

“In ricordo di Adolfo Turano
Maestro di Microbiologia e uomo di grande cultura”

Diagnosi molecolare di *Helicobacter pylori* a confronto con tecniche tradizionali

C. Fontana^{1,2}, M. Ciotti^{1,2}, M. Favaro³, E.S. Pistoia^{1,2}, A. Pietroiusti⁴, A. Galante⁴, C. Favalli^{1,2}

¹ *Cattedra di Microbiologia Clinica, Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,
Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”*

² *Microbiologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Tor Vergata*

³ *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”*

⁴ *Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”*

Riassunto. L'*Helicobacter pylori* (HP) è un patogeno di rilevante interesse clinico. Inizialmente associato alle patologie del distretto gastrico è risultato coinvolto direttamente o indirettamente in altre patologie come l'infarto miocardico e l'ictus. Il suo algoritmo diagnostico è complesso ed articolato. Il “gold standard” diagnostico è la gastro-duodenoendoscopia abbinata con l'istologia, il test rapido dell'ureasi e/o il metodo colturale. Anche le tecniche più tradizionali, tuttavia, non sono scevre da limitazioni e su tutte domina l'effetto interferente dovuto all'assunzione di farmaci nel periodo immediatamente precedente alla indagine endoscopica. Il nostro lavoro volto alla validazione di una metodica di amplificazione molecolare direttamente nel campione biotico, ha dimostrato come fosse possibile superare tali problematiche, pervenendo in tempi brevi ad una diagnosi rapida accurata e sensibile di *H. pylori*. Nel nostro studio sono stati presi in considerazione 186 pazienti dispeptici di cui 79 sono stati definiti pazienti *H. pylori*-positivi sulla base della nostra metodica molecolare contro i 68 diagnosticati utilizzando i saggi tradizionali. Il saggio che prevede l'amplificazione di una porzione genomica del 23S rRNA, nella quale risiede uno dei meccanismi di resistenza alla claritromicina, ha anche consentito di ottenere delle indicazioni predittive sulla farmaco resistenza degli *H. pylori* che colonizzavano la mucosa gastrica dei pazienti esaminati.

Abstract. *Helicobacter pylori* (HP) is a pathogen of relevant clinical significance. Primarily associated to gastric disease was then implicated in other pathologies such as Myocardial infarction and cerebral ischemia. The diagnosis of HP is of particular complexity. Gastroduodenal endoscopy in combination of histology, the rapid urease test and/or cultural method represents the diagnostic “gold standard”. However, each methodology is not without problems and limitations. The main one is the interference due to the assumption of drugs in the time before endoscopy. Aim of the present study was to evaluate the reliability of our amplification method (P.C.R.), directly performed in the biotico sample, for the diagnosis of *H. pylori* infection. The system has been demonstrated to be simple and accurate allowing a rapid diagnose of HP infection. On a total of 186 adult dyspeptic patients examined, 79 resulted HP-positive on the basis of our method versus the 68 diagnosed by traditional methods. Moreover our technique amplifying a portion of 23S rRNA of HP, where can be present mutation responsible for claritromycin resistance, has a predictive value about the drugs resistance expressed by *H. pylori* strains who had colonized the gastric mucosa of patients that underwent endoscopy.

Introduzione

Le prime indicazioni che suggerivano la presenza di microrganismi spiralati nella mucosa gastrica animale risalgono ad oltre 100 anni fa ad opera di Rappin nel 1881 e successivamente da Bizzozero nel 1883 (37). Tuttavia solo nel 1982 il *Campylobacter*

pyloridis (più tardi classificato come *Helicobacter pylori*) fu coltivato a partire da un frammento di biopsia gastrica umana in pazienti con gastrite di tipo B (39). Da quel momento la letteratura a questo riguardo è stata particolarmente florida e a tutt'oggi si assiste alla descrizione di nuove specie di *Helicobacter* isolate nell'uomo e negli animali. Attualmen-

te, al genere *Helicobacter* si riconoscono 22 specie. Per semplicità diagnostica si differenziano in *Helicobacter*-gastrici ed *Helicobacter*-enterici. Gli *Helicobacter*-enterici colonizzano il tratto gastrointestinale: piccolo intestino, colon, retto, e vie epatobiliari dei mammiferi e degli uccelli (37). I membri di questo gruppo sono responsabili di gastroenteriti nell'uomo e negli animali domestici che ne rappresentano il serbatoio. All'infezione primaria, di solito di modesto rilievo, può seguire la disseminazione per via ematica che si accompagna, soprattutto negli immunodepressi, a manifestazioni di tipo sistemico come artrite e meningite (5). Sono anche stati segnalati casi di batteriemia e meningite neonatale (29). Al contrario degli enterici gli *Helicobacter*-gastrici colonizzano la mucosa gastrica, o più semplicemente si possono ritrovare nel muco gastrico adiacente all'epitelio, ma solo raramente guadagnano il torrente circolatorio. Il membro più rappresentativo del gruppo è *H. pylori*. Colonizza preferenzialmente alcune regioni dello stomaco e del piccolo intestino, quali: antro, angulus, corpo, e duodeno. Può essere presente in forma transiente nella saliva, nella placca dentaria o nelle feci (13,21,22). Nella trasmissione interumana sono chiamate in causa diverse vie quali: la fecale-orale, la orale-orale e la trasmissione persona-persona. Numerosi studi di carattere epidemiologico sostengono che la trasmissione persona-persona sia la principale via di disseminazione nell'ambito familiare soprattutto nella primissima infanzia (38). La presenza di *H. pylori* nella saliva e nelle feci di animali domestici (il gatto per esempio), così come quella di *H. heilmannii*, nello stomaco del cane, sostengono anche l'ipotesi di una possibile diffusione zoonotica di questi microrganismi.

I primi autori a proporre l'associazione fra *H. pylori* e l'ulcera peptica furono, com'è noto, Warren e Marshall, ma solo nel febbraio del 1994 la "National Institute of Health Consensus Development Conference" concluse che questo microrganismo doveva essere ritenuto la principale causa di ulcera peptica e sancì la necessità che tutti i pazienti con ulcera peptica, per i quali al contempo era dimostrata la presenza di questo microrganismo, dovessero ricevere terapia antibiotica eradicante (27). Nel giugno dello stesso anno "International Agency for Research on Cancer Working Group of the World Health Organization" riconobbe l'*H. pylori* come un patogeno primario (di gruppo I) riconoscendone un ruolo anche come carcinogeno umano (20). Allo stato attuale si stima che circa il 50% della popolazione mondiale sia infetta. La seroprevalenza oscilla dal 20%, nella popolazione giovanile, ad oltre il 50% negli adulti per raggiungere punte del 90% negli ultra sessantenni (26). Le manifestazioni cliniche dell'infezione vanno dalla gastrite acuta, che si manifesta a circa

due settimane dall'inizio dell'infezione (con dolori addominali, nausea e vomito), alle forme croniche che si manifestano prevalentemente con una gastrite antrale attiva e talvolta si accompagnano (circa 16% dei casi) a duodeniti legate alla comparsa di ulcere duodenali. Molti pazienti, tuttavia, presentano sintomi addominali ricorrenti senza le tipiche manifestazioni gastriche. Nei pazienti con infezioni gastriche datate, lo stato di persistente infiammazione può essere la causa di metaplasia con successiva atrofia della mucosa gastrica. Stato quest'ultimo che va considerato come lesione precancerosa che può evolvere in adenocarcinoma gastrico, o nel linfoma gastrico (gastric mucosa-associated lymphoid tissue; MALT) (16, 40).

Data la sua elevata prevalenza e il suo inequivoco significato clinico emerge l'evidente importanza di una diagnosi precisa ed attendibile di questo patogeno. Purtroppo, data la sua localizzazione, l'unica possibilità di rilievo prevede inevitabilmente un prelievo invasivo e poco gradito al paziente ossia la endoscopia gastrica, che peraltro è inevitabile soprattutto se si vuole accertare lo stato della mucosa gastrica. Numerose sono state, infatti, nel corso del tempo le proposte alternative per la diagnosi dell'infezione da *H. pylori*, ma sebbene la maggior parte di esse presenti una buona accuratezza diagnostica il "gold standard" diagnostico, allo stato attuale è e rimane la biopsia gastrica. Quest'ultima è utile per la conduzione dell'esame istologico e per l'allestimento del metodo colturale tradizionale. I metodi diagnostici oggi a disposizione vengono suddivisi per semplicità in metodi invasivi e metodi non invasivi. Al primo gruppo appartengono quelli diretti, ossia: l'istologia, esame colturale, test rapido dell'ureasi, e in generale i metodi molecolari. Ai metodi non invasivi anche detti indiretti appartiene: urea breath test, la sierologia e la ricerca degli antigeni di *H. pylori* nelle feci con tecniche EIA (Enzyme Immunosorbent Assay). L'indagine invasiva pur consentendo un'esame più approfondito dello status mucosale gastrico del paziente e la ricerca diretta dell'*H. pylori*, non è sempre consigliato quanto meno nelle fasi iniziali di screening. Ciò per ragioni che includono l'atteggiamento psicologico del paziente, che non si sottopone volentieri ad indagini invasive, o per problematiche più pratiche come la riduzione del carico lavorativo e dei costi che un'indagine endoscopica di massa comporterebbe. Pertanto, nelle fasi iniziali dell'accertamento diagnostico si preferisce ricorrere a test non invasivi. Primo fra tutti l'urea breath test (UBT), di semplice esecuzione ed affidabile, presenta una sensibilità compresa fra il 94-100% ed una specificità compresa fra il 95-98%. E' innocuo, caratteristica che lo rende applicabile anche alle gestanti o ai bambini in età pediatrica. Per queste ra-

