

Valutazione comparativa di un test immunocromatografico “*Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test” e di due test immunoenzimatici “Fecal-clean *H. pylori* Ag” e “Amplified IDEIA™ Hp StAR™” per la diagnosi di infezione da *Helicobacter pylori* attraverso ricerca di antigeni fecali

Antonella Marangoni¹, Alessandra Moroni², Francesca Cavrini², Elisa Storni²,
Manuela Donati¹, Vittorio Sambri^{1, 2}

¹ Sezione di Microbiologia, DMCSS, Università degli Studi di Bologna e Unità Operativa di Microbiologia

² Azienda Ospedaliera di Bologna² Policlinico S.Orsola, Bologna

Evaluation of an immunocromatographic test, “*Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test”, and two enzyme immunoassay techniques, “Fecal-clean *H. pylori* Ag” and “Amplified IDEIA™ Hp StAR™”, for detection of *Helicobacter pylori* antigens in stool specimens

Key words: *Helicobacter pylori*, fecal antigens, immunocromatographic test, enzyme-linked immunoassay, dispepsia.

SUMMARY

Helicobacter pylori causes gastritis and peptic ulcer disease and has been associated with gastric malignancies. During recent years, non invasive diagnostic tests have gained in significance. Well-established non invasive tests are serology and the [¹³C] urea breath test. Serology, however, is not suitable for an early follow-up examination due to the slow reduction of the anti-*H. pylori* antibody titer after successful treatment. The [¹³C] urea breath test-delivering accurate results both in the pretreatment examination of infected individuals and in the early post treatment control-fulfills the demands for such a test. However, expensive instrumentation and a specialized technician are required. Since infected individuals excrete *H. pylori* in stool specimens, a sufficiently accurate test using feces would be an important alternative to [¹³C] urea breath test. In this study we compared the diagnostic performances of the immunocromatographic test “*Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test” with those of two enzyme linked immunoassay techniques “Fecal-clean *H. pylori* Ag” and “Amplified IDEIA™ Hp StAR™” for detection of *H. pylori* antigens in stool specimens. The values of agreement ranged from 89.6% to 93.6%.

INTRODUZIONE

L'isolamento di *Helicobacter pylori* nei primi anni '80 da parte di Marshall e Warren (8) ha aperto una nuova era nel campo della microbiologia applicata alle malattie dell'apparato gastroenterico. Oggi che *H. pylori* è universalmente riconosciuto come agente di patologia dispeptica ed in particolare di gastriti, ulcere peptiche e carcinoma gastrico (3, 13), uno degli interessi emergenti in campo diagnostico riguarda l'utilizzo di tecniche affidabili e non invasive; i metodi oggi più utilizzati a tale scopo sono quelli sierologici e il [¹³C] urea breath test. I primi sono poco costosi, di facile utilizzo, ma non sono utilizzabili per il follow-up dei pazienti, dal momento che si mantiene una positività per un tempo abbastanza lungo anche dopo trattamento (1). Il [¹³C] urea breath test è utile sia per eseguire indagini pre- e post-trattamento (2), ma per la sua corretta esecuzione servono macchinari costosi e personale spe-

cializzato. Dal momento che *H. pylori* viene eliminato con le feci (4, 12), test affidabili per la ricerca di antigeni batterici nelle feci dei pazienti sono una valida alternativa alle due metodiche diagnostiche non invasive prima citate. Recentemente sono state allestite sia metodiche per la ricerca di segmenti genomici del patogeno (tramite PCR), sia metodiche immunologiche (5-6, 8, 10-11, 14).

In questo studio sono stati valutati in comparazione le performance diagnostiche di tre metodi, il primo immunocromatografico e gli altri due immunoenzimatici, per la ricerca di antigeni fecali di *H. pylori*: *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test, Fecal-clean *H. pylori* Ag, e Amplified IDEIA™ Hp StAR™.

