

# RILIEVO DI *Helicobacter pylori* DA MUCOSA GASTRICA DI OVINI AL MACELLO: RISULTATI PRELIMINARI

## DETECTION OF *Helicobacter pylori* IN GASTRIC MUCOSA OF SHEEP: PRELIMINARY RESULTS

Quaglia N.C.<sup>1</sup>, Dambrosio A.<sup>1</sup>, Normanno G.<sup>1</sup>, Alberti F.<sup>1</sup>, Rella A.<sup>2</sup>, Tamborrino C.<sup>1</sup>, Celano G.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari;

<sup>2</sup> AUSL BA/3, Via S. D'Acquisto, 70020, Toritto (Bari) Italia

### SUMMARY

*Helicobacter pylori* is an organism widespread in humans and sometimes responsible for serious illnesses. It has been hypothesized the existence of animal reservoirs, and that the infection route by *H. pylori* involves multiple pathways including food-borne transmission as the microorganism has been detected from sheep, goat and cow milk. This work reports the preliminary results of a survey conducted in order to investigate the presence of *H. pylori* in gastric mucosa of sheep slaughtered in Apulia region (Italy) employing a Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR) assay for the detection of the phosphoglucomutase gene (*glmM*), as screening method followed by conventional bacteriological isolation. Out of the 50 gastric mucosa samples examined, 3 (6%) resulted positive for the presence of *glmM* gene, but at this time no strains were isolated. The results deserve further investigations to assess the role of ruminants as possible reservoirs of *H. pylori*.

### KEY WORDS

*Helicobacter pylori*; *glmM* gene; sheep; abomasum.

### INTRODUZIONE

*Helicobacter pylori* è la principale causa di ulcera gastrica e duodenale nell'uomo e ne è stato accertato il ruolo eziologico in alcune gravi neoplasie come il cancro gastrico e il MALToma (low grade B-cell mucosa associated lymphoid tissue lymphoma of the stomach) (8). Recenti stime riportano che circa due terzi della popolazione mondiale ne è portatore, con tassi di infezione più elevati nei paesi in via di sviluppo rispetto all'Europa e al nord America rappresentando, quindi, un grave problema di sanità pubblica (3). Sebbene le vie di trasmissione del microorganismo all'uomo non siano ancora certe, oggi la possibilità che gli alimenti siano fonte di infezione è una tra le teorie più considerate, soprattutto a seguito di recenti risultati scientifici che hanno messo in luce la presenza e la capacità di sopravvivenza del microorganismo in acqua e in alimenti di origine

animale (13; 10; 5; 6; 11; 7). *H. pylori* è stato, infatti, isolato in acqua potabile e marina (2; 9), in latte crudo ovino (5; 13), bovino (6; 13) e caprino (13) e sopravvive per lunghi periodi nel latte e in alimenti ready to eat (11; 10). In particolare, in un recente studio condotto sulla presenza di *H. pylori* in latte crudo caprino, ovino e bovino proveniente da tre regioni dell'Italia meridionale (Puglia, Calabria e Sardegna), il 34,7% dei 400 campioni esaminati è risultato positivo per la presenza del microorganismo (13). L'elevata percentuale di rilievo di *H. pylori* dai campioni di latte crudo esaminati, offre nuovi spunti di ricerca volti ad accertare non solo il rischio di infezione per l'uomo attraverso il consumo di latte crudo ma soprattutto il ruolo dei ruminanti come reservoir del microorganismo. Pertanto lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di *H. pylori* nella mucosa gastrica di ovini al macello impiegando una tecnica di Nested Polymerase

Chain Reaction (Nested-PCR) come metodica di screening.

## MATERIALI E METODI

Cinquanta campioni di mucosa di abomaso di ovino sono stati raccolti in un macello a bollo CE della provincia di Foggia (Puglia). Gli ovini esaminati avevano età compresa tra 3 e 5 anni. 30 dei 50 campioni sono stati prelevati da abomasi di ovini di razza Lacaune allevati in aziende zootecniche dislocate nel distretto di Rodez (Francia) e 20 da abomasi di ovini di razza Comisana allevati in aziende zootecniche della provincia di Foggia (Puglia).

*Prelievo campioni*- Subito dopo le operazioni di macellazione eseguite sotto il controllo del veterinario ufficiale, l'abomaso è stato separato dal resto dei visceri. Dopo aver effettuato il lavaggio del lume ciascun campione, posto in buste sterili di stomacher, è stato trasportato in regime di refrigerazione (4°C) presso i nostri laboratori e prontamente analizzato. Per ciascun campione è stato eseguito l'esame anatomo-patologico per il rilievo di zone iperemiche e presenza di ulcere gastriche; con l'utilizzo di bisturi sterili e in condizioni di asepsi è stato effettuato un raschiato di mucosa gastrica nella zona pilorica dell'abomaso. 25 mg di mucosa così prelevati, sono stati utilizzati per la prova di screening impiegando una metodica di biologia molecolare (Nested-PCR). I campioni risultati positivi alla Nested-PCR sono stati sottoposti ad analisi batteriologica per l'isolamento del ceppo.