gioni è considerato il test diagnostico d'elezione e viene proposto come esame di screening, per tutti i pazienti dispeptici da avviare al trattamento, assieme alla sierologia. Il test, soprattutto la versione che utilizza ^{13}C , che non presenta le problematiche legate alla pollution radioattiva, ha poche limitazioni tra cui la principale risiede nel fatto che un paziente che nel recente ha assunto antibiotici o inibitori della pompa protonica o di sali di bismuto presenterà una notevole riduzione dell'attività ureasica potendo risultare come falso-negativo. Alla stessa stregua un paziente che alberga, anche solo in forma transiente altri batteri ureasi positivi o che presenta sanguinamento, anche modesto, della mucosa gastrica, può risultare falso positivo (18).

La colonizzazione della mucosa gastrica da parte di *H. pylori*, sviluppa una forte risposta immunitaria a carattere locale. Gli anticorpi, pur legandosi con il batterio, non garantiscono la clearance spontanea né la protezione da successive reinfezioni o recrudescenze. Con la cronicizzazione dell'infezione si sviluppa una reazione anticorpale sistemica, con aumento del titolo di anticorpi specifici di classe IgG (presenti nel 100% dei pazienti positivi ad *H. pylori*) ed IgA (presenti solo nel 60-80% dei pazienti *H. pylori*-positivi), mentre la produzione di IgM è poco significativa, di breve durata e si riscontra solo in percentuale molto contenuta dei pazienti esaminati (4-8%). La determinazione dei livelli sierici di IgG rappresenta il test preferito dal momento che il titolo anticorpale delle IgG specifiche rimane costante durante tutto il corso dell'infezione e decresce, in un periodo compreso fra i 6 mesi ed i 2 anni, in seguito ad eradicazione del batterio (7,11). La risposta anticorpale può essere rivelata con diverse metodiche immunochimiche, delle quali l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) è la più utilizzata, per i costi contenuti, la semplicità di esecuzione e l'accuratezza diagnostica (sensibilità e specificità del 95%). Quest'ultima è una caratteristica che è fortemente influenzata dalla natura della preparazione antigenica e dal valore di cut-off scelto per definire la positività ciò è anche stato motivo di grande confusione sul valore diagnostico di questo test accendendo una sorta di diatriba internazionale fra sostenitori e non della sierologia. Il problema principale risiede nel fatto che nel corso degli anni si è assistito ad un vero e proprio fiorire di sistemi cosiddetti sierologici, molti dei quali immessi sul mercato senza le necessarie prove di valutazione. La più grossa confusione ha riguardato i sistemi sierologici quantitativi, ossia i metodi EIA, e quelli qualitativi, ossia i saggi al lattice. Quest'ultimi si sono diffusi per via del loro basso costo, per il fatto che erano rapidi, potendo essere eseguiti anche direttamente nello studio del medico di base (si potevano eseguire anche su

una goccia di sangue intero). Tuttavia la efficacia diagnostica di questi test era assai discutibile e ben presto è stato relegato loro un modesto significato (11). Di altra natura è stato il problema che concerne la sierologia eseguita con i metodi EIA. Questi metodi vanno, infatti, distinti in saggi di prima e di seconda generazione. I primi utilizzano estratti antigenici derivati da sonicati di *H. pylori* in toto che spesso cross reagiscono con gli antigeni di *Campylobacter coli* e di *C. jejuni*. I secondi utilizzano miscele di uno o più antigeni acido estratti e purificati che consentono di ottenere valori di specificità e sensibilità decisamente più soddisfacenti e che devono pertanto essere considerati d'elezione quando si voglia eseguire una valutazione dello status sierologico di un paziente dispeptico e quando si voglia monitorare l'andamento anticorpale post-terapia eradicante (33). L'utilizzo della sierologia nel monitoraggio della terapia eradicante a breve termine è relativamente limitato, dal momento che l'eradicazione del microrganismo si accompagna ad una lenta riduzione del titolo di IgG, circa pari al 20% dopo sei settimane e del 50% dopo sei mesi. Riduzione che è, tuttavia, predittiva del successo terapeutico (17). L'ultimo aspetto riguarda i test EIA che consentono la ricerca di anticorpi specifici anti-CagA. Si tratta di sistemi molto specifici e utili per una valutazione rapida dell'espressione di *cag A* e quindi per la valutazione del rischio, in paziente infetto da *H. pylori*, di evoluzione verso l'ulcera o verso il cancro. Il loro valore, ai fini di uno screening pre-endoscopico, rimane ovviamente assai discutibile, dato che solo il 40% degli stipiti di *Helicobacter* risulta CagA+ (36).

Di più recente introduzione il saggio EIA per la ricerca di *H. pylori* direttamente nelle feci del paziente. E' un saggio dal futuro promettente i cui risultati hanno un valore diagnostico e consentono di monitorare la risposta alla terapia, già a quattro settimane dalla fine della terapia stessa. Si tratta di un saggio immunoenzimatico qualitativo per la ricerca dell'antigene di *H. pylori* nei campioni fecali. Presenta una buona accuratezza diagnostica con una sensibilità compresa fra 84-100% ed una specificità compresa fra il 93-100%. Percentuali variabili in relazione al campione di popolazione esaminata, ossia a seconda se trattasi di screening preendoscopico o di monitoraggio post-terapia. Anche in questo caso sono segnalati falsi negativi da interferenza farmacologica, soprattutto se il paziente ha assunto farmaci nelle due settimane che precedono il prelievo (34).

Di fronte agli indubbi vantaggi le metodiche non-invasive devono, tuttavia, confrontarsi con il valore delle indicazioni che derivano dall'indagine endoscopica (esofago-gastroduodenoscopia). Questa racchiude in se l'osservazione diretta della condizione

della mucosa gastrica (consentendo il prelievo di materiale biotico nei punti ove condizioni di iperemia o di erosione facciano supporre la presenza del microrganismo), la possibilità di un attento esame istologico e colturale dei frammenti biotici esaminati, nonché la possibilità d' eseguire un test rapido dell'ureasi. Solitamente sono tre o quattro i siti gastrici sottoposti a prelievo biotico ed indagati per la presenza di *H. pylori*: antro, angulus, corpo e talora duodeno. Su questi frammenti si può allestire un test per il saggio rapido dell'ureasi (Clo-test, CP-test, HUT test ecc), e al contempo inviarne altri al laboratorio di istologia e di microbiologia per le rispettive diagnosi. Per la diagnosi istologica la tipica morfologia di *H. pylori* e i rapporti ben definiti con la mucosa gastrica sono in genere sufficienti per una corretta identificazione. L'esame istologico rappresenta quindi un sistema semplice ed attendibile per l'identificazione del batterio. Numerose sono anche le possibili colorazioni impiegate: la Warthin-Starry permette ad esempio un'ottima visualizzazione del microrganismo attraverso un'impregnazione argentea dello stesso. La colorazione Giemsa è quella maggiormente impiegata per la semplicità di esecuzione per i suoi bassi costi e per il fatto che comunque presenta risultati sovrapponibili con la precedente. Mentre è scarsamente impiegata la colorazione Gram sugli strisci di mucosa in quanto l'*H. pylori* si colora scarsamente e il metodo presenta una modesta sensibilità. L'esame istologico con la colorazione ematossilina-eosina è il più appropriato soprattutto per effettuare la valutazione della gastrite. La scelta della tecnica dipende dalle disponibilità del laboratorio e dalle preferenze dell'istopatologo. E' pratica comune associare due tipi di colorazioni quali per esempio: Giemsa e ematossilina/eosina (32). Tra i possibili aspetti negativi di questa metodica vi è il fatto che il risultato sia comunque condizionato dall'esperienza dell'osservatore, dalla qualità e dalle sede dei prelievi effettuati e che necessiti di tempi lunghi di processazione. Risente, inoltre, anch'essa degli effetti interferenti della terapia con antibiotici ed antisecretori, soprattutto se effettuate in vicinanza temporale con il momento del prelievo. Abbinamento auspicabile è quello dell'esame istologico con quello microbiologico, che rappresenta per molti il "gold standard". L'esame colturale presenta una sensibilità pari al 100% e consente di tipizzare gli stipiti isolati e da un punto di vista biochimico e da un punto di vista genetico mediante lo studio del locus PAI o di quello di *vacA*. Offre, soprattutto, la possibilità di saggiare gli stipiti isolati nella loro antibiotico sensibilità, consentendo di impostare una terapia eradicante mirata, soprattutto per quei pazienti che presentano allergie ai farmaci delezione utilizzati per l'eradicazione del microrganismo (37).

