

La ricerca dell'antigene fecale dell'*Helicobacter Pylori* come test non invasivo in confronto al 13C-urea Breath-Test. Esperienza personale

A. DI FULVIO, N. IERFONE, M. STANDOLI, M. TRANCASSINI*, A. GIORDANO*,
A. MAGNI* e P. PONTONE

RIASSUNTO: La ricerca dell'antigene fecale dell'*Helicobacter Pylori* come test non invasivo in confronto al 13C-urea Breath-Test. Esperienza personale.

A. DI FULVIO, N. IERFONE, M. STANDOLI, M. TRANCASSINI,
A. GIORDANO, A. MAGNI e P. PONTONE

Scopo dello studio è stato quello di confrontare l'utilizzo di due test non invasivi per la ricerca dell'infezione da Helicobacter Pylori: il 13C-urea Breath-Test, considerato il "gold standard", e l'HpSa che ricerca l'antigene dell'Helicobacter Pylori nelle feci.

Gli Autori hanno studiato 30 pazienti che presentavano sintomatologia dispeptica e mai sottoposti a terapia antibiotica eradicante l'Helicobacter Pylori, concludendo che a tutt'oggi il 13C-urea Breath-Test è il metodo con maggiore sensibilità e specificità per lo screening pre-endoscopico dei pazienti dispeptici, che comunque l'HpSA è una metodica da migliorare.

SUMMARY: The research of *Helicobacter Pylori* faecal antigen as non-invasive test versus the 13C-urea Breath-test. Personal experience.

A. DI FULVIO, N. IERFONE, M. STANDOLI, M. TRANCASSINI,
A. GIORDANO, A. MAGNI e P. PONTONE

The target of this study is the evaluation of two different non-invasive tests: 13C-urea Breath-Test, as gold standard, versus the HpSA test, as new method to research the faecal antigen of Helicobacter Pylori (HP).

Thirty patients, affected by dyspeptic symptomatology and never treated before by antibiotic therapy to eradicate the HP, was subjected, by Authors, to this evaluation. This study say that the 13C-urea Breath-test represent the gold standard in the pre-endoscopic research of HP presence concerning specificity and sensibility. However, the HpSA test need more improvement.

KEY WORDS: 13C-urea Breath-Test - HpSA - *Helicobacter pylori*.
13C-urea Breath-Test - HpSA - *Helicobacter pylori*.

Premessa

Nel corso degli ultimi anni la ricerca ha rivolto grande attenzione alla sperimentazione di nuovi test diagnostici per accertare l'infezione da *Helicobacter Pylori* (HP), essendo ormai riconosciuto il ruolo causale predominante che questo batterio ha nelle più importanti patologie gastroduodenali ed anche in alcune malattie extradigestive.

Gli studi sono stati rivolti soprattutto alla ricerca di nuove tecniche non invasive, meglio tollerate dai pazienti e che avessero contemporaneamente un'accuratezza diagnostica nonché una sensibilità e specificità elevate.

Mentre i risultati di un test non invasivo possono non escludere la necessità di un esame endoscopico, al contrario alcune endoscopie potrebbero essere evitate se fosse disponibile un diverso metodo diagnostico, sufficientemente accurato, ottenendo come risultato una minore richiesta di procedure endoscopiche non necessarie e, quindi, una diminuzione sensibile della spesa sanitaria.

Senza dubbio tra questi test il Breath-Test rappresenta fino ad oggi il test non invasivo di riferimento, dotato di un'elevatissima sensibilità e specificità, come riportato da numerosi Autori, quando usato sia prima che dopo la terapia eradicante per l'infezione da *Helicobacter Pylori* (1-3).

Recentemente tuttavia si è resa disponibile una nuova metodica, non invasiva, rappresentata dal dosaggio dell'antigene dell'*Helicobacter Pylori* presente in campioni fecali, il cosiddetto HpSA. Questa offre il vantaggio di essere un test che utilizza un semplice campione fecale e non richiede una strumentazione costosa per la sua esecuzione, né la necessità di

Università degli Studi "La Sapienza" - Roma
Dipartimento di Scienze Chirurgiche
Unità Operativa Complessa di Chirurgia Endoscopica
(Direttore: Prof. P. Pontone)
Insegnamento di Chirurgia Generale
(Titolare: Prof. P. Pontone)
*Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica
(Direttore: Prof. G. Tarsitani)

© Copyright 2003, CIC Edizioni Internazionali, Roma

personale medico o paramedico che assista il paziente.