*Nested-PCR*- Per l'estrazione del DNA batterico dai campioni di mucosa di abomaso di ovino è stato utilizzato il Dneasy Tissue Kit (QIAGEN) seguendo le indicazioni della ditta produttrice. I primer Hp 1 e Hp 2 sono stati utilizzati per ottenere un amplicone di 294 bp relativo al gene che codifica per la phosphoglucosamine mutase (*glmM*) (1). I primer Hp 3 e Hp 4 sono stati utilizzati per amplificare una regione di 252 bp localizzata internamente al primer Hp 1 e Hp 2 (1). 2  $\mu$ l di ciascun estratto sono stati amplificati in 50  $\mu$ l di master mix contenente 10 x HotMaster Taq buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 M di ciascun dNTPs, 0.5 mM di ciascun primer (Hp 1 e Hp 2), e 1.25 U di Hot Master Taq DNA polymerase (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). La prima e la seconda amplificazione sono avvenute secondo il protocollo descritto altrove (12). La visualizzazione degli amplicati è stata ottenuta mediante elettroforesi in gel di agarosio al 1,5%, colorato con etidio bromuro; come marker di riferimento è stato impiegato Gene

Ruler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Milano, Italia). La visualizzazione degli amplicati è stata eseguita con transilluminatore ad UV.

*Sequenziamento* - Gli ampliconi sono stati purificati in colonnine Ultrafree-DA (Amicon, Millipore, Bedford, USA) e sequenziati in ABI-PRISM 377 con il Kit Taq DyeDeoxyTerminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) in entrambe le direzioni (con gli stessi primer utilizzati per la Nested-PCR). Gli elettroferogrammi sono stati controllati manualmente e le sequenze ottenute allineate con il programma ClustalX (14). L'allineamento è stato verificato, sistemato manualmente e confrontato con le sequenze di *H. pylori* presenti in GenBank (GenBank accession n. AJ252993) (14).

*Isolamento di H. pylori* - I campioni risultati positivi in Nested-PCR sono stati sottoposti all'analisi batteriologica per l'isolamento dei ceppi di *H. pylori* secondo il protocollo descritto altrove (11).

## RISULTATI

Tre (6%) dei 50 campioni di raschiato di mucosa di abomaso di ovino esaminati sono risultati positivi per la presenza del gene *glmM* di *H. pylori* e precisamente: 2 (4%) provenivano da abomasi di ovini di razza Lacaune, allevati in aziende zootecniche dislocate nel distretto Rodez (Francia) e 1 (2%) da abomasi di ovini di razza Comisana allevati in aziende zootecniche della provincia di Foggia (Puglia). Tutti gli ovini risultati positivi non presentavano lesioni anatomo-patologiche. Il sequenziamento degli ampliconi ottenuti dai campioni di abomaso ovino risultati positivi in Nested-PCR ha mostrato un'omologia del 98% con le sequenze disponibili in GenBank (14). Non è stato possibile isolare i ceppi batterici dai 3 campioni risultati positivi in Nested-PCR.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

*H. pylori* è un importante patogeno dell'uomo in quanto ne è stato accertato il ruolo eziologico in gravi patologie dell'apparato gastroenterico. Recentemente, a seguito dell'isolamento di *H. pylori* da latte ovino, bovino e caprino (5; 6; 13) e del rilievo in mucosa gastrica di ovini (5), bovini, suini e equini (4), è stata ipotizzata l'esistenza di serbatoi animali del microrganismo. In questo lavoro sono riportati i risultati preliminari di un'indagine condotta su abomasi di ovini al macello al fine di valutare la possibilità che questi animali possano essere uno dei ser-

batoi ipotizzati. Il 6% dei campioni analizzati è risultato positivo in assenza di lesioni anatomico-patologiche per la presenza del gene *glmM* di *H. pylori* e l'analisi delle sequenze ottenute ha dimostrato il 98% di identità con la sequenza disponibili in GenBank. Questa ricerca prende inoltre spunto dall'osservazione di alcuni autori che le gravi lesioni istopatologiche presenti nello stomaco umano, a seguito dell'infezione da *H. pylori*, differiscono dalle lesioni causate dagli altri elicobatteri gastrici per i quali l'ospite naturale presenta una blanda risposta infiammatoria o non la presenta affatto. Questo dato infatti suggerisce che *H. pylori* non è originariamente un patogeno dell'uomo ma che molto probabilmente è stato introdotto nella popolazione umana da un serbatoio animale in un lontano passato (5). Sebbene i risultati da noi ottenuti necessitino di ulteriori indagini sono da considerarsi, a nostro avviso, di particolare importanza soprattutto alla luce di quanto detto e delle elevate positività ottenute in un nostro precedente lavoro da campioni di latte crudo di diverse specie di ruminanti (13). Infatti, sebbene l'elevata prevalenza di soggetti portatori non consenta di escludere la possibilità che il latte possa contaminarsi per scarsa igiene durante le operazioni di mungitura, raffreddamento e stoccaggio, il rilievo di *H. pylori* da mucosa gastrica di ovini adulti