A tal proposito va detto che non esiste ancora un sistema standardizzato per l'esecuzione dell'antibiogramma a causa della lenta crescita del microrganismo e per la necessità di incubazione in atmosfera microaerofila. E', tuttavia, pratica comune ricorrere all'impiego degli E-test la cui accuratezza e riproducibilità è stata dimostrata (30). *In vitro*, l'*H. pylori* è sensibile alle cefalosporine ed alle penicilline, ai macrolidi, alle tetracicline ai nitroimidazolici, nitrofurani, ai chinoloni nonché ai sali di bismuto ed agli inibitori della pompa protonica. Mentre è intrinsecamente resistente verso gli H2 bloccanti (cimetidina e ranitidina) e nei confronti di polimixina e trimethoprim (1). Le conseguenze della resistenza antimicrobica sull'efficacia della terapia sono varie e non sempre prevedibili. Per esempio la resistenza ai nitroimidazoli (metronidazolo e tinidazolo) è molto variabile, oscilla infatti fra 11-70% (37). La variabilità è in gran parte legata alla regione geografica di provenienza dell'individuo, in quanto nei paesi del terzo mondo afflitti da numerose infezioni protozoariche in cui è estremamente diffuso l'uso di nitroimidazolici, la percentuale di resistenza sfiora il 95% (14).

I meccanismi di resistenza verso questo gruppo di molecole non sono ancora stati determinati, probabilmente sono legati al fatto che in condizioni di microaerofilia non si raggiunge il potenziale redox sufficientemente negativo da consentire la trasformazione del metronidazolo nel suo metabolita attivo, così come potrebbe essere implicata una mutazione puntiforme nel locus *recA*. La resistenza ad altre famiglie di antibiotici si registra assai di rado. Per esempio i macrolidi (tra cui la claritromicina, molto usata nella terapia eradicante) sono generalmente attivi e quando somministrati in terapia combinata con il metronidazolo ne mitigano perfino la resistenza. Quando presente, la resistenza alla claritromicina, è dovuta ad una mutazione con transizione da A a G nella posizione 2515-2514bp del 23SrRNA, resistenza che si presenta in circa il 10% degli isolati (28). Da uno studio recente si evidenzia che un altro probabile meccanismo di resistenza verso questo gruppo di molecole, che sarebbe alla base soprattutto della resistenza intrinseca di *H. pylori*, prevede la presenza di pompe di efflusso non energia dipendenti espresse soprattutto *in vivo* (4). Lo studio dell'antibiotico resistenza non è solo utile, ma di vitale importanza per la sua efficace eradicazione. Studio che si deve necessariamente fondare sull'impiego dei metodi tradizionali, ma è fortemente consigliato procedere anche mediante l'impiego di tecniche di amplificazione molecolare, consentendo, quest'ultime di esaminare la variabilità genetica di questo microrganismo che non solo è associata alla diversa patogenicità degli isolati, ma anche alla comparsa

della resistenza agli antimicrobici (9).

In questo senso prolifica è la letteratura riguardante la applicazione di tecniche di amplificazione. Utilizzate in principio soprattutto per lo studio della variabilità genetica di alcune regioni genomiche di *H. pylori* ritenute importanti ai fini della conoscenza dei meccanismi patogenetici. Era il caso di quelle tecniche che riguardavano il locus *vac A* e di tutti i suoi alleli, o quelle che riguardavano la PAI e *cag*. Frutto della ricerca di base, costituiscono oggi un punto di riferimento per i clinici in quanto forniscono indicazioni predditive sull'andamento della malattia da *H. pylori* (2, 6, 35). Accanto ad esse metodiche molecolari più comuni, non meno importanti, che prevedono l'amplificazione di regioni quali *ureA*, *ureB* ovvero di porzioni del 16S rRNA altamente specifiche per l'*H. pylori*. Consentono di rivelare anche cariche batteriche molto modeste, talora direttamente nel campione clinico. E' noto, infatti, che la Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) in tutte le sue possibili variazioni, sia una tecnica molto specifica e molto sensibile (sensibilità e specificità pari al 100%). Tanto che almeno in linea teorica sia possibile l'amplificazione e quindi la rilevazione anche di una sola copia genomica. Nella realtà, tuttavia, il limite di sensibilità è più elevato, in quanto l'efficacia della amplificazione viene fortemente influenzata dalle tecniche di estrazione del DNA, che inevitabilmente riducono il numero di copie genomiche di partenza, e dalla presenza di inibitori della reazione, che possono essere presenti nel campione clinico. Pertanto, l'efficienza della reazione si ridimensiona e la sensibilità del metodo difficilmente supera quella della coltura, ossia circa il 95%, per scendere, in campioni che per loro natura contengono numerosi inibitori della Taq polimerasi, fino all'84% (9,35).

Anche l'introduzione di possibili varianti sul tema come emi-nested, nested-PCR o Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) non ha di molto modificato la realtà dei fatti. Tuttavia, nonostante i problemi legati alla standardizzazione del metodo, la potenzialità di questo sistema è indubbia e ciò è dimostrato dall'evidenza che la maggior parte dei laboratori referenziati, sia di diagnostica microbiologica che di ricerca, si è organizzata allestendo tecniche molecolari in parallelo con le metodiche più tradizionali.

Scopo di questo lavoro è proprio quello di descrivere una nuova metodica di amplificazione molecolare (PCR), messa a punto nel nostro laboratorio, e di comparare i risultati forniti con quelli di tecniche più convenzionali standardizzate, ossia: metodo colturale (includendo in esso lo studio della farmaco sensibilità degli isolati), esame istologico, ricerca dell'antigene fecale e sierologia. Quest'ultima in particolare volta sia alla determinazione del titolo di immunoglobuline di classe IgG, nonché alla ricerca

di immunoglobuline specifiche prodotte verso Cag A.

La nostra metodica, in particolare, prevede l'amplificazione di una particolare porzione genica, ossia 23S rRNA, questo in quanto la finalità della reazione non è solo quella di mettere a punto una tecnica che ci consenta la diagnosi rapida di *H. pylori* direttamente dal campione biotico, ma anche di poter studiare eventuali mutazioni in questo locus che potessero essere fonte di resistenza ai macrolidi.

Materiali e metodi

Nello studio sono stati arruolati 186 pazienti dispeptici (con età media 45anni), che si erano recati presso l'ambulatorio di Gastroenterologia della Cattedra di Clinica Medica dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", presso l'Ospedale S.Eugenio di Roma.

Nel corso della esofago-gastroduodeno endoscopia si procedeva al prelievo in doppio di almeno tre frammenti di mucosa gastrica: antro, corpo e duodeno; talora includendo anche la porzione relativa all'angulus. Nel caso in cui il paziente non presentasse all'esame endoscopico nessuna lesione evidente della mucosa si procedeva con il prelievo di un solo frammento proveniente dall'antro. I campioni, conservati a +4°C in soluzione fisiologica sterile, venivano consegnati al nostro laboratorio (Cattedra di Microbiologia Clinica, "Università di Tor Vergata") ed a quello di Istologia (della medesima Università) entro le 6 ore dal momento del prelievo (9).

Nel corso della medesima seduta al paziente veniva effettuato un prelievo di sangue venoso per l'esecuzione dei saggi sierologici, e veniva richiesta la consegna di un campione di materiale fecale, per la ricerca dell'antigene di *H. pylori*. Consegna che comunque doveva avvenire prima dell'inizio di una qualunque terapia.

Esame colturale

All'arrivo in laboratorio il frammento di biopsia gastrica veniva prontamente seminato su terreno di coltura selettivo preparato di recente. Si tratta dell'*Helicobacter pylori* Medium nella formulazione Dent Agar (Oxoid) addizionato della miscela selettiva (costituita da 5,0 mg di vancomicina, 2,5 mg di trimetoprim lattato, 2,5 mg di cefsuldina, 2,5 mg di amphotericina B; per 500ml di terreno) e del 7% di sangue defibrinato sterile di cavallo. Il frammento biotico veniva prima strisciato sulla superficie del terreno e poi utilizzato per l'esecuzione del test dell'ureasi. Le piastre così seminate venivano incubate a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ in presenza del 95% di umidità ed in at-

mosfera microaerobia (10% CO₂, 5% di O₂, 85% N₂) utilizzando giare e buste per microaerofilia (Campy-gen; Oxoid). La crescita si dimostrava apprezzabile già dopo 3-5 giorni di coltura, tuttavia i campioni venivano considerati negativi solo al termine del 21° giorno di incubazione. Come controllo di qualità del metodo colturale, per ogni serie di biopsie esaminata si introduceva un ceppo di referenza internazionale ossia *H. pylori* proveniente dall'American Type Culture Collection ATCC 43504.

