sua incidenza risulta in continuo aumento. Gli antibiotici ritenuti responsabili dell'insorgenza di questa patologia sono i betalattamici, i fluorochinoloni e molti altri ancora, mentre clindamicina, l'antibiotico più incriminato in passato, in realtà non è quello più coinvolto dal punto di vista eziopatogenetico. In passato, prima dell'introduzione della terapia con vancomicina, la mortalità era pari al 98-99%. Oggi la mortalità risulta più bassa (grazie all'idratazione e alla terapia antibiotica) ma in ambiente ospedaliero è

sempre un evento temibile. Attualmente, vancomicina trova un minor impiego (al fine di non sviluppare resistenze) e il trattamento più indicato, non certo perché il più efficace, è il metronidazolo. Esso risulta essere anche il più utile dal punto di vista costo/beneficio (beneficio in termini di resistenza).

I costi della colite pseudomembranosa sono elevatissimi, non soltanto per il trattamento, ma anche perché questa infezione può comportare il prolungamento della degenza in ospedale o in terapia intensiva di 10-15 giorni. Linee guida del 2010² raccomandano per la terapia metronidazolo e vancomicina, ma anche altri farmaci come rifaximina (è tra i farmaci più efficaci e viene raccomandata in sequenza a vancomicina). Rifampicina in combinazione con vancomicina ha dimostrato efficacia. Nitazoxanide è un farmaco simile al metronidazolo dal punto di vista del meccanismo d'azione e, sebbene abbia un'esposizione sistemica, può essere utilizzato in questa patologia (certamente non in prima scelta, ma dovrebbe essere riservato soltanto ai casi refrattari). Fidaxomicina rappresenta un farmaco innovativo (approvato dall'FDA nell'aprile 2011, non ancora dall'EMA). Ha dimostrato di avere una buona efficacia sul *Clostridium difficile*, ma non è assorbita, sebbene abbia una buona penetrazione intestinale. Confrontata con vancomicina, non ha dimostrato differenze dal punto di vista clinico, ma nell'eradicazione dell'infezione sembrerebbe addirittura superiore. L'incidenza di recidive con questo trattamento sembra essere molto inferiore (verosimilmente perché ha un potere di eradicazione superiore alla vancomicina).

Bibliografia di riferimento

Nelson RL, Kelsey P, Leeman H, et al. *Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults*. Cochrane Database Syst Rev 2007;(3):CD004610.

Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. *Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)*. Infect Control Hosp Epidemiol 2010;31:431-55.

Rifaximina, un antibiotico selettivo per il tratto gastrointestinale: stato attuale e prospettive future

Carmelo Scarpignato, Eleonora Mazzeo
Laboratorio di Farmacologia Clinica,
Divisione di Gastroenterologia,
Dipartimento di Scienze Cliniche,
Università di Parma

Gli antibiotici vengono comunemente utilizzati in gastroenterologia per ^{1,2}:

- la terapia delle infezioni gastrointestinali, quali la diarrea di origine batterica, la colangite o la diverticolite acuta;
- il trattamento di malattie digestive, nella cui patogenesi la flora batterica intestinale esercita un ruolo determinante, come, per esempio, l'ulcera peptica in pazienti con infezione da *Helicobacter pylori*, le MICI o la sindrome dell'intestino irritabile;
- la profilassi antibiotica, quando indicata, in endoscopia o chirurgia digestiva.

La scelta di un dato antibiotico è determinata da molteplici fattori, che comprendono l'identificazione dell'agente patogeno, la localizzazione anatomica dell'infezione, lo spettro dell'attività antibatterica e la farmacocinetica delle varie molecole, nonché il loro profilo di tollerabilità e il relativo costo ². Agli inizi degli anni '90, Herbert DuPont e Charles Ericsson ³ hanno suggerito per primi le caratteristiche di un antibiotico ideale per il trattamento delle infezioni intestinali. Il farmaco dovrebbe:

- avere un'elevata attività nei riguardi degli enterobatteri;
- essere inefficace, e quindi inutilizzabile, nelle infezioni extra-gastrointestinali, riducendo così la possibilità di favorire lo sviluppo di resistenze batteriche diffuse;
- avere uno scarso assorbimento e quindi minimi effetti sistemici;
- essere sicuro, in modo tale da poter essere utilizzato nel bambino, nell'anziano e persino nella donna in gravidanza.

Gli antibiotici che posseggono queste caratteristiche sono i cosiddetti *poorly absorbed antibiotic*. Essendo privi di assorbimento sistemico, questi farmaci si concentrano selettivamente nel lume intestinale, esercitano *in loco* la loro attività antibatterica e vengono successivamente escreti con le feci. Tuttavia, la loro disponibilità è limitata agli aminoglicosidi e alla rifaximina (unica rifamicina con un assorbimento inferiore all'1%). Altri antibiotici (quali vancomicina, teicoplanina, ramoplanina e fidaxomicina) sono scarsamente assorbiti per via orale, ma sono principalmente impiegati per il trattamento dell'infezione da *Clostridium difficile* ⁴. Paromomicina, neomicina (spesso associata a bacitracina) e rifaximina sono pertanto le molecole maggiormente utilizzate nella pratica clinica per il trattamento delle infezioni intestinali. Tuttavia, gli aminoglicosidi somministrati per via orale possono essere responsabili di episodi di nefro- e oto-tossicità, sono gravati da un'elevata frequenza di resistenze batteriche (di tipo plasmidico) e il loro spettro d'azione non copre i batteri anaerobi. Al contrario, rifaximina dà raramente luogo all'insorgenza di resistenze (che sono peraltro di tipo cromosomico)

e il suo spettro d'azione comprende batteri Gram-positivi e Gram-negativi, aerobi e anaerobi (Tab. I) ^{4,5}.