MATERIALI E METODI

Popolazione studiata

Sono stati testati 250 campioni fecali ottenuti da

pazienti con sintomatologia dispeptica inviati all'Unità Operativa di Microbiologia, del Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, nel corso dell'anno 2003, per la determinazione della presenza di antigeni fecali di *H. pylori*. L'età dei pazienti era variabile da 4 mesi a 93 anni ($x_m = 20.5$ anni). Il 49.4% dei pazienti erano di sesso femminile e il 50.6% di quello maschile.

***Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test**

Helicobacter pylori Antigen Onestep Test (DYA-SET s.r.l., Portomaggiore, Italy) è un metodo immunocromatografico su cartuccia, in cui sono adesi alla membrana anticorpi policlonali di topo anti-*H. pylori*. Gli anticorpi si trovano in due posizioni: anticorpi marcati con oro colloidale, situati nel pozzetto della cartuccia, e anticorpi non marcati, ma uguali nella porzione variabile ai precedenti, nella prima finestrella (posizione T). Il test è stato eseguito secondo le istruzioni del costruttore. In breve, il campione di feci da testare è stato diluito e centrifugato 5 minuti a 1500 rpm e 200 µl di sospensione sono stati caricati nel pozzetto apposito della cartuccia. Se nel campione fecale erano presenti antigeni batterici, un complesso antigene-anticorpo marcato con oro colloidale si formava nel pozzetto. Questo complesso poi, nella sua migrazione cromatografica, incontrava il secondo anticorpo specifico anti-*H. pylori* (uguale al primo, ma non marcato) e si metteva così in evidenza una banda rossa in posizione T. Se, al contrario, nelle feci non erano presenti antigeni batterici, il primo anticorpo marcato con oro colloidale continuava la sua migrazione fino ad essere bloccato da un anticorpo generico anti-anticorpo murino in posizione C e si evidenziava solo una banda rossa in questa seconda finestrella, controllo dell'avvenuta reazione. Bisogna specificare che, per la validazione della prova, questa seconda banda doveva comunque essere sempre presente, anche nei campioni positivi, per un eccesso di anticorpi marcati con oro colloidale. Se ciò non fosse accaduto, il campione doveva essere ritestato su una nuova cartuccia. La lettura è stata sempre eseguita entro 15 minuti dalla dispensazione dei campioni.

Amplified IDEIA™ Hp StAR™

Amplified IDEIA™ Hp StAR™ (DAKO, Martinsried, Germany) è una metodica immunoenzimatica qualitativa "a sandwich" in micropiastra, dove i pozzetti sono sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-*H. pylori*. I campioni sono stati saggati secondo le linee guida del costruttore. In breve, il materiale fecale è stato diluito e centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti; sono stati poi prelevati 50 µl di sovrantante e

caricati in un pozzetto della piastra sensibilizzata. In ogni seduta sono stati inseriti anche i controlli positivo e negativo. Ai pozzetti dei campioni e dei controlli sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di anticorpi monoclonali specifici anti-*H. pylori* coniugati con enzima perossidasi. Al termine del periodo di incubazione di un'ora a temperatura ambiente, la piastra è stata lavata 5 volte e la reazione antigene-anticorpo rivelata con l'aggiunta di tetrametilbenzedina e H₂O₂ in soluzione acquosa (100 µl/pozzetto). Dopo 10 minuti sono stati aggiunti 100 µl di H₂SO₄ a ogni pozzetto e la lettura è stata eseguita (entro 15 minuti) mediante lettura allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 450 nm (λ riferimento: 620-650 nm). Secondo le istruzioni, abbiamo considerato positivi campioni con valori di assorbanza ≥ 0.150 OD; viceversa, campioni con valori di assorbanza < 0.150 OD sono stati valutati come negativi. È importante sottolineare che in questo tipo di metodica non viene considerata alcuna "zona grigia" o dubbia al momento della lettura.

Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag

Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag (Astra-Medic, Pavone Canavese, Italy) è un metodo immunoenzimatico qualitativo a cattura in micropiastra che impiega pozzetti sensibilizzati con anticorpi policlonali anti-*H. pylori*. Il test è stato eseguito manualmente, seguendo le direttive del produttore. Per ogni campione è stato utilizzato un microdel diverso (fornito nel kit). A ciascun microdel da utilizzare sono stati aggiunti 400 µl di soluzione di anticorpi monoclonali specifici anti-*H. pylori* coniugati con enzima perossidasi. L'ago di prelievo del tappo del microdel è stato inserito nelle feci e, dopo essersi accertati di avere effettuato un prelievo corretto, è stato riavvitato il tappo in modo da poter miscelare il contenuto su un vortex. Dopo avere disciolto il campione fecale nel diluente, il beccuccio contagocce del microdel si rompeva, si rimuoveva e venivano messe 6 gocce di sospensione in un pozzetto della micropiastra. In ogni seduta sono stati inseriti anche gli appositi controlli (positivo e di coniugata). Al termine del periodo di incubazione di un'ora a temperatura ambiente, la piastra è stata lavata 6 volte e la formazione dell'immunocomplesso è stata rivelata con l'aggiunta di tetrametilbenzidina e H₂O₂ in soluzione acquosa (200 µl/pozzetto). Dopo 10 minuti sono stati aggiunti 100 µl di H₂SO₄ a ogni pozzetto e entro 30 minuti è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 450 nm. La lettura è stata effettuata a doppia lunghezza d'onda (λ riferimento: 630 nm), in modo da ridurre al minimo il segnale di fondo, così come consigliato dal produttore. Campioni

con valori di assorbanza ≥ 0.250 OD sono stati considerati positivi; campioni con valori di assorbanza compresi tra 0.150 e 0.250 OD sono stati considerati dubbi; infine, campioni con valori di assorbanza < 0.150 OD sono stati valutati come negativi.

RISULTATI

I risultati ottenuti sono indicati nelle tabelle 1-3. *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test ha messo in evidenza 50 campioni francamente positivi, 20 campioni con una reazione dubbia o debole positiva e 180 negativi. Utilizzando invece il kit Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag i campioni positivi sono stati 28, 14 sono risultati dubbi e 208 negativi. Infine, il kit Amplified IDEIA™ Hp StAR™ ha evidenziato 39 campioni positivi e 211

negativi. La concordanza tra *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test e Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag, se non consideriamo nel conteggio i 29 campioni risultati dubbi a una delle due metodiche o ad entrambe, è risultata pari al 91.4%. La concordanza tra Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag e Amplified IDEIA™ Hp StAR™, sempre non considerando nel conto i 14 campioni dubbi (in questo caso nella sola metodica Astra-Medic), è stata del 93.6%. Infine, la concordanza tra *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test e Amplified IDEIA™ Hp StAR™, escludendo i 20 campioni dubbi nella metodica immunocromatografica, è risultata pari a 89.6%.

DISCUSSIONE

L'utilizzo di metodiche diagnostiche non invasive

Tabella 1. Confronto dei risultati ottenuti dal kit Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag e dal kit *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test, testando 250 campioni di feci provenienti da pazienti con sintomatologia dispeptica

	+	-	BL
	<i>Helicobacter pylori</i> Antigen Onestep Test	Test <i>Helicobacter pylori</i> Antigen Onestep Test	Test <i>Helicobacter pylori</i> Antigen Onestep Test
+			
Fecal-clean <i>Helicobacter pylori</i> Ag	26	2	0
-			
Fecal-clean <i>Helicobacter pylori</i> Ag	17	176	15
BL			
Fecal-clean <i>Helicobacter pylori</i> Ag	7	2	5

Tabella 2. Confronto dei risultati ottenuti dal kit Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag e dal kit Amplified IDEIA™ Hp StAR™, testando 250 campioni di feci provenienti da pazienti con sintomatologia dispeptica

	+	-
	Amplified IDEIA™ Hp StAR™	Amplified IDEIA™ Hp StAR™
+		
Fecal-clean <i>Helicobacter pylori</i> Ag	21	7
-		
Fecal-clean <i>Helicobacter pylori</i> Ag	8	200
BL		
Fecal-clean <i>Helicobacter pylori</i> Ag	10	4