Identificazione degli isolati

Gli stipiti isolati venivano sottoposti a sub-coltura su terreno non selettivo al fine di evidenziare possibili colture miste. L'identificazione presuntiva era condotta sulla base della morfologia evidenziata nella reazione Gram, della prova della catalasi e dell'ossidasi. L'identificazione definitiva veniva effettuata mediante l'utilizzo di un sistema commerciale standardizzato: API CAMPY (bioMérieux).

Studio della farmaco sensibilità-Determinazione della MIC

Gli antibiotici utilizzati per saggiare la farmaco sensibilità degli isolati sono stati scelti in relazione ai farmaci utilizzati nella terapia eradicante, seguendo le indicazioni Consensus Conference of Maastricht: Claritromicina (CH), Amoxicillina (AC), Metronidazolo (MZ) e Tetraciclina (TC) (27). La MIC è stata determinata utilizzando gli E-test (AB biodisk, Solna, Sweden). Nel dettaglio la procedura prevedeva, a partire dagli isolati provenienti da una coltura in fase esponenziale, la preparazione di un inoculo batterico di opacità corrispondente al punto 2 della scala McFarland (circa 2×10^8 CFU/ml) in Brucella Broth (Oxoid). La sospensione batterica così allestita veniva utilizzata per inoculare in superficie Müller-Hinton Agar (Oxoid) addizionato del 10% di sangue lisato sterile di cavallo e distribuito in piastre di 10cm di diametro. Per la semina si ricorreva all'impiego di tamponi di cotone sterili, che immersi nell'inoculo batterico venivano poi strisciati sulla intera superficie del terreno, seguendo tre direzioni, ciascuna ruotata rispetto alla precedente di circa 60°. Ciò assicurava una crescita omogenea e confluyente, ideale per la lettura dell'antibiogramma. Le piastre inoculate venivano lasciate asciugare per 5-15 min e quindi si procedeva all'applicazione, usando gli appositi dispenser, delle strisce degli E-test. Per ogni isolato si allestivano 4 piastre, una per ogni molecola testata, ed in ciascuna piastra si applicava una striscia contenente l'antibiotico. Trascorsi tre giorni di incubazione in atmosfera umida e microaerobia a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ si apprezzavano gli aloni di inibizione ottenuti. Tali aloni consentivano di risalire alla Minima Concentrazione Inibente (MIC), determinata dall'in-

tercetta dell'alone medesimo sulla striscia degli E-test. I valori di riferimento, per stabilire la resistenza alle quattro molecole studiate, derivano dalla lettura internazionale (8, 30).

Test dell'ureasi su frammento bioptico

Il frammento bioptico, dopo semina su terreno selettivo, veniva quindi trasferito in 100 µl di Urea-broth (bioMérieux). Data la massiccia produzione di ureasi ad opera di questo microrganismo, la prova mostrava la sua positività (viraggio al rosa-fucsia dell'indicatore, rosso fenolo, presente nel medium, dovuta all'idrolisi dell'urea presente nel mezzo in ammonio e anidride carbonica) già pochi minuti dopo l'incubazione e comunque entro la prima ora di incubazione. Per i negativi si prolungava l'incubazione fino ad un massimo di 24h (9).

Esame istologico

I frammenti bioptici erano conservati nella soluzione di Carnoy fino all'allestimento della colorazione con ematossilina eosina (9, 24).

Saggi sierologici quantitativi

Pyloriset EIA-G (Orion)

I campioni di sangue, provenienti dai pazienti inclusi nello studio, venivano centrifugati per ottenere il siero a $3,000 \times g$ per 10 min. Il siero veniva congelato a -20°C e scongelato una sola volta al momento dell'allestimento dei saggi EIA. In particolare per la determinazione del titolo delle immunoglobuline di classe G (IgG) si utilizzava il sistema commerciale Pyloriset EIA-G (Orion) seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Si considerano positivi i pazienti con un titolo anticorpale ≥ 300 .

Saggio sierologico per la ricerca di anticorpi anti-Cag A

CagA IgG EIA well (Radim; Angleur, Belgio). Il sistema è basato sulla rivelazione di anticorpi specifici anti-CagA utilizzando un sistema immunoenzimatico che utilizza un anticorpo marcato con perossidasi. I campioni di siero, diluiti 1:300 con una soluzione diluente fornita dal sistema, vengono dispensati in misura di 100 µl per micropozzetto. Anche in questo caso si procedeva seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Si considerano positivi i campioni con valori >15 UR/ml e negativi i campioni con valori <15 UR/ml.

Saggio EIA per la ricerca dell'antigene di H. pylori nelle feci

Premier Platinum *H.pylori* SA (Meridian Diagnostic; USA) (38). Il campione consegnato al laboratorio, veniva conservato chiuso a $2-8^\circ\text{C}$ fino al momento dell'esame che doveva avvenire entro le 72

ore dal momento della raccolta. Alternativamente i campioni dovevano essere conservati in congelatore a -20°C o -80°C al fine di scongiurare la digestione proteolitica dell'antigene di *H. pylori* ad opera delle proteasi naturali presenti nelle feci. Il sistema utilizza un anticorpo policlonale anti-*H. pylori* adsorbito su micropozzetti. I pozzetti dopo l'aggiunta del campione diluito (il diluente è costituito da una soluzione tampone contenente Thimerosal 0,02%) e di un anticorpo policlonale coniugato con perossidasi di rafano, vengono incubati per un'ora a temperatura ambiente. Viene poi effettuato un lavaggio per eliminare il reagente in eccesso (il tampone di lavaggio è costituito da tampone fosfato 180 mM pH 6,8). Dopo aggiunta del substrato la micropiastra viene incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. In presenza di enzima legato, si ha sviluppo di colore. Dopo aggiunta della soluzione di arresto (acido solforico 2N), si procede alla lettura visiva o spettrofotometrica dei risultati. Si legge a 450nm e si considerano positivi tutti i campioni con $\text{O.D.}_{450} \geq 0.160$. Per ogni saggio si allestiscono un controllo positivo, costituito da *H. pylori* ATCC 43504 inattivato alla concentrazione di 37,5 mg di proteina/ml, e controllo negativo.

Estrazione degli acidi nucleici

Al fine di procedere con la reazione di amplificazione molecolare le biopsie dei pazienti sulle quali era stato effettuato il test dell'ureasi venivano sottoposte a un doppio lavaggio in PBS (Phosphate Buffered Saline: 8gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,73 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,24 gr KH_2PO_4) centrifugando il campione a $6000 \times g$ per 10 min. Il pellet costituito da frammento di mucosa gastrica e batteri veniva risospeso in 300 μl di una soluzione di lisi (20mM Tris-HCl pH 8.0, 0,5% Tween 20) contenente 7.5 μl di una soluzione di Proteinasi K (10mg/ml). Il tutto veniva incubato per 1 h a 60°C . Al termine dell'incubazione la proteinasi veniva inattivata a 95°C per 10 min (25).

Tecniche di amplificazione molecolare:

Polymerase Chain Reaction del campione

La reazione si svolgeva in un volume finale di 50 μl in cui erano presenti: 10 μl del lisato del campione. Primers Hp1 e Hp2 rispettivamente alla concentrazione finale di 100 pmol/ μl (MWG-Biotech AG) La cui sequenza viene riportata di seguito:

Hp1 forward

5'-CCA-CAG-CGA-TGT-GGT-CTC-AG-3'
(2191-2210; U27270 Gene Bank) $T_m = 61,4^{\circ}\text{C}$

Hp2 reverse

5'-TGT-GTG-CTA-CCC-AGC-GAT-GCT-C-3'
(3182-3161; U27270 Gene Bank) $T_m = 64,0^{\circ}\text{C}$

Taq polimerasi 2.5 U e Buffer di reazione (50 mM di KCl, 10mM Tris-Cl pH 9.0, 1.5 mM MgCl_2) (Amersham Pharmacia Biotech) dATP, dCTP, dGTP, dTTP ciascuno alla concentrazione finale di 200 mM (Perkin Elmer); H_2O bidistillata q.b a 50 μl .

La reazione si componeva di una fase di denaturazione di 5 minuti a 94°C , e di 35 cicli di amplificazione, in cui si succedevano: denaturazione 94°C per 1 min, annealing 55°C per 1 minuto, estensione 72°C per 1 minuto. Al termine dei cicli 7 minuti di estensione a 72°C e quindi mantenimento a $+4^{\circ}\text{C}$ fino al controllo degli amplificati.