La rifaximina è un derivato sintetico della rifamicina, con cui condivide il *meccanismo d'azione*. Essa, infatti, si lega alla subunità β della RNA polimerasi batterica, inibendo la sintesi proteica e rendendo impossibile l'inizio di un nuovo ciclo riproduttivo. Rifaximina riduce inoltre la virulenza di *Escherichia coli* e di *Shigella*, riducendo la loro capacità di indurre l'espressione di interleuchina-8 (IL-8) da parte di cellule epiteliali intestinali umane ⁶. Studi *in vitro* hanno messo in evidenza che, in aggiunta all'effetto antimicrobico, questo antibiotico ha la capacità di inibire l'adesività dei batteri alle cellule epiteliali ⁷. Inoltre, recenti ricerche hanno dimostrato che gli acidi biliari aumentano in maniera concentrazione-dipendente la solubilità della rifaximina e ne incrementano l'efficacia antibatterica (Fig. 1) ⁸. Questi dati spiegano come la rifaximina eserciti un'elevata attività antimicrobica nell'intestino, nel cui lume la concentrazione di acidi e sali biliari è elevata, e un'attività inferiore nel colon, dove la concentrazione intraluminali di acqua è alta mentre quella di bile quasi del tutto assente. Nonostante l'ampio spettro della sua attività antibatterica, dopo terapia con rifaximina sono riportate minime variazioni della microflora intestinale ⁹. Al contrario, in pazienti con colite ulcerosa, trattati con il farmaco, è stata evidenziata una frequenza elevata di isolamento di mutanti *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina e la loro scomparsa dopo la sospensione del trattamento, parallelamente al ripristino della composizione del microbiota intestinale di ciascun indivi-

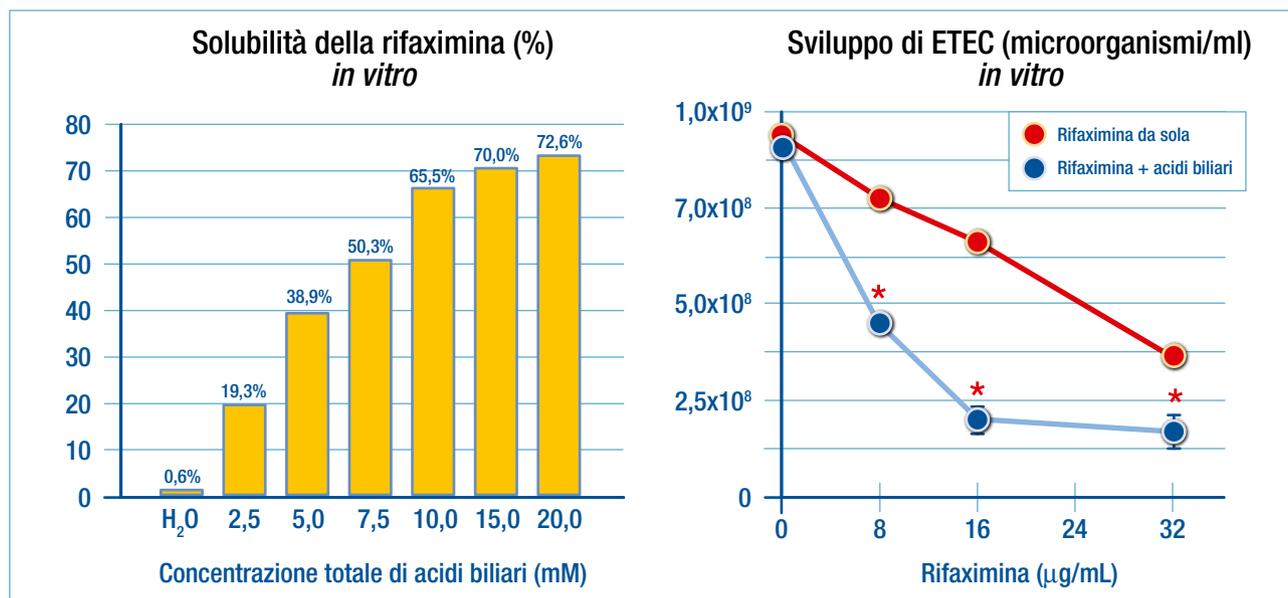
TABELLA I.

Antibiotici scarsamente assorbiti nel tratto gastrointestinale: principali differenze tra aminoglicosidi e rifaximina (da Scarpignato e Pelosini, 2006) ⁵.

Proprietà farmacologiche	Aminoglicosidi	Rifaximina
Assorbimento sistemico	3-5%	< 1%
Effetti indesiderati	Oto- e nefro-tossicità	Assenti
Attività contro batteri Gram-positivi	++	+++
Attività contro batteri anaerobi	0	+++
Resistenza batterica Tipo/frequenza	Plasmidica/alta	Cromosomica/bassa

FIGURA 1.

Aumento della solubilità e dell'attività antibatterica di rifaximina da parte degli acidi biliari (da Darkoh et al., 2010, mod.)⁸.



ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*.

duo. La somministrazione contemporanea di rifaximina e probiotico (*B. lactis* BI07) ha determinato un incremento significativo della concentrazione di bifidobatteri e lattobacilli, il che suggerisce una spontanea insorgenza di antibiotico-resistenza¹⁰. L'assenza di importanti modificazioni della microflora intestinale, l'incremento significativo delle concentrazioni di batteri probiotici e l'*health-promoting* dimostrano l'incapacità di rifaximina di indurre disbiosi microbica nei soggetti trattati e suggeriscono l'utilizzazione di un'associazione di que-

sto antibiotico e probiotici nel trattamento di disturbi funzionali dell'apparato digerente. Come altri antibiotici (ad esempio le tetracicline), rifaximina possiede un'intrinseca attività antinfiammatoria. È stato infatti dimostrato che – nell'apparato digerente – questo antibiotico si comporta come un agonista del recettore PXR (*Pregnane X Receptor*)¹¹ ed è capace di inibire la liberazione di citochine infiammatorie in seguito alla somministrazione di lipopolisaccaride (LPS) e conseguente attivazione dei recettori *toll-like* 4 (TLR4)¹².

Tutti gli studi di farmacocinetica, effettuati sia nei volontari sani che in pazienti con MICI, hanno dimostrato un assorbimento trascurabile, con un'eliminazione urinaria massima inferiore allo 0,03% della dose somministrata (Tab. II)⁴. La mancanza di assorbimento si traduce in un'ottima tollerabilità e sicurezza d'uso sia a breve⁵ che a lungo termine¹³.

