

SHORT COMMUNICATIONS/NOTE

Valutazione di un metodo rapido per la diagnosi d'infezione da *H. pylori* attraverso ricerca di antigene fecale

Paolo Gaibani¹; Antonella Pace¹; H. Cesari²; Vittorio Sambri¹.

¹Sezione di Microbiologia, DMCSS, Università degli Studi di Bologna, Bologna;

²Dyaset, Portomaggiore (FE).

Key words: *H.pylori*; stool antigen test (Ricerca di antigeni fecali di *Helicobacter pylori*).

Evaluation of a new rapid test for detection of *Helicobacter pylori* antigens in stool samples.

SUMMARY

Aim: This study was aimed at the evaluation of a newly developed immunochromatography (side migration: SM) test for the detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool specimens. As a comparative method, a classic immunoenzymatic method (EIA), based on the use of rabbit polyclonal antibodies to *H.pylori* was used.

Methods: The first step of the study was the determination of the analytic sensitivity of the new test by using a calibrated serial suspension of *H.pylori* (strain CCUG 17874) (from 1.1 mg/ml to 0.001 mg/ml). The study population was composed by 30 patients suffering from dyspepsia and found positive by the EIA test. The same stool specimens used for the EIA evaluation were examined also by new "SM" test.

Results: The overall analytical sensitivity of the SM test was 0.007 mg/ml. 27 out of the 30 EIA positive studied patients were identified and confirmed as positive by the SM method. The agreement between the methods used in this study was 90%. The 3 samples detected as negative by the SM test were again tested with another EIA method (DAKO) and finally scored as positive.

Conclusion: The new SM rapid DYASET test could be used as a routine diagnostic tool in the microbiology laboratory for the detection of *H.pylori* antigen in stools.

INTRODUZIONE

Helicobacter pylori è un bacillo Gram negativo, ricurvo a spirale, di lunghezza variabile tra i 2,5 ed i 5 µm e con un diametro di circa 0,5 µm. Si tratta un batterio aerobio-anaerobio facoltativo, tendenzialmente microaerofilo, che ha fra i più salienti caratteri fenotipici quello di una peculiare ed intensa attività ureasica, che si deve alla presenza di una proteina dotata di questa capacità enzimatica legata al soma batterico. Nell'uomo l'infezione da *H.pylori* è ritenuta essere la principale causa eziologica di gastrite cronica antrale di tipo B, dovuta ad una colonizzazione batterica cronica della mucosa gastrica e duodenale (2; 10, 12). In una notevole percentuale di soggetti è stato osservato come l'infezione della mucosa gastrica o duodenale possa essere seguita dall'insorgenza di ulcera gastrica e di ulcera duodenale (globalmente definite ulcera peptica): si ha così l'insorgenza della malattia dispeptica.

È stato inoltre dimostrato come la presenza di gastrite cronica e di ulcera peptica, da *H.pylori*, possa aumentare il rischio di insorgenza di carcinoma gastrico o di linfoma nei tessuti linfoidi legati alla mucosa gastrica.

La eradicazione di *H.pylori* è alla base del tratta-

mento medico della patologia dispeptica. Di regola le somministrazioni terapeutiche necessarie all'eradicazione dell'infezione (con scomparsa nel 100% dei casi delle ulcere duodenali e di oltre l'80% delle ulcere gastriche) constano di una tripla terapia, consistente di due antibiotici ed inibitori della pompa protonica.

H.pylori sembra in grado di acquisire una antibiotico-resistenza ai macrolidi ed ai nitroimidazoli.

La presenza di *H.pylori* può essere dimostrata mediante numerosi metodi d'indagine: esame microscopico di campioni biotici di mucosa gastrica (metodica altamente invasiva) (5); breath test (tramite somministrazione di pasto proteico contenente C¹³ o C¹⁴ (I) e determinazione del contenuto isotopico nell'aria espirata dal paziente: questo metodo si basa sulla presenza dell'ureasi in *H.pylori*, enzima che scinde l'urea, di derivazione proteica, in CO₂ (marcata) e acqua).