Controllo di specificità

Al fine di dimostrare la specificità della reazione ed evitare l'interferenza dovuta a campioni falsamente positivi, si è allestita una reazione di amplificazione nelle medesime condizioni descritte per i lisati delle biopsie gastriche, ma introducendo al posto del campione 10 μl di lisato di una coltura batterica (ottenuto applicando la stessa metodica di estrazione già descritta per i frammenti biotici) di alcuni stipiti appartenenti a generi vicini all'*H. pylori* com'è il caso di *H. heilmannii* (ATCC 49286) e di *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291), che peraltro possono essere causa con *H. pylori* di coinfezione rispettivamente nello stomaco e nel duodeno; ovvero di altre specie divergenti come *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ed *Escherichia coli* (ATCC 25922). Inoltre, per scongiurare l'evenienza di falsi negativi, su tutti i campioni negativi veniva ripetuta la reazione di PCR, partendo però da 1 μl della prima reazione di amplificazione. In tutte le reazioni si introduceva un controllo negativo, in cui al posto del lisato si aggiungevano, alla miscela di reazione, 10 μl di H_2O sterile ed un controllo positivo costituito da 10 μl di lisato di una coltura batterica di *H. pylori* ATCC 43504, la reazione si conduceva nelle medesime condizioni.

Controllo di amplificabilità

Per il controllo di amplificabilità, volto alla ricerca di una porzione genomica conservata codificante per la b-actina, la reazione si svolgeva secondo quanto descritto da Ponte et al. (31).

Rivelazione dei DNA amplificati

Note le dimensioni del frammento di DNA amplificato (842 bp), i prodotti della reazione venivano controllati mediante corsa sul gel d'agarosio al 2% in TAE 1% (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA pH 8). Il DNA veniva rivelato mediante l'aggiunta nel gel di un agente intercalante (bromuro d'etidio) alla concentrazione di 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e visualizzato al transilluminatore (UV 312nm). Il numero di coppie di basi (bp) degli amplificati veniva controllato impiegando

in ogni corsa un marcatore (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus).

Per verificare che l'amplificato corrispondesse realmente ad una porzione del genoma di *H. pylori*, e per accertare la presenza/assenza della mutazione responsabile della resistenza alla claritromicina sono state effettuate reazioni di sequenza sugli amplificati e sul controllo positivo di *H. pylori* ATCC 43504.

A tal proposito il DNA amplificato è stato exciso dal gel d'agarosio e purificato con QIAquick (Quiagen, Genenco).

Sequenziamento degli amplificati

Il DNA purificato è stato utilizzato per la successiva reazione di sequenza, che prevedeva l'impiego di un kit commerciale: ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer) che sfrutta il principio della reazione di marcatura a terminazione di catena (2). La miscela della reazione di sequenza prevedeva l'aggiunta di 3 µl di: Terminator Ready Reaction Mix per 100 ng DNA campione, primer Hp1 alla concentrazione finale di 3.2 pmol, H₂O bidistillata qb a 20 µl.

I campioni così ottenuti venivano posti in un termociclatore, nelle seguenti condizioni:- denaturazione 95°C per 2 minuti (per un solo ciclo), -successivi 25 cicli con denaturazione a 96°C per 10 secondi, annealing 50°C per 5 secondi, estensione 60°C per 4 minuti. I campioni così sequenziati venivano purificati con la colonnina Autoseq G-50 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) ed analizzati mediante "Analizzatore genetico a capillare" ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

Risultati

La diagnosi di infezione da *H. pylori* si è basata sui risultati combinati forniti dai saggi ritenuti "gold standard" diagnostico, ossia: istologia, test rapido dell'ureasi e coltura. Sono stati, pertanto, considerati *H. pylori*-positivi tutti i pazienti con almeno due saggi positivi dei tre presi come riferimento (23).

In totale dei 186 pazienti esaminati, 68 sono risultati *H. pylori*-positivi e 120 sono stati definiti negativi. In tabella 1 sono riportate le osservazioni endoscopiche relative ai 68 pazienti *H. pylori*-positivi. Nella tabella 2 sono riportati i referti endoscopici riferibile ai 120 pazienti negativi.

P.C.R e "gold standard"

Per i 68 campioni provenienti dai pazienti *H. pylori*-positivi abbiamo ottenuto una concordanza del 100% fra la nostra metodica di amplificazione (PCR) e i metodi presi come riferimento. Tenendo,

Tabella 1. Osservazioni endoscopiche dei pazienti *H. pylori*-positivi.

Referti endoscopici	n. pazienti
Normale	29
gastrite	14
cicatrici	6
ulcera gastrica	6
ulcera duodenale	1
erosioni	7
iperemia mucosale	3
ernia iatale	1
esofagite	1
Totale	68

Tabella 2. Osservazioni endoscopiche dei pazienti *H. pylori*-negativi.

Referti endoscopici	n. pazienti
Normale	69
Gastrite	7
Cicatrici	7
Ulcera gastrica	5
Ulcera duodenale	2
Erosioni	15
Iperemia mucosale	7
Ernia iatale	1
Carcinoma gastrico	2
Metaplasia	1
Esofagite	4
Totale	120

tuttavia, presente che l'efficacia diagnostica del nostro metodo è risultata superiore ai saggi di riferimento, quando quest'ultimi venivano valutati singolarmente. Infatti, l'istologia ha fornito 4 falsi negativi, il metodo colturale ha fornito 7 falsi negativi (unica eccezione facilmente spiegabile, due pazienti risultati negativi alla coltura, ma che avevano assunto farmaci anti-acido nell'immediata vicinanza al momento del prelievo), il test dell'ureasi ha fornito 9 falsi negativi (due dei quali probabilmente soggetti alla medesima interferenza farmacologica già evidenziata per la coltura) (figura 1). La PCR ha consentito, altresì, di individuare tra i 120 campioni negativi ben 11 pazienti, che in realtà dovevano essere considerati infettati da *H. pylori*.

Per 109 campioni dei pazienti definiti *H. pylori*-negativi si nota una completa sovrapposibilità dei ri-

Figura 1

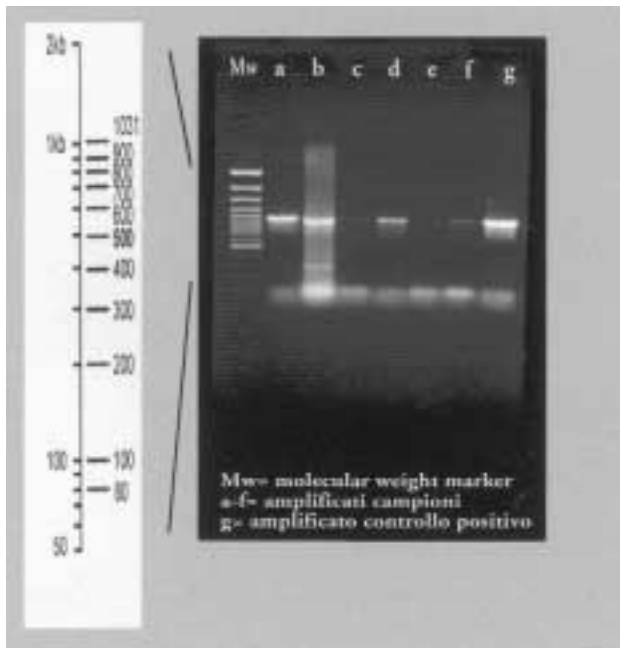
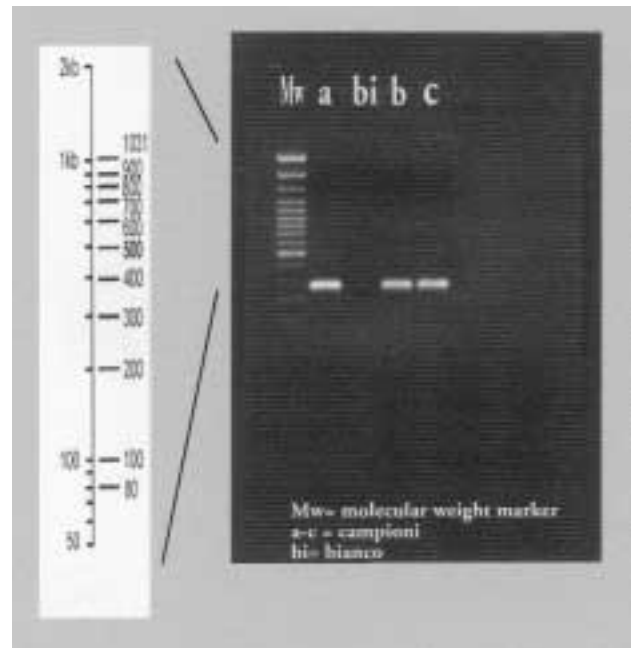


Figura 2



sultati dei saggi di riferimento con quelli ottenuti con la PCR, che, infatti, non ha fornito amplificati rivelabili.