Applicazioni terapeutiche

Grazie alle sue caratteristiche farmacologiche, rifaximina può essere considerata un

TABELLA II.

Sinopsi degli studi di farmacocinetica della rifaximina nell'uomo (da Scarpignato e Pelosini, 2006)⁵.

Studio	Soggetti	Regime terapeutico	C _{MAX} (ng/ml)	Eliminazione urinaria (%)
Descombe et al., 1994	Volontari sani	400 mg	1,0 (0,0-5,3)	0,007 ± 0,001
Untingdon, 1998	Volontari sani	400 mg, 14 _c	4,3 ± 2,8	0,24
Rizzello et al., 1998	Pazienti con RCU	400 mg	2,2 (0,0-22,4)	0,009 ± 0,006
Campieri et al., 1999	Pazienti con MdC	400 mg	3,13 (0,0-9,57)	0,007 ± 0,004
Gionchetti et al., 1999	Pazienti con RCU grave	800 mg/die per 10 giorni	ND	0,008
FDA, 2002	Volontari sani	400 mg	3,8 ± 1,32	0,023 ± 0,009
Taylor et al., 2003	Pazienti con infezione da <i>Shigella</i>	800 mg/die per 3 giorni	0,81 - 3,4	ND

RCU: rettocolite ulcerosa; MdC: malattia di Crohn; ND: non determinabile.

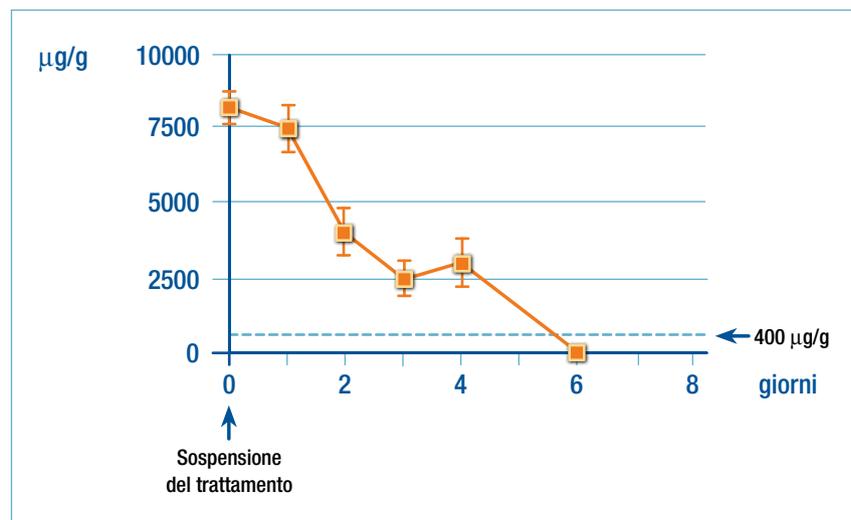
antibiotico di prima scelta nel trattamento delle infezioni intestinali. Le concentrazioni fecali dell'antibiotico sono infatti nettamente superiori alle concentrazioni minime inibenti (MIC90) per la stragrande maggioranza dei batteri aerobi e anaerobi, siano essi Gram-positivi o Gram-negativi⁵. Dopo la sospensione della terapia, le concentrazioni fecali rimangono sufficientemente elevate per almeno 5 giorni (Fig. 2)¹⁴. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che il farmaco è estremamente attivo e ben tollerato. Il miglioramento della sintomatologia diarroica è rapido e quasi sempre seguito dalla completa negativizzazione delle coproculture. Essendo la rifaximina attiva sulla maggior parte degli enterobatteri responsabili della *diarrea del viaggiatore*, essa è certamente da preferire (a scopo profilattico e/o terapeutico) agli antibatterici sistemici, i cui effetti indesiderati (di tipo allergico e tossico) ne sconsigliano l'uso in patologie non gravi e autolimitanti.

La sua eccellente tollerabilità la rende particolarmente adatta in pediatria e gerontologia. Il suo indice terapeutico, più elevato rispetto a quello degli antibiotici aminoglicosidici, ne ha consentito un'applicazione terapeutica più vasta che si estende alla preparazione dell'intestino alla chirurgia¹⁵, al trattamento della *malattia diverticolare* (dove migliora l'effetto di una dieta ricca in fibre)¹⁶, e dell'*encefalopatia porto-sistemica* per la riduzione dell'iperammonemia¹⁷. In pazienti con *retto-colite ulcerosa* resistente al trattamento steroideo, la rifaximina determina un significativo miglioramento della sintomatologia clinica (diarrea e rettorragia) e del quadro endoscopico¹⁸. Uno studio recente¹⁹, che ha utilizzato una nuova formulazione dell'antibiotico (la cosiddetta *extended intestinal release (EIR) formulation*) ha dimostrato che la somministrazione di 800 mg due volte al giorno è in grado di indurre la remissione in pazienti affetti da forme lievi o moderate di morbo di Crohn.

L'attività del farmaco sulla flora batterica intestinale ne ha suggerito l'uso nei pazienti con turbe funzionali intestinali, in cui rifaximina è in grado di ridurre significativamente

FIGURA 2.

Concentrazioni fecali di rifaximina in pazienti affetti da diarrea del viaggiatore, dopo trattamento con l'antibiotico (800 mg/die) per 3 giorni consecutivi (da Jiang et al., 2000, mod.)¹⁴.



la produzione di gas e la conseguente sintomatologia²⁰. Una recente meta-analisi²¹ ha dimostrato che il farmaco è superiore al placebo nel controllo del corteo sintomatologico dell'IBS.

Rifaximina nella pratica clinica: formulazione *branded* o generica?