Un ruolo di notevole importanza è stato assunto di recente, nell'ambito della diagnosi di laboratorio dell'infezione da *H.pylori*, dalla ricerca del batterio nel materiale fecale del paziente. Questa indagine si può svolgere con metodi molecolari (PCR – polymerase chain reaction: si tratta di una tecnica complessa e costosa, conseguentemente riservata

ad un ambito di ricerca) (8, 10) oppure, mediante tecniche immunoenzimatiche o immunocromatografiche che sono in grado di identificare il batterio e/o sue componenti antigeniche separate nel materiale fecale. Queste ultime sono le tecniche maggiormente utilizzate ed hanno ampia diffusione diagnostica.

MATERIALI E METODI

Oggetto della presente valutazione è stato un metodo immunocromatografico rapido per la ricerca dell'antigene fecale di *H.pylori* (DYASET). Si tratta una tecnica che impiega un dispositivo pre-confezionato e sensibilizzato con anticorpi anti-*H.pylori* altamente specifici, sia come fase di cattura dell'antigene, sia come sistema di rivelazione (coniugazione con oro colloidale).

E' stata valutata la sensibilità analitica di questo test mediante impiego di diluizioni scalari (da 1.1 mg/ml fino a 0.001 mg/ml) di una sospensione calibrata di *H.pylori* (ceppo CCUG 17874) in soluzione fisiologica.

Sono inoltre stati studiati 30 campioni di feci ottenute da pazienti con diagnosi clinica di malattia dispeptica da *H.pylori* e risultati positivi al metodo immunoenzimatico (EIA) *Helicobacter pylori* antigene (ASTRA Diagnostici) e 30 campioni di feci negativi allo stesso test immunoenzimatico.

L'età dei pazienti studiati variava da 10 mesi a 74 anni e la suddivisione per sesso era del 48.4% per il sesso femminile a del 51.6% per quello maschile.

Tutti i campioni fecali studiati col metodo immunocromatografico sono stati preparati sospendendo un volume pari ad almeno quattro grani di riso nella provetta contenente 1 ml di

diluyente del campione fornita col kit.

I campioni in analisi sono stati posti in agitazione per 1 minuto su vortex e successivamente centrifugati a 3.000 X g per 5 minuti. Questa procedura consente di ottenere la completa dissoluzione della massa fecale e la conseguente successiva liberazione in sospensione dei batteri e/o dei vari componenti antigenici permettendone il dosaggio analitico.

Sono stati dispensati all interno dell apposito incavo di ciascun dispositivo 150 µl della sospensione del campione fecale così ottenuta ed i dispositivi sono stati incubati per un periodo non inferiore a 10 e non superiore a 15 minuti, a temperatura ambiente. Al termine di questo periodo di incubazione, la comparsa di una banda rossa nella parte superiore del dispositivo indica la adeguata migrazione del campione e la conseguente accettabilità del test. La lettura finale del risultato è avvenuta entro 30 minuti dalla dispensazione del campione: la comparsa di un duplice bandeggio (figura 1) indica la positività del test, mentre la presenza di un'unica banda (superiore - di controllo del test) indica la negatività del test stesso.

RISULTATI

La valutazione della sensibilità analitica del test immunocromatografico ha dimostrato che questo metodo è in grado di identificare la presenza di antigene batterico fino ad una diluizione di 0.007 mg/ml (figura 1).

Tenuto conto del volume totale di sospensione applicata al dispositivo, la quantità minima di antigene identificabile in soluzione fisiologica è pari a 1.05 µg.



Figura 1. Determinazione della sensibilità analitica del metodo cromatografico mediante sospensione calibrata a scalare (da sinistra a destra) da 1.1 mg/ml a 0.001 mg/ml di *H.pylori* (ceppo CGUG 17874, cresciuto in terreno liquido). In posizione n.5 e 6 da sinistra) sono inseriti dispositivi caricati con sospensione batterica a maggiore concentrazione (4.5 mg/ml e 2.2 mg/ml, rispettivamente).

Tabella I. Riassunto dei risultati ottenuti su campioni fecali saggiati coi il metodo immunocromatografico (DYASET) ed immunoenzimatico (ASTRA)

	Campioni Positivi al test immunocromatografico	Campioni Negativi al test immunocromatografico
Campioni Positivi al test immunoenzimatico	27	3
Campioni Negativi al test immunoenzimatico	0	30

I risultati della valutazione comparativa sono riportati nella tabella 1. La concordanza fra il metodo EIA ed il test immunocromatografico studiati è stata del 90% (27 campioni positivi identificati dal test immunocromatografico contro 30 positivi quando testati col metodo EIA). I campioni negativi al test immunoenzimatico sono tutti risultati negativi quando saggiati col metodo immunocromatografico.