Questa tecnica diagnostica non invasiva, oltre a rendere più semplice la ricerca epidemiologica, trova la sua indicazione in due situazioni rappresentate dallo screening pre-endoscopico di soggetti dispeptici e dal monitoraggio dell'efficacia del trattamento dopo terapia eradicante.

Noi riportiamo la nostra esperienza, nella quale compariamo il grado di sensibilità e specificità del dosaggio dell'antigene fecale dell'HP (HpSA) con il 13C-urea Breath-Test (13C-UBT) come screening pre-endoscopico per pazienti affetti da sintomatologia dispeptica, rimandando ad un altro momento lo studio sull'efficacia dell'HpSA come test per testare i risultati della terapia eradicante.

Esperienza personale

Lo studio è stato condotto nell'Unità Operativa Complessa di Chirurgia Endoscopica (Dirigente di II livello: Prof. P. Pontone) del Dipartimento di Scienze Chirurgiche della I Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università "La Sapienza" di Roma, in collaborazione con il Dipartimento di Sanità Pubblica, su un campione di 30 pazienti che presentavano sintomatologia dispeptica.

I pazienti coinvolti non erano mai stati sottoposti nei precedenti quattro mesi a terapia antibiotica eradicante per *Helicobacter Pylori* od a trattamento con inibitori di pompa protonica (PPI), con H2 - antagonisti o con farmaci contenenti bismuto.

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia gastrica.

I soggetti sono stati controllati con il test del respiro per la ricerca dell'*Helicobacter Pylori*, 13C-UBT, ed a tutti è stato chiesto di fornire contestualmente un campione di feci da sottoporre al test per la ricerca dell'antigene fecale.

In particolar modo noi abbiamo utilizzato il test immunoenzimatico (EIA) Premier Platinum HpSA (Meridian Diagnostics Europa s.r.l.), che identifica l'antigene di *Helicobacter Pylori* in accordo con le istruzioni del produttore.

Il test si basa sull'utilizzo di anticorpi di cattura policlonali adsorbiti su micropozzetti modulari. Il campione fecale può essere conservato a 2-8° C fino a tre giorni o a -20° C per un tempo indefinito, fino all'esecuzione del test.

Al momento del saggio una piccola quantità di campione fecale viene diluita con una appropriata soluzione tampone pH 7,2. Il campione fecale diluito, i controlli (positivo e negativo) ed un anticorpo policlonale coniugato con perossidasi sono, quindi, aggiunti al micropozzetto e vengono incubati per un'ora a temperatura ambiente (22-27° C). Al termine dell'incubazione i pozzetti vengono lavati con una soluzione di lavaggio (soluzione Tampone Fosfato 18mM pH 6,8, contenente 0,02% di Thimerosal come conservante) per rimuovere il materiale non legato. Si aggiunge il substrato cromogeno e si incuba per altri 10 minuti a temperatura ambiente.

In presenza di antigene di *Helicobacter Pylori* legato, dopo aggiunta della soluzione di arresto si ha lo sviluppo di colore giallo.

I risultati sono letti entro 15 minuti allo spettrofotometro ad una assorbanza di 450/630 nm. Ogni intensità di colore uguale o superiore al controllo positivo deve essere considerata come risultato positivo, mentre la lettura allo spettrofotometro quantizza la positività.

I valori di cut-off utilizzati sono stati i seguenti:

- OD uguale a 0,100 risultato negativo;

- OD compresa tra 0,100-0,120 risultato dubbio o zona grigia;
- OD maggiore o uguale 0,120 risultato positivo.

Gli eventuali risultati dubbi devono essere ripetuti sullo stesso campione di feci a disposizione per un controllo migliore. Se il risultato ripetuto presenta ancora valori di OD compresi tra 0,100 e 0,120, risultando quindi dubbio, sarà opportuno ripetere il test su un nuovo campione di feci.

Risultati

Nei 30 casi esaminati abbiamo ottenuto con l'utilizzo del 13C-UBT un risultato positivo in 19 pazienti e negativo in 11.