Il principio attivo contenuto nelle specialità medicinali *branded* è stato sempre caratterizzato come polvere cristallina. Infatti, la monografia della Farmacopea Europea, alla voce *caratteristiche*, riporta testualmente: "Aspetto: polvere cristallina igroscopica, di colore rosso-arancio...". Nella stessa monografia si afferma che rifaximina mostra un polimorfismo cristallografico^a. Sono state oggi identificate 5 forme polimorfe denominate rispettivamente α , β , γ , δ e ϵ , che sono praticamente idrati di rifaximina, caratterizzati da un diverso contenuto in acqua²². Modificando opportunamente il processo di sintesi e purificazione è possibile ottenere anche una forma non cristallina, la rifaximina amorfa.

Le differenti proprietà chimico-fisiche dei polimorfi (stabilità, reattività chimica, velocità di dissoluzione e solubilità) possono

modificare considerevolmente la biodisponibilità (e quindi influire sulle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche) di ogni molecola²³. In accordo con l'enorme letteratura sull'argomento, la solubilità e la biodisponibilità delle varie forme di rifaximina sono differenti. Infatti, il test di dissoluzione *in vitro*, effettuato secondo la Farmacopea Europea, dimostra chiaramente che le compresse delle formulazioni *branded*, contenenti rifaximina A, non si dissolvono in nessuna delle soluzioni acquose a pH 1,2, pH 4,0 e pH 6,8, mentre quelle contenenti la forma amorfa o la forma γ mostrano una dissoluzione di circa il 30% (Fig. 2).

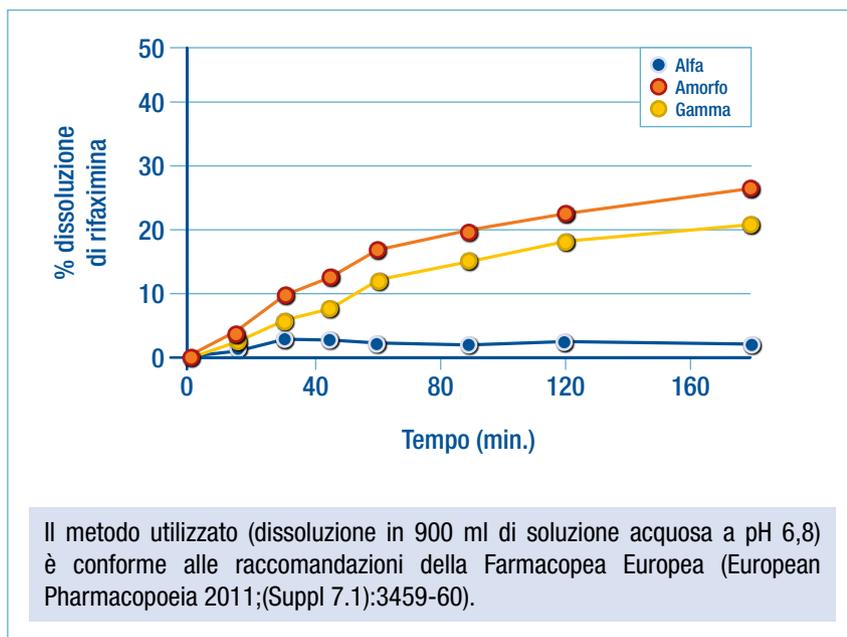
Come discusso dal professor Blandizzi²⁴ nell'articolo che segue, la differente solubilità delle varie forme cristalline e della forma amorfa di rifaximina si riflette sulla loro farmacocinetica. Infatti, uno studio condotto nel cane ha dimostrato che i polimorfi α e β sono assorbiti in maniera trascurabile, il polimorfo ϵ è assorbito 6 volte di più mentre il polimorfo γ lo è ben 400 volte di più²². La forma amorfa è stata studiata nel volontario sano e le AUC hanno dimostrato un assorbimento 5-6 volte superiore a quello di rifaximina- α ²⁵.

Tenendo in considerazione i dati su espo-

^a Il polimorfismo è una caratteristica dello stato solido. Forme polimorfe di una stessa sostanza sono caratterizzate da un'uguale composizione chimica e una diversa disposizione spaziale delle molecole.

FIGURA 3.

Test di dissoluzione in vitro di compresse di rifaximina da 200 mg, contenenti il polimorfo α o γ o la forma amorfa.



sti, è possibile ipotizzare che il profilo farmacocinetico delle formulazioni generiche (che non possono – per ragioni brevettuali^b – contenere rifaximina- α) sia differente da quello delle formulazioni di

marca. Infatti, esse potrebbero sia contenere la forma amorfa che un'altra forma cristallina o, addirittura, una miscela di polimorfi. In quest'ultimo caso, l'assorbimento sistemico sarebbe assolutamente

imprevedibile. In ogni caso, da un punto di vista farmacocinetico, nessuno degli altri polimorfi della rifaximina (a parte la forma cristallina β) potrebbe essere considerato un *poorly absorbed antibiotic*. Di conseguenza, l'assorbimento sistemico (peraltro difficile da quantificare) non garantirebbe la stessa sicurezza sia in termini di effetti indesiderati che di insorgenza di resistenze batteriche extra-gastrointestinali⁴. Bisogna infine sottolineare che la formulazione *branded*, con la quale sono stati effettuati tutti gli studi clinici (*pre-* e *post-marketing*), conteneva un prodotto cristallino, il cui profilo di dissoluzione è sovrapponibile a quello del polimorfo α . Non è quindi scientificamente corretto estendere *sic et simpliciter* i risultati ottenuti con una forma cristallina α agli altri polimorfi o alla forma amorfa. Pertanto, solo uno studio clinico di bioequivalenza terapeutica può dare la sicurezza dell'effettiva intercambiabilità tra le diverse formulazioni di rifaximina²⁶. Infatti, le recentissime linee guida della FDA su questo antibiotico²⁷ raccomandano – per la valutazione della bioequivalenza di una formulazione generica – di condurre uno studio clinico con uno specifico *endpoint* in pazienti affetti da diarrea del viaggiatore.