I campioni EIA positivi che sono risultati negativi al test per la ricerca dell'antigene fecale di *H.pylori* (DYASET), sono stati saggiati nuovamente con un secondo test immunoenzimatico (DAKO) ed è stata confermata la positività.

CONCLUSIONI

Numerose sono le tecniche per la diagnosi di infezione da *H.pylori*, tra cui troviamo metodi invasivi (esami istologici) e non invasivi (breath test, test immunoenzimatici).

In questo studio è stato proposto un metodo immunocromatografico con lo scopo di evidenziare l'antigene di *Helicobacter pylori* direttamente nelle feci.

Questo test ha dimostrato possedere una sensibilità analitica di circa 1.0 ug di antigene per campione consentendone l'uso all'interno dei normali esami di routine nell'ambito della diagnosi di infezione da *H.pylori*.

Lo studio ha inoltre dimostrato che la concordanza di questo test immunocromatografico con un metodo immunoenzimatico (ampiamente diffuso nei laboratori) è del 90% per i campioni positivi al test EIA e che questo valore di concordanza sale al 100% nel caso dei campioni EIA negativi. Questi risultati indicano che il test immunocromatografico oggetto del presente studio può essere considerato un valido strumento per la diagnosi di infezione da *H.pylori*.

La sensibilità e la specificità, il basso costo, i tempi ristretti per l'esecuzione e la facilità della tecnica, ci permettono di proporre tale metodo come test di prima istanza nella diagnosi di infezione da *Helicobacter pylori*.

Inoltre se ne consiglia l'impiego anche come test "office", eseguibile dai singoli medici al momento della valutazione clinica del paziente dispeptico.

BIBLIOGRAFIA

1. Dominguez-Muñoz JE, Leodolter A, Sauerbruch T, and Malfertheiner P. A citric acid solution is an optimal test drink in the ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 459-62.
2. Fendrick AM, Chernew ME, Hirth RA, Bloom BS. Alternative management strategies for patients with suspected peptic ulcer disease. *Ann Intern Med* 1995;

- 123: 260-268
3. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 1998; 114: 1169-1179.
4. Lee JM, Deasy E, O'Morain CA. *Helicobacter pylori* eradication therapy: a discrepancy between current guidelines and clinical practice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 433-437.
5. Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 755-758
6. Karnes WE Jr, Samloff IM, Siurala M, et al. Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology* 1991; 101: 167-174
7. Kato S, Furuyama N, Ozawa K, Ohnuma K, Iinuma K. Longterm follow-up study of serum immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies after *Helicobacter pylori* eradication. *Pediatrics* 1999; 104: e22
8. MacKay WG, Williams CL, McMillan M, Ndip RN, Shepherd AJ, Weaver LT. Evaluation of Protocol Using Gene Capture and PCR for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Feces. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4589-93.
9. Makristathis A, Pasching E, Schütze K, Wimmer M, Rotter ML, and Hirschl AM. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998. 36: 2772-4.
10. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
11. Mc Namara DA, Buckley M, O'Morain CA. Nonulcer dyspepsia. Current concepts and management. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 807-818
12. Moayyedi P, Soo S, Deeks J, et al. Systematic review and economic evaluation of *Helicobacter pylori* eradication treatment for non-ulcerdyspepsia. *Dyspepsia Review Group. BMJ* 2000; 321: 659-664
13. Ofman JJ, Etchason J, Fullerton S, Kahn KL, Soll AH. Management strategies for *Helicobacter pylori*-seropositive patients with dyspepsia: clinical and economic consequences. *Ann Intern Med* 1997; 126: 280-291
14. Olbe L, Fandriks L, Hamlet A, Svennerholm AM, Thoreson AC. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori* induced duodenal ulcer disease: an overview. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 619-623
15. O'Morain C, Gilvarry J. Eradication of *Helicobacter pylori* inpatients with non-ulcer dyspepsia. *Scand J Gastroenterol* 1993; 196 Suppl: 30-33

Gaibani Paolo

Sezione di Microbiologia,
DMCSS, Università degli Studi di Bologna,
Policlinico
Via Massarenti, 9 - 40138 S. Orsola - Bologna
Tel.: 051 6364516 - Fax: 051 6364516
E-mail: paologuibani@libero.it