Lo stesso risultato non si è ottenuto dall'HpSA, che ha evidenziato la presenza del batterio in 15 pazienti mentre i restanti 15 sono risultati negativi.

Complessivamente si è ottenuta una concordanza nei risultati tra 13C-UBT ed HpSA in 24 casi (80%), considerando anche quelli risultati negativi alla ricerca del batterio.

In particolare, in 5 (16,6%) pazienti, mentre l'13-UBT è risultato positivo, la ricerca dell'antigene fecale ha dato risultato negativo.

In un caso (3,3%) si è ottenuto il risultato contrario: il paziente negativo al Breath-Test è risultato positivo all'HpSA. Quest'ultimo risultato può essere spiegato ammettendo, come sostengono alcuni Autori (4-5), l'eliminazione con le feci da parte dell'organismo di parti di *Helicobacter Pylori* morti (forma coccoide) che non sono responsabili di infezione, ma che sono antigenicamente attive e, quindi, possono dar luogo a risultati falsamente positivi.

Analizzando i risultati si evince che l'HpSA ha avuto un'accuratezza diagnostica, calcolata sul totale dei pazienti studiati, di 24 casi su 30, corrispondente all'80%.

Discussione

Esiste una certa differenza tra le due metodiche testate. L'affidabilità diagnostica dell'HpSA è inferiore a quella del 13C-UBT che è, come riportato in letteratura, del 97-99% (1, 2, 6). Tale risultato tuttavia deve essere considerato in relazione a diversi fattori, innanzitutto la presenza di una zona dubbia o zona grigia nei risultati forniti dall'HpSA. Il cut-off per il 13C-UBT è infatti ben definito e non prevede la presenza di risultati dubbi, permettendo di porre diagnosi con grande certezza. Il test fecale prevede, al contrario, una zona di dubbio diagnostico che determina un discreto abbassamento sia della sensibilità che della specificità.

Esiste poi la possibilità di reazioni crociate con antigeni di batteri diversi dall'*Helicobacter Pylori*. Uno studio effettuato da Taylor e da altri Autori (7-9) ha evidenziato una possibile reattività crociata con specie

di *Helicobacter* diversi rispetto all'HP quali ad esempio *H. Canis*, *H. Felis*, *H. Pullorum*, *H. Bilis*, *H. Haepaticus* ed altri.

Ancora a proposito di anticorpi policlonali, un recentissimo lavoro di Malfertheiner (11) ha messo in evidenza che l'utilizzo nel test fecale di anticorpi monoclonali riduce la presenza della zona grigia rispetto ai policlonali ed ha, quindi, una maggiore accuratezza. Concordano con tale ipotesi anche altri ricercatori (7, 10). In futuro, perciò, ci si dovrà attendere un miglioramento sia della sensibilità sia della specificità di questo esame.

Per ultimo, ma non per questo meno importante, l'assunzione anche se non continuativa da parte dei pazienti testati di antibiotici, anche diversi da quelli utilizzati per l'eradicazione dell'*Helicobacter Pylori*, o di PPI o di farmaci contenenti bismuto, i quali determinando una diminuzione della carica batterica con conseguente diminuzione della presenza di antigeni dell'HP nelle feci, possono interferire con il test e quindi dare risultati falsamente negativi.

Diversi studi (12-14) riportano un alto numero di risultati falsamente negativi qualora il test HpSA venga eseguito prima di due settimane dalla cessata assunzione dei farmaci sopra menzionati.

È evidente quindi che il 13C-UBT rimane, per ora, l'esame non invasivo di prima scelta per valutare la presenza di infezione sostenuta da *Helicobacter Pylori* e l'HpSA andrebbe riservato ai casi in cui il

primo non fosse disponibile o qualora il paziente non volesse effettuarlo.

È, inoltre, da ricordare che il 13C-UBT non può, comunque, essere utilizzato in donne in stato di gravidanza e nei bambini dato che la metodica comporta un seppur minimo rischio di radioattività.