Bibliografia

- Pithie AD, Ellis CJ. *Review article: antibiotics and the gut*. *Aliment Pharmacol Ther* 1989;3:321-32.
- Li E, Stanley SL Jr. *The role of newer antibiotics in gastroenterology*. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:613-29.
- DuPont HL, Ericsson CD. *Prevention and treatment of traveler's diarrhea*. *N Engl J Med* 1993;328:1821-7.
- Scarpignato C, Pelosini I. *Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential*. *Chemotherapy* 2005;51(Suppl 1):36-66.
- Scarpignato C, Pelosini I. *Experimental and clinical pharmacology of rifaximin, a gastrointestinal selective antibiotic*. *Digestion* 2006;73(Suppl 1):13-27.
- Jiang ZD, Ke S, Dupont HL. *Rifaximin-induced alteration of virulence of diarrhoea-producing Escherichia coli and Shigella sonnei*. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:278-81.
- Brown EL, Xue Q, Jiang ZD, et al. *Pretreatment of epithelial cells with rifaximin alters bacterial attachment and internalization profiles*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:388-96.
- Darkoh C, Lichtenberger LM, Ajami N, et al. *Bile acids improve the antimicrobial effect of rifaximin*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3618-24.
- Brigidi P, Swennen E, Rizzello F, et al. *Effects of rifaximin administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis*. *J Chemother* 2002;14:290-5.
- Maccaferri S, Vitali B, Klinder A, et al. *Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2556-65.
- Ma X, Shah YM, Guo GL, et al. *Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator*. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:391-8.
- Mencarelli A, Renga B, Palladino G, et al. *Inhibition of NF- κ B by a PXR-dependent path-*
- way mediates counter-regulatory activities of rifaximin on innate immunity in intestinal epithelial cells*. *Eur J Pharmacol* 2011;668:317-24.
- Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, et al. *Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy*. *N Engl J Med* 2010;362:1071-81.
- Jiang Z, Ke S, Palazzini E, et al. *In vitro activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2205-6.
- Nichols RL, Choe EU, Weldon CB. *Mechanical and antibacterial bowel preparation in colon and rectal surgery*. *Chemotherapy* 2005;51(Suppl 1):115-21.
- Bianchi M, Festa V, Moretti A, et al. *Meta-analysis: long-term therapy with rifaximin in the management of uncomplicated diverticular disease*. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:902-10.
- Mullen K, Prakash R. *Rifaximin for the treatment of hepatic encephalopathy*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;4:665-77.

^b I brevetti relativi alla sintesi e utilizzazione farmaceutica dei vari polimorfi di rifaximina scadono a partire dal 2023.

- ¹⁸ Gionchetti P, Rizzello F, Ferrieri A, et al. *Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid treatment: a double-blind, placebo-controlled trial*. *Dig Dis Sci* 1999;44:1220-1.
- ¹⁹ Prantera C, Lochs H, Grimaldi M, et al.; Retic Study Group (Rifaximin-Eir Treatment in Crohn's Disease). *Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease*. *Gastroenterology* 2011 [Epub ahead of print].
- ²⁰ Corazza GR, Di Stefano M, Scarpignato C. *Treatment of functional bowel disorders: is there room for antibiotics?* *Digestion* 2006;73(Suppl 1):38-46.
- ²¹ Menees SB, Maneerattannaporn M, Kim HM, et al. *The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis*. *Am J Gastroenterol* 2012;107:28-35.
- ²² Viscomi GC, Campana M, Barbanti M, et al. *Crystal forms of rifaximin and their effect on pharmaceutical properties*. *Cryst Eng Comm* 2008;10:1074-81.
- ²³ Ilfiker R. *Polymorphism in the pharmaceutical industry*. Wiley-VCH 2006, pp. 1-433.
- ²⁴ Blandizzi C, Mantarro S. *Bioequivalenza degli antibiotici generici: considerazioni sui farmaci attivi a livello locale*. *Rivista SIMG* 2012; in stampa.
- ²⁵ Marzo A, Ismaili S. *A randomised, crossover study to evaluate the safety and the pharmacokinetic profiles of a single oral dose (400 mg) of amorphous rifaximin in comparison with a single oral dose (400 mg) of Normix™ (rifaximin polymorph-α) in healthy volunteers*. *Dig Liv Dis* 2010;42(Suppl 2):191-2.
- ²⁶ Snider DA, Addicks W, Owens W. *Polymorphism in generic drug product development*. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:391-5.
- ²⁷ FDA. *Draft guidance on rifaximin, 2011*. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm281455.pdf> (ultima consultazione: dicembre 2011).

Bioequivalenza degli antibiotici generici: considerazioni sui farmaci attivi a livello locale

Corrado Blandizzi, Stefania Mantarro
Divisione di Farmacologia e
Chemioterapia, Dipartimento di Medicina
Interna, Università di Pisa

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce "farmaco generico" un prodotto medicinale intercambiabile con l'originale protetto da brevetto, ovvero un prodotto equivalente a quello di marca dal punto di vista sia farmaceutico (principio attivo, dosaggio, modalità di somministrazione) che terapeutico (efficacia clinica, tollerabilità). Al fine di dimostrare l'equivalenza di forme farmaceutiche solide da assumere per via orale, in alcuni casi è possibile eseguire test di dissoluzione *in vitro* in presenza di soluzioni tampone a determinati valori di pH e di temperatura. Dal confronto delle curve di dissoluzione del principio attivo, che si libera dalla formulazione per sciogliersi nella soluzione tampone, possono essere formulate ipotesi sulla cinetica con cui il principio attivo sarà liberato dalla formulazione farmaceutica una volta raggiunto il sito di assorbimento *in vivo* (lume intestinale) ¹. A parte i casi particolari sopra menzionati, non c'è dubbio che i test di farmacocinetica su volontari sani rappresentino la