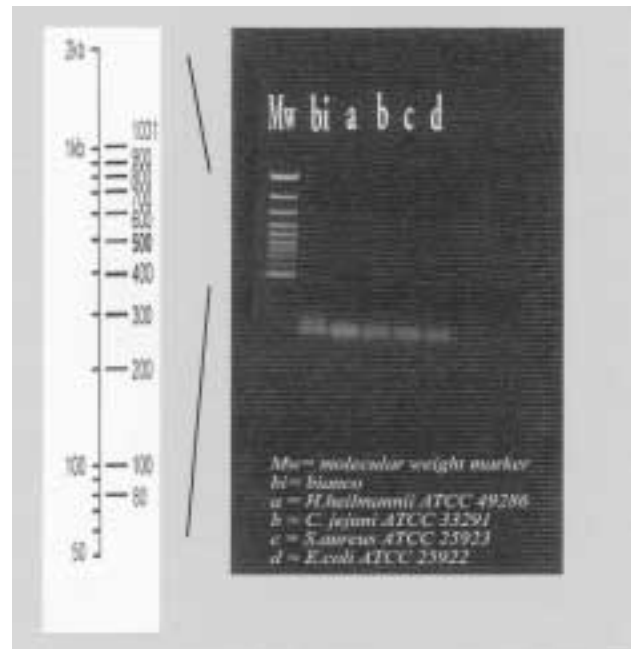
Per i rimanenti 11 (6 dei quali positivi al solo test dell'ureasi) la PCR ha mostrato la sua vera efficacia diagnostica fornendo amplificati evidenti per 7 campioni e molto modesti, tanto che è stato necessario una seconda amplificazione, per 4 di questi. Ciò è anche in linea con i referti endoscopici che si accompagnavano a tali campioni e che vedevano i primi sette pazienti con lesioni evidenti (ulcera, gastrite, erosioni, ecc.) i rimanenti quattro con un referto endoscopico nella norma. Indice quest'ultimo di probabile infezione iniziale ovvero di una infezione efficacemente contrastata dall'ospite dato che per tutti e quattro si rilevavano elevati titoli anticorpali.

A sostegno della attendibilità dei dati forniti dal nostro metodo vi sono i dati forniti dalle prove di amplificabilità e di specificità eseguite. In figura 2.3 sono riportate le foto delle corse su gel d'agarosio di alcuni campioni positivi unitamente alle prove di specificità ed amplificabilità in oggetto.

La prova di amplificabilità, eseguita per ogni lisato di frammento biotico, ha consentito di verificare l'assenza di inibitori di reazione, che potessero essere causa di campioni falsamente negativi (come si può facilmente evincere dalla foto in virtù della presenza di amplificati chiaramente rilevabili).

La prova di specificità ha consentito, invece, di dimostrare la specificità della nostra reazione di amplificazione. Come si può notare osservando la figura 2, infatti, non si sono ottenuti amplificati con i li-

Figura 3



sati di specie vicine ad *H. pylori* (com'è il caso di *H. heilmannii* e *C. jejuni*) né di specie geneticamente divergenti, ma che potevano essere presenti come contaminanti nel campione esaminato (*S. aureus* ed *E. coli*). Ciò esclude la possibilità di falsi positivi. Possiamo escludere la presenza di falsi-negativi in quanto nessun campione, risultato negativo, sottoposto a re-amplificazione ha fornito amplificato.

P.C.R e HpSA

I risultati del saggio EIA per la ricerca dell'antigene fecale di *H. pylori*, hanno avuto solo un valore presuntivo in quanto solo 19, fra i pazienti positivi, ha provveduto alla consegna delle feci. Tuttavia, dei 19 campioni esaminati 15 erano concordi con la diagnosi in PCR e con i sistemi di riferimento, mentre i rimanenti 4 erano avevano fornito risultati in disaccordo sia con i sistemi di riferimento che con i sistemi sierologici e la PCR (falsi-negativi). Anche per il gruppo di pazienti *H. pylori*-negativi, non è stato possibile effettuare una valutazione completa del saggio HpSa in quanto solo 29 pazienti hanno provveduto alla consegna di un campione fecale. Di questi 11 sono risultati positivi e 18 negativi. Tra gli 11 positivi, 4 erano risultati positivi anche alla PCR. Per questo gruppo di pazienti, pertanto, il saggio HpSA si è dimostrato utile e sicuramente con un valore predittivo di infezione, 7 campioni rimangono come probabili falsi-positivi (34).

P.C.R. e sierologia

Tutti i pazienti definiti positivi (68) e risultati positivi anche alla PCR presentavano titoli anticorpali elevati (IgG totali), mentre solo 28 di essi (28/68; circa il 42% dei pazienti) presentavano anticorpi anti-CagA, in linea con quanto riportato dalla letteratura internazionale (11, 36).

Mentre, come era facilmente prevedibile, si notano aspetti interessanti per quel che concerne i campioni provenienti dai pazienti definiti *H. pylori*-negativi, in quanto ben 42 pazienti presentavano una certa discordanza di dati. Negativi, come detto alla coltura ed all'esame istologico e talora al test rapido dell'ureasi, presentavano, tuttavia un certo movimento anticorpale. In particolare di questi 42:

-16 pazienti presentavano titoli anticorpali significativi sia per le IgG totali che per le IgG anti CagA (tra questi 11 pazienti, circa il 70%, mostravano una condizione normale della mucosa gastrica, i rimanenti 5, ossia il 30%, presentavano segni modesti di gastrite o più in generale erosioni lievi della mucosa medesima). In questo gruppo due pazienti (con lesioni mucosali) risultavano positivi al saggio di amplificazione molecolare. Pazienti che presentavano positività anche al test rapido dell'ureasi ed alla ricerca dell'antigene fecale.

-20 pazienti presentavano solo elevati titoli di IgG totali ma non IgG antiCagA. In questo gruppo circa il 55%, ossia 11 pazienti presentavano una mucosa gastrica normale, il 30%, ossia 6 pazienti manifestavano estese zone di iperemia, erosioni significative, ulcera e gli ultimi due, ossia il 10%, presentavano metaplasia. In particolare, i due pazienti afferenti a questo gruppo erano gastroresecati per un carcinoma gastrico e stavano effettuando un controllo post-intervento.

A quest'ultimo gruppo appartengono 7 dei campioni con PCR positiva. Due dei quali accompagnati anche dalla positività per l'antigene fecale e dal test dell'ureasi positivo. Altri due campioni risultavano positivi alla PCR ed al test dell'ureasi. I rimanenti 4 positivi solo alla PCR.

-6 pazienti, infine, presentavano insolitamente un elevato titolo di IgG anti-Cag A, ma non IgG totali. La gran parte di questi presentava un'esame endoscopico normale mentre circa il 30% presentava segni di erosione mucosale.

Tra quest'ultimi fra l'altro trovano posto due pazienti che erano risultati positivi anche alla P.C.R. in assenza di altri marker di infezione.

I risultati per questo gruppo sono riassunti in tabella 3.

Tabella 3. Caratteristiche riassuntive degli 11 pazienti *H.pylori*-negativi con PCR positiva.

	Campione	Istologia	Coltura	Ureasi	PCR	IgG tot	IgG anti-CagA	Feci
gruppo di 16 campioni	erosioni	-	-	+	+	+	+	+
	erosioni	-	-	+	+	+	+	+
	carcinoma	-	-	+	+	+	-	+
	carcinoma	-	-	+	+	+	-	-
	metaplasia	-	-	+	+	+	-	+
gruppo di 20 campioni	gastrite	-	-	-	+	+	-	-
	normale	-	-	-	+	+	-	-
	normale	-	-	-	+	+	-	-
	normale	-	-	-	+	+	-	-
gruppo di 6 campioni	erosioni	-	-	-	+	-	+	-
	normale	-	-	-	+	-	+	-

P.C.R ed antibiotico resistenza

I 68 isolati provenienti dai campioni risultati positivi, sono stati caratterizzati biochimicamente. Non si sono riscontrate significative differenze nei pattern biochimici presentati dai microrganismi. L'unica variabilità degna di rilievo riguardava l'attività enzimatica: trifeni-tetrazolio cloruro reductasi. Questo enzima, che secondo la letteratura non rientra fra le attività tipiche di questo microrganismo, è risultata positiva nel 24% degli isolati (37). La farmaco sensibilità mostrata dagli stipiti era in linea con quanto riportato in letteratura (8, 28, 30). Le uniche resistenze apprezzabili sono state riscontrate per la claritromicina e per il metronidazolo, rispettivamente del 13% e del 29% sul totale degli isolati. Nel caso della claritromicina, tuttavia, si trattava più che vere e proprie resistenze di diminuzione della sensibilità. Non sono, infatti, state riscontrate MIC superiori ai 2 µg/ml che rappresenta il limite inferiore che definisce la resistenza (28).

Questi ceppi indagati per la evidenziazione della mutazione in posizione 2514-2515 bp del 23S rRNA, non mostravano alcuna mutazione, in figura 4 è riportato il confronto della sequenza ottenuta da un isolato, che si era dimostrato resistente alla claritromicina, con quella di riferimento presente in banca dati (Gene-Bank accession number U27270) (4,28).