Tuttavia è importante sottolineare alcuni vantaggi offerti dall'HpSA. Innanzitutto la sua facile esecuzione: il test viene effettuato su un campione fecale fornito dal paziente al personale medico e, quindi, non comporta la perdita di una giornata lavorativa del paziente, né l'assunzione di alcun tipo di sostanza. Il test del respiro per la ricerca dell'HP prevede, invece, una partecipazione del paziente, il quale deve ingerire un pasto contenente urea marcata di sapore non molto gradevole, ed inoltre richiede tempi di esecuzione più lunghi.

C'è ancora da considerare il problema del costo-beneficio. Infatti, i costi del kit necessario per l'esecuzione del test fecale che sono ragionevolmente contenuti e sono sicuramente inferiori a quelli di un esame endoscopico, ma anche a quelli del kit necessario per effettuare il 13C-UBT. Infatti, mentre il costo dell'HpSA risulta essere di circa 30 Euro quello del 13C-UBT è di circa 50-60 Euro.

Queste considerazioni ci spingono a proseguire nel continuare nello studio dell'HpSA allo scopo di migliorare questo test non invasivo rendendolo sempre più accurato e specifico.

Bibliografia

1. Savarino V, Neri M, Vigneri S, Celle G: The 13C-urea Breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gut (suppl. 1) 1999; 118-22.
2. Labenz J, Borsch G, Peitz U, et al: Validity of a novel biopsy urease test (HUT) and a simplified 13C-urea Breath test for diagnosis of *H. Pylori* infection and estimation of the severity of gastritis. Digestion 1996; 57:391.
3. Epple HJ, Kirstein FW, Bojarski C et al: 13C-Urea Breath Test in *H. Pylori* diagnosis and eradication. Correlation to histology. Scand J Gastroent 1997; 32: 308-14.
4. Vakil N, Affi A, Sundaram M, Robinson J, Dunn B, Phadnis S: Prospective blinded evaluation of the accuracy of a stool test for the detection of the *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1999; 116: A 34.
5. Peterson JR, Adesoji B, Okorodudu A, Mohammed A, Sifuentes D, Soloway RD: Using the H.P. stool antigen (HpSA) in monitoring antibiotic treatment response of H.P. Gastroenterol 1999; 116: A 28.
6. Braden B, Teuber G, Dietrich CF, Caspary WF, Lembcke B: Comparison of new fecal antigen test with 13C-urea Breath test for detecting *Helicobacter Pylori* infection and monitoring eradication treatment: prospective clinical evaluation. BMJ 2000; 320:148-49.
7. Taylor NS, Esteve M, Fox JG: Cross reactivity with *Helicobacter Pylori* antigen capture assay. Gastroenterol 1999; 116: A 830.
8. Vakil N, Aff A, Robinson J, Sundaram M, Phadnis S: Prospective blinded trial of a fecal antigen test for the detection of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol 2000; 95 (7):1699-701.
9. Van't Hoff B, Vaira D, Vakil N, et al: Early diagnosis of failed *Helicobacter Pylori* eradication using a stool antigen test. Gastroenterol 2000;120:A266
10. Vakil N, Affi A, Sundaram M, Robinson J, Dunn B, Phadnis S: Prospective blinded evaluation of the accuracy of stool test for detection of the *Helicobacter pylori*. Gastroenterol 1999; 116: A 342.
11. Agha-Amiri K, Peitz U, Mainz D, Kahl S, Leodolter A, Malfertheiner P: A novel immunoassay based on monoclonal antibodies for the detection of *Helicobacter pylori* antigens in human stool. Z Gastroenterol 2001; 39 (8): 555-60.
12. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Manghetti M, Paci A, Maltinti G, Marchi S: Post-treatment diagnostic accuracy of a new enzyme immunoassay to detect *Helicobacter pylori* in stool. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 395-401.
13. Lehmann F, Drewe J, Terraciano L, Stuber R, Frei R, Beglinger C: Comparison of stool immunoassay with standard methods for detecting *Helicobacter pylori* infection. Br Med J 1999; 319: 1409.
14. Foene M, Dominguez J, Fernandez-Banares F, Lite J, Esteve M, Gali N, Espinos JC, Quintana S, Viver JM: Accuracy of a new enzyme immunoassay for detection *Helicobacter pylori* in stool specimens in the diagnosis of infection and posttreatment check-up. Am J Gastroenterol 2000; 95: 2200-2205.