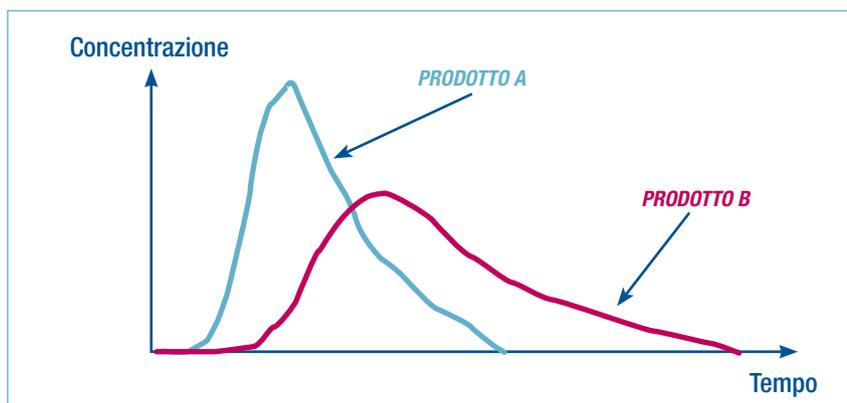
modalità più importante attraverso la quale può essere dimostrata la bioequivalenza tra due farmaci attivi a livello sistemico. In particolare, le linee guida EMA (*European Medicines Agency*) raccomandano l'esecuzione di studi di farmacocinetica con disegno sperimentale in *crossover* su volontari sani, suddivisi in due gruppi in modo randomizzato: inizialmente uno dei due prodotti viene somministrato a un gruppo e l'altro prodotto all'altro gruppo, successivamente, dopo un periodo di *washout*, viene invertita la sequenza cosicché tutti i soggetti sono sottoposti alla somministrazione del prodotto di marca e di quello generico. Dopo ciascun trattamento si procede al prelievo di campioni di sangue a tempi prestabiliti e si misurano le concentrazioni del principio attivo nel plasma. In questo modo si ottengono curve farmacocinetiche che descrivono l'andamento delle concentrazioni del principio attivo contenuto nel prodotto generico e in quello di marca rispetto al tempo, e che permettono di definire le modalità di assorbimento a livello sistemico, la concentrazione di picco, l'area sotto la curva e altri parametri (Fig. 1) ². Per dimostrare la bioequivalenza, le autorità regolatorie richiedono la misurazione di due parametri fondamentali, ovvero l'area sotto la curva concentrazione-tempo (indice di esposizione sistemica al farmaco) e la concentrazione plasmatica ottenuta al picco. Il confronto statistico di questi due parametri deve dimostrare un'assenza di differenza significativa (con un intervallo di confidenza pari al 90% e un intervallo di variabilità

compreso tra -20% e +25%). Non per tutti i prodotti farmaceutici è richiesta anche la misurazione di T_{max} , ovvero il tempo necessario per raggiungere il picco di concentrazione plasmatica, e questo perché per alcuni farmaci, ad esempio quelli somministrati cronicamente, non è importante definire se questo parametro sia significativamente diverso ².

La teoria della bioequivalenza si fonda sull'assunto in base al quale la quantità di un farmaco in forma biologicamente attiva, presente nella circolazione sistemica dopo la fase di assorbimento, sia correlabile con la quota di farmaco che si distribuisce nel sito d'azione, la quale è a sua volta responsabile dell'azione terapeutica. Di conseguenza, si ammette che dalla valutazione comparativa del profilo farmacocinetico del farmaco generico e del suo rispettivo prodotto di marca possa essere dedotto il comportamento del farmaco generico dal punto di vista dell'efficacia terapeutica ³. Per alcuni prodotti medicinali, ad esempio quelli concepiti per svolgere la loro azione terapeutica localmente, a fronte di un assorbimento sistemico assente o, comunque, trascurabile (*locally acting compound*), nell'impossibilità di documentare una bioequivalenza basata sulla determinazione di profili farmacocinetici sistemici, sono necessarie metodologie alternative, tra le quali una dimostrazione diretta dell'equivalenza terapeutica tra prodotto generico e di marca, ovvero l'esecuzione di uno studio clinico che permetta di misurare i parametri di efficacia e tollerabilità in maniera tale che

FIGURA 1.

Farmaci attivi a livello sistemico dopo somministrazione per via orale. La figura illustra l'andamento delle concentrazioni plasmatiche nel tempo di un principio farmacologicamente attivo contenuto in due diversi prodotti farmaceutici, A e B, che sono stati posti a confronto in modo da valutare la loro bioequivalenza per mezzo di uno studio di farmacocinetica in un gruppo di volontari sani. I grafici mostrati in figura consentono la valutazione di vari parametri farmacocinetici, tra i quali il picco di concentrazione plasmatica (C_{max}) e l'area sotto la curva (AUC) che sono essenziali per la determinazione della bioequivalenza.



dal confronto sia possibile definire almeno un livello di non inferiorità.

Per quanto riguarda i *locally acting compound*, la linea guida EMA del 1995⁴ contiene raccomandazioni molto importanti per determinare la bioequivalenza tra prodotti generici e prodotti di marca sviluppati per agire localmente in assenza di azioni sistemiche rilevanti. Per definizione, un *locally acting compound* deve svolgere un'azione terapeutica limitata al sito d'applicazione. Gli effetti sistemici possono essere presenti, ma non devono contribuire all'effetto terapeutico. Tali eventuali effetti devono, anzi, essere valutati molto attentamente poiché possono essere fonte di reazioni avverse o favorire l'insorgenza di resistenze ad altri farmaci della stessa classe, come nel caso dei farmaci antibatterici⁴. I *locally acting compound* più comuni sono rappresentati da prodotti dermatologici, alcuni prodotti attivi per via inalatoria, prodotti per applicazione otologica o nasale e prodotti che, pur essendo somministrati per via orale, restano confinati nel lume del tratto digerente dove svolgono la loro azione terapeutica, senza quindi determinare assorbimento e azioni sistemiche. La linea guida EMA sottolinea che, se nel prodotto generico sono presenti cambiamenti delle proprietà chimico-fisiche del principio attivo, queste modificazioni potrebbero essere fonte di variazioni significative