Tabella 3. Confronto dei risultati ottenuti dal kit *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test e dal kit Amplified IDEIA™ Hp StAR™, testando 250 campioni di feci provenienti da pazienti con sintomatologia dispeptica

	+	-
	Amplified IDEIA™ Hp StAR™	Amplified IDEIA™ Hp StAR™
+		
<i>Helicobacter pylori</i> Antigen Onestep Test	30	20
-		
<i>Helicobacter pylori</i> Antigen Onestep Test	4	176
BL		
<i>Helicobacter pylori</i> Antigen Onestep Test	6	14

per la diagnosi di infezione da *H. pylori* è una prassi ormai assodata in questi ultimi anni. Le metodiche classiche sierologiche o il [¹³C] urea breath test rimangono tuttora le più utilizzate, ma presentano problemi diversi tra loro: le prime non sono idonee per monitorare il follow-up dei pazienti (1), dato il lento decrescere dei titoli anticorpali, la seconda è altamente affidabile (2), ma costosa e può essere di difficile applicazione a pazienti in età pediatrica o con particolari problemi neurologici (7). In questo studio sono state valutate le performance diagnostiche di tre metodiche disponibili in Italia: un test immunocromatografico, “*Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test”, e due test immunoenzimatici, “Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag” e “Amplified IDEIA™ Hp StAR™”, per la diagnosi di infezione da *H. pylori* attraverso ricerca di antigeni fecali. I risultati ottenuti su 250 campioni di feci provenienti da pazienti dispeptici sono stati abbastanza simili. La metodica immunocromatografica è stata quella che ha rivelato il numero più alto di campioni positivi (50/250), mentre le due metodiche immunoenzimatiche sono state le più concordanti tra loro (93.6%), con un numero di positivi pari a 28, nel caso di utilizzo del test Fecal-clean *Helicobacter pylori* Ag e di 39, per il kit Amplified IDEIA™ Hp StAR™. Dal momento che le due metodiche immunoenzimatiche sono concettualmente simili (entrambi test “a sandwich”), la buona concordanza ritrovata non stupisce. Le tre metodiche utilizzate si sono dimostrate di facile utilizzo, rapide (in particolare il metodo a cartuccia *Helicobacter pylori* Antigen Onestep Test) e da questi primi risultati preliminari possono essere utilizzate nella routine di laboratorio per la diagnosi di infezione da *H. pylori* su materiale fecale; ulteriori indagini sono comunque necessarie per valutare la sensibilità e la specificità delle singole tecniche, possibilmente in comparazione al [¹³C] urea breath test.

BIBLIOGRAFIA

1. Cutler AF, Prasad VH. Long term follow-up of *Helicobacter pylori* serology after successful eradication. *Am J Gastroenterol* 1996; 31: 85-8.
2. Dominguez-Muñoz JE, Leodolter A, Sauerbruch T, 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.
3. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 720-41.
4. Gramley WA, Asghar A, Frierson HF Jr, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2236-40.
5. 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.
6. Makristathis A, Pasching E, Schütze K, Wimmer M, Rotter ML, Hirschl AM. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2772-4.
7. Makristathis A, Barousch W, Pasching E, et al. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3710-4.
8. Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, et al. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* 1993; 341: 447.
9. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1(8390): 1311-5.
10. Metz DC. Stool testing for *Helicobacter pylori* infection: yet another noninvasive alternative. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 546-8.
11. Suzuki N, Wakasugi M, Nakaya S, et al. Production and application of new monoclonal antibodies specific for a fecal *Helicobacter pylori* antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 75-8.
12. Suzuki N, Wakasugi M, Nakaya S, et al. Catalase, a specific antigen in the feces of human subjects infected with *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 784-8.
13. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, et al. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1734-9.
14. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 1999; 354: 30-3.

Antonella Marangoni

Sezione di Microbiologia, DMCSS
 Università degli Studi di Bologna
 Policlinico S. Orsola
 Via Massarenti 9; 40138 Bologna
 Tel. 051/6364516; Fax. 051/6364516
 e-mail:
marangoni@orsola-malpighi.med.unibo.it