Mentre per il metronidazolo la gran parte degli isolati che mostrava resistenza presentava valori di MIC ben al di sopra del limite di > 8 µg/ml, pari almeno a MIC ≥256 µg/ml (8). Nessuna resistenza è stata evidenziata per l'amoxicillina, anche questo in accordo con la letteratura internazionale (30). Le MIC erano infatti comprese in un range che oscillava fra 0,016-5 µg/ml, con la grande maggioranza degli stipiti che si mostrava estremamente sensibile (MIC < 0,016 µg/ml).

Figura 4



Situazione ottimale anche per la tetraciclina, per la quale solo il 4% degli stipiti presentava resistenza evidente pari a 64 µg/ml (30). In tabella 4 sono riportate le frequenze di farmaco sensibilità per ciascuna molecola testata.

Tabella 4. MIC degli stipiti isolati.

Antibiotici	Sensibile		Intermedio		Resistente	
	MIC	frequenza	MIC	frequenza	MIC	frequenza
Amoxicillina	0,016-0,23 µg/ml	87%	1-5 µg/ml	13%	-	-
Tetraciclina	0,016 µg/ml	87%	2-5 µg/ml	8%	64 µg/ml	5%
Claritromicina	0,016-0,47 µg/ml	79%	0,5-1 µg/ml	8%	2 µg/ml	13%
Metronidazolo	≤4 µg/ml	67%	4-8 µg/ml	4%	≥8 µg/ml	29%

Discussione

L'*H. pylori*, come è ormai chiaro, è un patogeno primario temibile per la serietà delle patologie di cui è causa diretta o indiretta e per la sua elevata prevalenza (6, 10, 20). Tuttavia, è altrettanto evidente come sia complesso ed articolato il suo algoritmo diagnostico. Questo sia per le difficoltà oggettive che si incontrano nella sua coltivazione, sia per il fatto che l'unico mezzo diagnostico a tutt'oggi ritenuto valido passa inevitabilmente per l'endoscopia (37, 20, 32). Unica alternativa valida sarebbe UBT, ma nella realtà dei fatti, almeno nel nostro paese, i pazienti accedono con difficoltà a questo strumento diagnostico. Ciò a causa della scarsità dei centri attrezzati convenzionati, che costringono i pazienti a lunghi tempi d'attesa o a rivolgersi a strutture in regime privatistico. L'UBT, inoltre, presenta la grande limitazione di non fornire nessuna indicazione relativa alla farmaco sensibilità degli isolati, indicazione questa essenziale per l'impostazione corretta della terapia eradicante (18). Anche il saggio per la ricerca degli antigeni fecali a fronte di indiscussi vantaggi è una metodica semplice, poco costosa e non invasiva, ha anch'esso la limitazione di non consentire l'isolamento del microrganismo e il conseguente studio della farmaco sensibilità. Può, tuttavia essere un efficace strumento nel controllo post-terapia a breve distanza (appena quattro settimane dopo la fine del protocollo farmacologico), consentendo di ridurre il numero di pazienti che si sottopongono ad endoscopia digestiva (34). I metodi sierologici, di seconda generazione, forniscono indicazioni utili, almeno nello screening iniziale (33). E' accertato, infatti, che tutti i pazienti che risultano infettati da *H. pylori* presentano elevati titoli di immunoglobuline di classe G. Da sola, tuttavia, la sierologia non può avere valore diagnostico (11, 33). E', altresì, dimostrato che anche nei pazienti eradicati (sia per clearance spontanea del microrganismo che per effetto di una terapia farmacologica) il titolo anticorpale rimane elevato per almeno 6 mesi fino ad un massimo di due anni (7). Nondimeno, la letteratura internazionale (e la nostra stessa esperienza di laboratorio) ha dimostrato che un titolo anticorpale elevato, intendendo per elevato un valore di gran lunga superiore al cut-off di positività del metodo (in media dalle 20 alle 30 volte superiore) è comunque indice di una infezione attiva. Non appena, infatti, il paziente eradica il microrganismo, il titolo subisce un brusco crollo tornando a valori prossimi o di poco superiori rispetto al limite che definisce la soglia di positività (11, 17). E questa può di per sé rappresentare per il clinico un'indicazione utile, facilmente e rapidamente ottenibile.

Il vero valore della sierologia deve essere visto in un

contesto epidemiologico, per esempio nello screening di vasti campioni di popolazione, ovvero come test di affiancamento ai saggi di riferimento (11,12,17,19). I saggi di riferimento, dal canto loro, offrono un'efficacia diagnostica inopinabile. Il loro valore è difficilmente sostituibile, ma può essere verosimilmente eguagliato. L'istologia, per esempio, è attendibile, ma la sua specificità dipende essenzialmente dall'esperienza dell'operatore. Richiede, inoltre, tempi lunghi per la processazione e la sua sensibilità è fortemente influenzata dal tipo di colorazione impiegata (32). Spesso, inoltre, per evitare di sottoporre il paziente ad un'estenuante prelievo di frammenti di mucosa gastrica, l'istologo dispone di una biopsia proveniente da una sede diversa rispetto a quelle sulle quali si esegue l'esame colturale. Questo può essere causa di discrepanze, difficilmente risolvibili, fra i risultati dei metodi di riferimento (24). Per esempio capita spesso che un paziente presenti un'istologico normale, abbia un referto endoscopico nella norma, ma si evidenzia la presenza di *H. pylori* con il metodo colturale. Il saggio dell'ureasi e il metodo colturale sono fortemente influenzati dal fatto che il paziente abbia assunto farmaci nei giorni che precedono l'esame endoscopico (20, 19). E' auspicabile, infatti, che la sospensione della terapia farmacologica mirata all'*H. pylori* riguardi almeno i tre mesi precedenti, e quella più generale (soprattutto se consistente nell'assunzione di antibiotici) riguardi almeno il mese precedente il prelievo (23). La coltura, rispetto a tutti gli altri sistemi diagnostici, è l'unica che consente il reale isolamento del patogeno. Quest'ultimo può pertanto essere sottoposto a tutte le indagini del caso: studio del pattern allelico di *vacA*, studio della PAI, nonché studio dell'antibiotico resistenza (6,15). Ha, per contro, tempi lunghi, l'*H. pylori* nella migliore ipotesi cresce in un periodo di tempo compreso fra i 3-5 giorni; senza considerare il fatto che se ci troviamo di fronte alla forma coccoide del microrganismo, la coltura sarà sicuramente fallimentare (12, 23, 39). In questo contesto si inserisce, allora, la diagnosi molecolare: PCR. Sono interessanti le esperienze riportate in letteratura, ed altrettanto incoraggianti sono stati i risultati ottenuti con la nostra metodica (2, 35).

Il primo aspetto positivo della nostra metodica è che ci consente sullo stesso frammento (scongiurando così la variabilità fra prelievi) di eseguire in successione saggio dell'ureasi, allestimento della coltura ed amplificazione (previa lisi del frammento medesimo). La validità del campione, e quindi la sua processabilità ai fini della diagnosi molecolare, è assicurata dal fatto che si tratta di un frammento di mucosa gastrica esangue, priva almeno in linea di principio di inibitori della Taq polimerasi. L'unico inibitore possibile rimane l'urea contenuta nel medium in

cui si immerge il frammento per l'esecuzione del test dell'ureasi. Tuttavia, il frammento biotico dopo la lettura del test dell'ureasi, viene accuratamente lavato in tampone fosfato e questo consente di allontanare gli eventuali residui di urea. Residui, che nel caso della positività del saggio sono pressoché assenti, dato che l'ureasi ha provveduto a scindere l'urea medesima in ammoniaca ed anidride carbonica. A sostegno dell'efficacia del metodo è la concordanza del 100% ottenuta sui campioni positivi e la capacità di evidenziare ben 11 pazienti, tra gli *H. pylori*-negativi, da identificare come probabili falsi-negativi. Su quest'ultimi, in particolare, si sofferma la nostra attenzione dato che la PCR non viene a sovvertire una diagnosi certa, ma in realtà diventa un supporto a sostegno di altri mezzi diagnostici validati e standardizzati che avevano già fatto supporre la possibilità che questi pazienti potessero essere effetti da patologie *H. pylori* associate. Ci riferiamo alla sierologia (positiva per la gran parte di essi con elevato titolo immunoglobuline di classe G, e positiva come anticorpi specifici anti-Cag A, per due di essi), al test dell'uresi, singolarmente considerato, o al saggio EIA per la ricerca degli antigeni fecali. Gli stessi rilievi endoscopici per la gran parte di questi pazienti (7/11) depongono a favore di un'infezione *H. pylori*-associata. Per quattro pazienti è stata necessaria una seconda amplificazione, in quanto il prodotto della prima reazione era stato molto modesto. Ma questo aspetto più che farci pensare ad una reazione falsamente positiva ci porta a ipotizzare, anche alla luce di indicazioni che ci vengono dalla letteratura internazionale, che si possa trattare di una infezione iniziale, ovvero di una infezione efficacemente contrastata dall'ospite (dato che per tutti e quattro si rilevavano elevati titoli anticorpali) caratterizzata da una scarsa colonizzazione della mucosa ad opera del microorganismo e quindi dalla scarsità di DNA stampo presente nel campione (9).