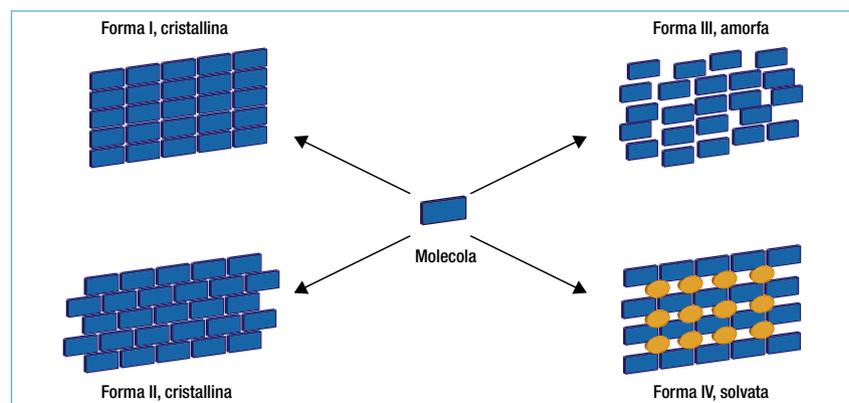
non solo a livello dell'eventuale assorbimento sistemico (e quindi anche della sicurezza di impiego), ma anche, localmente, a livello dell'efficacia terapeutica. Pertanto, qualora le proprietà chimico-fisiche del principio attivo contenuto nel prodotto generico siano diverse rispetto al principio attivo presente nel prodotto di marca, è opportuno che il prodotto generico sia valutato molto attentamente prima di dichiarare la sua bioequivalenza con il rispettivo prodotto di marca⁴. Per le ragioni sopra esposte, quando si parla di farmaci sviluppati per agire localmente, la

linea guida EMA stabilisce che l'intercambiabilità terapeutica deve essere documentata per mezzo di procedure alternative al metodo comunemente utilizzato per i farmaci attivi a livello sistemico (vale a dire quello della bioequivalenza basata sull'uso di criteri farmacocinetici), e che è quindi necessario eseguire studi di farmacodinamica, *in vitro* o *in vivo*, che consentano di stabilire che gli effetti locali del farmaco generico sono equivalenti a quelli del prodotto di marca. Anche gli studi di biodisponibilità locale sono molto importanti per stabilire che la concentrazione con cui il prodotto generico raggiunge il sito d'azione è equivalente a quella del prodotto di marca. La linea guida EMA non obbliga all'esecuzione di studi clinici di efficacia, ma li raccomanda qualora i risultati degli studi suddetti, di più basso livello, non siano sufficienti per giudicare se ci sia equivalenza terapeutica tra il prodotto generico e il prodotto di marca. È molto utile ottenere anche dati adeguati sulla biodisponibilità sistemica del principio attivo, poiché se questa dovesse superare determinati livelli potrebbe generare problemi sicurezza di impiego⁴.

Nel caso dei farmaci attivi localmente, tra i principali fattori che possono influire sulle proprietà chimico-fisiche del principio attivo, è compreso il cosiddetto polimorfismo chimico, che è una proprietà delle molecole allo stato solido (forme polimorfiche differenti sono il risultato di diverse organizzazioni spaziali della stessa molecola) (Fig. 2). Il polimorfismo chimico può influenzare la solubilità di una molecola farmacologica-

FIGURA 2.

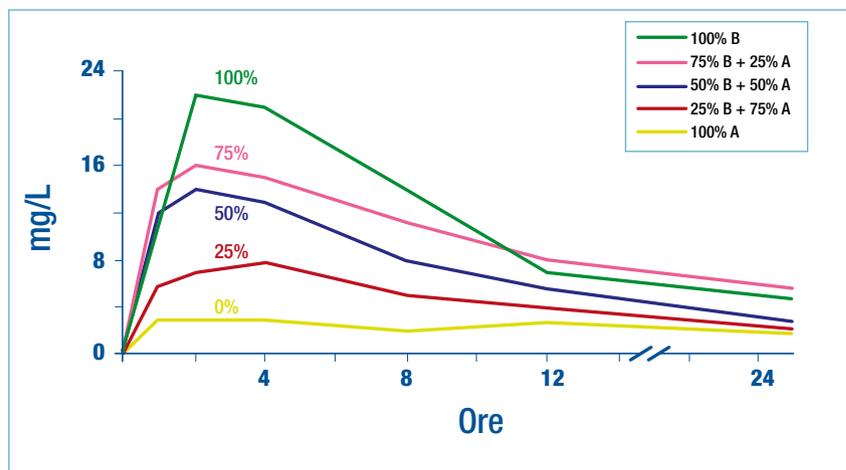
Rappresentazione schematica dei polimorfismi chimici della stessa molecola. Nell'esempio riportato in figura, la stessa molecola può dare luogo a un amorpho e tre forme cristalline diverse, delle quali una è un solvato.



mente attiva, le sue capacità di liberarsi dalla formulazione farmaceutica, di rimanere stabile, di essere compatibile con gli eccipienti all'interno della preparazione farmaceutica e, fatto ancora più importante, di essere più o meno biodisponibile a livello locale o sistemico. Per esempio, il cloramfenicolo palmitato (farmaco antibatterico somministrato per via orale, utilizzato per svolgere un'azione sia a livello locale che sistemico) può organizzarsi in tre forme cristalline (A, B, C), un'amorfa e diverse forme solvate (aggregati cristallini costituiti da molecole di principio attivo e molecole di un solvente, di solito acqua). In uno studio di farmacocinetica, sono state somministrate a volontari sani miscele del polimorfo A e del polimorfo B in diversa proporzione: 100% A, 75% A + 25% B, 50% A + 50% B, 25% A + 75% B, 100% B. È stato così possibile dimostrare che, man mano che veniva modificata la proporzione del polimorfo A (non solubile rispetto al polimorfo B), cambiava in maniera significativa il profilo di assorbimento sistemico (Fig. 3) ⁵. È evidente, quindi, che il polimorfismo può influenzare la cinetica di assorbimento di un determinato principio attivo. Pertanto, se si vuole sviluppare un prodotto generico contenente un antibiotico attivo localmente sulla flora batterica intestinale e che sia in grado di generare polimorfi chimici differenti, è necessario verificare che le sue proprietà farmacocinetiche siano tali da garantire che, dopo la somministrazione per via orale,

FIGURA 3.