consente tuttavia di ipotizzare che questi animali possano rappresentare un serbatoio naturale del microrganismo e che la contaminazione del latte possa avvenire o attraverso il passaggio di *H. pylori* dal tessuto mammario o per contaminazione fecale. Ulteriori studi sono necessari per confermare il ruolo degli ovini e dei ruminanti in genere quali potenziali serbatoi del microrganismo e per chiarire inoltre il meccanismo di contaminazione del latte.

Il mancato isolamento dei ceppi di *H. pylori* dai campioni risultati positivi alla Nested-PCR potrebbe essere verosimilmente imputato a molteplici fattori, fra i quali di particolare rilevanza sono da considerare la presenza di flora microbica competitiva che ne rende difficile l'isolamento selettivo e la presenza di VNC di *H. pylori*, forme vive, metabolicamente attive che conservano il loro potere infettante ma non isolabili sui terreni culturali. Tuttavia, l'impiego di una metodica di biologia molecolare molto sensibile come la Nested-PCR utilizzata (12) ha consentito lo screening dei campioni esaminati che sarebbero altrimenti risultati negativi se processati con il solo metodo microbiologico. Pertanto, emerge la necessità di mettere a punto protocolli sensibili che consentano lo screening dei campioni e l'isolamento selettivo del microrganismo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bamford, K.B., Lutton, D.A., O'Loughlin, B., Coulter, W.A., and Collins, J.S. (1998). Nested primers improve sensitivity in the detection of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *Journal of Infection* 36, 105-110.
- 2) Cellini, L., Del Vecchio, A., Di Candia, M., Di Campli, E., Favaro, A., and Donelli G. (2004). Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 285-292.
- 3) Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Infection Diseases Division of Bacterial and Mycotic Disease. (2005) *Helicobacter pylori* infection (*H. pylori*). Available on <http://cdc.gov/ulcers/md.htm>.
- 4) Dimola, S., Caruso, M.L. (1999). *Helicobacter pylori* in animals affecting the human habitat through the food chain. *Anticancer Research*. 19, 3889-3894.
- 5) Dore, M.P., Sepulveda, A.R., El-Zimaty, H., Yomaoka, Y., Osato, M.S., Mototsugu, K., Nieddu, A.M., Realdi, G., Graham, D.Y. (2001). Isolation of *Helicobacter pylori* from milk sheep-implications for transmission to humans. *The American Journal of Gastroenterology*, 96, 1396-1401.
- 6) Fujimura, S., Kawamura, T., Kato, S., Tateno, H., Watanabe, A. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 504-507.
- 7) Gomes, B.C., De Martinis, E.C.P. (2004). The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples. *Food Control*, 15, 397-403.
- 8) Hatakeyama, M., Brzozow, T. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 11, 14-20.
- 9) Lu, Y.Z., Redlinger, T.E., Avitia, R., Galindo, K. (2002). Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1436-1439.
- 10) Poms, R.E., Tatini, S.R. (2001). Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 281-286.
- 11) Quaglia, N.C., Dambrosio, A., Normanno, G., Parisi, A., Firinu, A., Celano, G.V. (2007). Survival of *Helicobacter pylori* in artificially contaminated Ultra High Temperature and pasteurized milk. *Food Microbiology*, 24, 296-300.
- 12) Quaglia N.C., Dambrosio A., Normanno G., Celano G.V. (2008). Evaluation of a Nested-PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene (*glmM*) for the detection of *Helicobacter pylori* from raw milk. *Food Control*, in press.
- 13) Quaglia, N.C., Dambrosio, A., Normanno, G., Parisi, A., Patrono, R., Ranieri, G., Rella, A., Celano, G.V. (2008). High occurrence of *Helicobacter pylori* in raw goat, sheep and cow milk inferred by *glmM* gene: a risk of food-borne infection?. *International Journal Food Microbiology*. In press.
- 14) Van der Ende, A., Pan, Z.J., Bart, A., van der Hulst, R.W., Feller, M., Xiao, S.D., Tytgat, G.N. and Dankert, J. (2000). *cag-A* positive *Helicobacter pylori* populations in china and the Netherlands are distinct. *Infect. Immunol.*, 68, 1822-1826.