Apprezzabile è anche la rapidità con cui è possibile giungere a diagnosi con la nostra metodica. Dall'arrivo del campione in laboratorio, infatti, trascorsa una sola ora per la lettura del test dell'ureasi (nel caso di un campione positivo l'incubazione si protrae per 24h) il campione viene prontamente lisato e sottoposto in giornata a reazione di amplificazione. Il che significa che ragionevolmente nell'ambito di una giornata lavorativa, al massimo entro le 24 ore successive, siamo in grado di fornire indicazioni utili per il paziente e per il clinico circa la presenza/assenza di *H. pylori*. Considerando, inoltre, il tempo necessario per l'ottenimento dell'antibiogramma tradizionale, circa 6 giorni, contro quello necessario per l'allestimento della reazione di sequenza con relativa lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi ottenuti (circa 48 ore totali), pos-

siamo affermare che in sole 72 h si dispone delle informazioni utili sulla farmaco sensibilità.

Conclusioni

In conclusione non affermiamo nulla di contrastante con la letteratura ufficiale nel dire che a tutt'oggi non esiste un metodo infallibile per la diagnosi di *H. pylori* (9, 19, 20, 26, 32, 37). Anche i metodi di riferimento presentano le proprie limitazioni più o meno apprezzabili e la PCR sembra trovare un giusto ruolo, nel contesto del quadro diagnostico, come tecnica di sostegno e non è azzardato pensare che nel futuro possa giungere a soppiantare gli attuali metodi di riferimento.

La nostra metodica, inoltre, consentendo l'amplificazione di una porzione genomica in cui risiede uno dei meccanismi di resistenza alla claritromicina, ci offre la possibilità, qualora il metodo colturale fallisse, di prevedere anche la farmaco resistenza del microorganismo. Il fatto che i nostri isolati non presentassero la mutazione genomica che descrive in letteratura la resistenza alla claritromicina fa supporre la presenza di altre mutazioni della sequenza del 23S rRNA che giustificerebbero l'esistenza di stipti di *H. pylori* che esprimono una modesta resistenza alla claritromicina e su i quali stiamo attualmente approfondendo gli studi. Si può pertanto auspicare come sviluppo futuro quello di allestire altre metodiche di amplificazione che oltre ad essere specie-specifiche, combinate assieme consentano uno studio a livello genico della farmaco sensibilità.

Ringraziamenti

Questo lavoro ha beneficiato del finanziamento Programmi di Ricerca Scientifica di Interesse Nazionale cofinanziamenti del MURST - esercizio finanziario 1999 dal titolo: Dispepsia ed *Helicobacter pylori*: identificazione di pazienti ad alto rischio per lo sviluppo di ulcera peptica.

Bibliografia

1. Ansorg R, Von Recklinghausen G, Heintschel von Heinegg. E Susceptibility of *Helicobacter pylori* to simethicone and other non-antibiotic drugs. J Antimicrob Chemother 37, 45-52, 1996.
2. Atherton JC, Cover TL, Twells RJ, Morales MR, Hawkey CJ, Blaser MJ. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 37, 2979-2982, 1999.

3. Beinassa, M, Babin P, Quellard N, Pezennec L, Cenia-tiempo Y, Fauchère JL. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun* 64, 2331-2335, 1996.
4. Bina JE, Alm RA, Nickelsen MU, Thomas SR, Trust TJ, Hancock REW. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob Ag Chemother* 44, 248-254, 2000.
5. Burman WJ, Cohn DL, Reves RR, Wilson ML. Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis* 20, 564-570, 1995.
6. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M Pappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 93, 14648-14653, 1996.
7. Cutler AF, Vajravel M. Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* serology after successful eradication. *Am J Gastroenterol* 91, 85-88, 1996.
8. Dore MP, Piana A, Carta M, Atzei A, Are BM, Mura I, Massarelli G, Maida A, Sepulveda AR, Graham DY, Realdi G. Amoxicillin resistance is one reason for failure of amoxicillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 12, 635-9, 1998.
9. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10, 720-741, 1997.
10. Figura N, Valasina M. *Helicobacter pylori* determinants of pathogenicity. *J Chemother* 11, 591-600, 1999.
11. Fontana C, Pietroiusti A, Mastino A, Pistoia ES, Marino D, Magrini A, Galante A, Favalli C. Comparison of an enzyme immunoassay versus a rapid latex test for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 239-240, 2000.
12. Galante A, Pietroiusti A, Carta S, Franceschelli P, Mastino A, Fontana C, Grelli S, Bergamaschi A, Magrini A, Favalli C. Infection with *Helicobacter pylori* and leukocyte response in patients with myocardial infarction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 298-300, 2000.
13. Genta RM, Huberman RM, Graham DY. The gastric cardia in *Helicobacter pylori* infection. *Hum Pathol* 25, 915-919, 1994.
14. Glupczynski Y, Burette A. Drug therapy for *Helicobacter pylori* infection: problem and pitfalls. *Am J Gastroenterol* 85, 1545-1551, 1990.
15. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JAD, Rathbone BJ, West KP. The significance of *cagA* and *Vac A* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J Clin Pathol* 51, 761-764, 1998.
16. Kawaguchi H, Haruma K, Komoto K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. *Helicobacter pylori* infections is the major risk factor for atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 91, 959-962, 1996.
17. Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1, 892-895, 1992.
18. Logan RPH, Dills S. The European 13C-urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 3, 915-921, 1991.
19. Luthra GK, Di Nuzzo AR, Gourley WK, Crowese SE. Comparison of biopsy and serological methods of diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the potential role of antibiotics. *Am J Gastroenterol* 93, 1291-1296, 1998.
20. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 89, S116-S128, 1994.
21. McCallion WA, Murray LJ, Bailie AG, Dalzell AM, O'Reilly DPJ, Bamford KB. *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living condition. *Gut* 39, 18-21, 1996.
22. Mendall M, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Northfield TC. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* 339, 896-897, 1992.
23. Mirza SH, Hannan A, Rizvi F. *Helicobacter pylori*: isolation from gastric biopsy specimens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87, 483-486, 1993.
24. Misawa K, Kumagai T, Shimizu T, Furihata K, Ota H, Akamatsu T, Katsuyama T. A new histological procedure for re-evaluation of the serological test for *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 17, 14-19, 1998.
25. Monteiro et al. Evaluation of performances of three DNA enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 35, 2931-2936, 1997.
26. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Campylobacter* and *Helicobacter* In Murray et al. *Medical Microbiology* 3rd eds. Mosby, Toronto, 251-257, 1998.
27. NIH Consensus Development Panel. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 272, 65-69, 1994.
28. Olson C, Edwards A. Primary susceptibility of *H. pylori* to clarithromycin compared to metronidazole in patients with duodenal ulcers associated with *H. pylori*. *Gastroenterology* 90, 1589, 1995.
29. Orlicek SL, Welch DF, Kuhls TL. Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *J Clin Microbiol* 31, 569-571, 1993.
30. Piccolomini A, 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* 35, 1842-1846, 1997.
31. Ponte P, Engel NSY, Gunning P, Kedes L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs. DNA sequence of a human β -actin cDNA. *Nucl Ac Res* 13, 1687-1696, 1984.
32. Price AB. The histological recognition of *Helicobac-*

- ter pylori*. In: Lee A, Mégraud F, eds. *Helicobacter pylori*. Technique for clinical diagnosis and basic research. Saunders: London, 33-49, 1995.
33. Trautmann M, Moldrzyk M, Vogt K, Held T, Marre R. Use of a receiver operating characteristic in the evaluation of two commercial enzymes for detection of *Helicobacter pylori* infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease* 13, 812-819, 1994.
 34. Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon ATR, Deltenre M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GNJ. *H.pylori* European Study Group. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. *Lancet* 354, 30-33, 1999.
 35. Van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AMD, Schirm J, Snijder JAM. Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy samples. *J Clin Microbiol* 31, 1918-1920, 1993.
 36. Vaucher C, Janvier B, Nousbaum JB, Grignon B, Pellenec L, Robaszkiewicz M, Gouerou H, Picard B, Fauchere JL. Antibody response of patients with *Helicobacter pylori*-related gastric adenocarcinoma: significance of anti-cagA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 463-467, 2000.
 37. Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM press: Washington, D.C., 727-738, 1999.
 38. Vincent P, Gottrand P, Pernes MO, Husson M, Lecomte-Houcke D, Turk H, Leclerc H. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. *Gut* 35, 313-316, 1994.
 39. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i: 1273-1275, 1983.
 40. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338, 1175-1176, 1991.