Profili farmacocinetici relativi all'assorbimento sistemico dei polimorfi A e B del cloramfenicolo palmitato dopo somministrazione per via orale di preparati contenenti i due polimorfi in proporzioni variabili. L'assorbimento sistemico del polimorfo A (non solubile) è trascurabile rispetto a quello del polimorfo B (solubile) (da Aguiar et al., 1967, mod.) ⁵.



il principio attivo sia mantenuto completamente, o il più possibile, nel lume intestinale e che le quote di escrezione urinaria siano trascurabili, a indicare un assorbimento sistemico molto scarso o assente. Un altro esempio importante è rappresentato dalla rifaximina, un antibiotico sviluppato appositamente per agire sulla flora batterica intestinale, in assenza di azioni sistemiche. La rifaximina è in grado di generare cinque forme polimorfe e un'amorfa, ed è un *locally acting compound* il cui assorbimento sistemico dipende in maniera rilevante proprio

dal polimorfismo chimico. È stato osservato, infatti, che l'assorbimento dei polimorfi α e β è trascurabile, mentre quello della rifaximina in forma amorfa, così come quello dei polimorfi γ e δ , è significativo ⁶. Uno studio di bioequivalenza sistemica ha analizzato la rifaximina in forma amorfa in confronto a rifaximina polimorfo α (il prodotto di marca coperto da brevetto). Questo studio ha dimostrato una differenza significativa tra i parametri farmacocinetici del polimorfo α e dell'amorfo. L'AUC, ad esempio, è risultata intorno a 63 ng/mL·h per la forma amorfa e intorno

TABELLA 1.

Parametri farmacocinetici relativi all'assorbimento sistemico del polimorfo alfa e dell'amorfo di rifaximina dopo somministrazione di una singola dose per via orale. La tabella dimostra che l'assorbimento sistemico dell'amorfo è 4-6 volte più elevato rispetto a quello del polimorfo alfa (da Marzo e Ismaili, 2010, mod.) ⁷.

Parametri	Media (T = rifaximina amorfa)	Media (R = Normix®)	T > R %	T/R
C _{max} (ng/mL)	15,01	3,54	324,0%	4,24
T _{max} (h)	1,71	1,21	41,3%	1,41
AUC _{0-t} (ng/mL·h)	63,38	10,37	510,6%	6,11
AUC _{0-∞} (ng/mL·h)	68,80	13,03	426,0%	5,28
T _{1/2} (h)	5,35	2,23	139,9%	2,40
CUE (μg)	441,93	88,34	400,3%	5,00

T: farmaco in studio; R: farmaco di riferimento; C_{max}: picco di concentrazione plasmatica; T_{max}: tempo necessario per il raggiungimento del picco di concentrazione plasmatica; T_{1/2}: emivita plasmatica del farmaco.

a 10 ng/mL-h per il polimorfo α , indicando che l'assorbimento sistemico dell'amorfo è 6 volte più elevato rispetto a quello del polimorfo α (Tab. I) ⁷. Dal punto di vista clinico, è possibile prevedere che, qualora i pazienti siano trattati con prodotti che contengano, in tutto o in parte, rifaximina amorfa, γ o δ ci sarà un assorbimento sistemico rilevante, con conseguente riduzione della quota di antibiotico disponibile a livello del lume intestinale e aumento del rischio di effetti sistemici non desiderati (tossicità sistemica, sviluppo di resistenza verso micro-organismi responsabili di infezioni sistemiche). Per quanto riguarda il polimorfo β di rifaximina, questo ha un comportamento molto simile

a quello del polimorfo α dal punto di vista cinetico, ma non sono disponibili dati sufficienti sul suo spettro antibatterico, sulla sua attività sugli enterobatteri e sulla sua efficacia clinica. Pertanto non è possibile per il momento affermare che eventuali prodotti a base di polimorfo β siano intercambiabili con quello di marca contenente il polimorfo α di rifaximina.

Le considerazioni sopra esposte consentono di trarre alcune conclusioni: a) i principi di bioequivalenza, così come stabiliti dalle linee guida sui farmaci attivi a livello sistemico e basati, nella maggior parte dei casi, su valutazioni di farmacocinetica clinica, non possono essere applicati ai farmaci sviluppati per

agire localmente; b) il polimorfismo chimico può influenzare la biodisponibilità locale e sistemica di principi attivi concepiti per agire localmente, con possibili alterazioni del profilo di efficacia e/o tollerabilità; c) i farmaci di marca, sviluppati per agire localmente in assenza di effetti sistemici rilevanti e la cui azione locale dipende da una specifica forma polimorfa del principio attivo, non possono essere sostituiti con prodotti generici contenenti la forma amorfa, polimorfi diversi o miscele dell'amorfo e di vari polimorfi dello stesso principio attivo, a meno che la loro intercambiabilità non sia documentata in maniera rigorosa e in conformità con le linee guida attualmente in vigore.

Bibliografia

- ¹ World Health Organization (WHO). *Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability*. Working document QAS/04.093/Rev.4, 2005.
- ² European Medicines Agency (EMA). *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98*. London 2010.
- ³ Welage LS, Kirking DM, Ascione FJ, et al. *Understanding the scientific issues embedded in the generic drug approval process*. J Am Pharm Assoc 2001;41:856-67.
- ⁴ European Medicines Agency (EMA). *Note for guidance on the clinical requirements for locally applied, locally acting products containing known constituents, CPMP/EWP/239/95*. London 1995.
- ⁵ Aguiar AJ, Krc J, Kinkel AW, et al. *Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate*. J Pharm Sci 1967;56:847-53.
- ⁶ Viscomi GC, Campana M, Barbanti M, et al. *Crystal forms of rifaximin and their effect on pharmaceutical properties*. CrystEngComm 2008;10:1074-81.
- ⁷ Marzo A, Ismaili S. *A randomised, crossover study to evaluate the safety and the pharmacokinetic profiles of a single oral dose (400 mg) of amorphous rifaximin in comparison with a single oral dose (400 mg) of Normix® (rifaximin polymorph- α) in healthy volunteers*. Dig Liv Dis 2010;42S:S191-2.