



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Dipartimento di Biochimica
Dottorato di ricerca in Biochimica
XXIII Ciclo
Settore scientifico disciplinare: bio/12

Coordinatore: Egr.Prof G.Lenaz

**“Metodi biochimici e biomolecolari applicati alla medicina clinica:
rendimento della real-time TaqMan PCR per la valutazione della
resistenza alla claritromicina in H.pylori
e
tests fecali nella diagnosi del carcinoma colo-rettale:
M2PK, calprotectina e FOBT”**

Tutor:
Prof. Dino Vaira

Presentata da:
Dr.ssa Ilaria Maria Saracino

Anno accademico 2010

INDICE 1 (rendimento della real-time TaqMan PCR per la valutazione della resistenza alla claritromicina in H.pylori)

- INTRODUZIONE.....	1
- SCOPO DELLA RICERCA.....	4
- MATERIALI E METODI	4
- POPOLAZIONE ARRUOLATA.....	4
- COLTURE E E-TEST.....	4
- VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA.....	5
ALLA CLARITROMICINA	
- CARATTERIZZAZIONE DEI CNTROLLI	6
POSITIVI E NEGATIVI	
- PREPARAZIONE DI SONDE E PRIMERS.....	6
- GENOTIPIZZAZIONE.....	6
- REAL-TIME PCR E DISCRIMINAZIONE.....	7
ALLELICA	
- SENSIBILITA DELLA TaqMan PCR.....	8
- ANALISI STATISTICA.....	8
- RISULTATI.....	9

INDICE 2 (test fecali nella diagnostica del CCR)

- INTRODUZIONE.....	16
- SCREENING DI MASSA: COME EUMENTARNE	17
L'EFFICIENZA E RAZIONALIZZARE LE PCS	
- RAZIONALE.....	18
- OBIETTIVI.....	19
- LA CALPROTECTINA.....	20
- MATERIALI E METODI.....	20
- PAZIENTI.....	20
- SOMMINISTRAZIONE TEST FECALI.....	21
- MISURAZIONE TEST FECALI.....	21
- iFOBT.....	21
- CALPROTECTINA.....	21
- tumorM2PK.....	22
- ANALISI ENDOSCOPICHE.....	22
- ANALISI STATISTICA.....	22
- RISULTATI.....	23
- DISCUSSIONE.....	28
- BIBLIOGRAFIA.....	31

INTRODUZIONE:

L'*Helicobacter pylori* è un batterio spiraliforme microaerofilo, che colonizza lo stomaco dell'uomo. Esso è stato riconosciuto come la principale causa della gastrite cronica e come un fattore determinante nella patogenesi dell'ulcera peptica e del cancro gastrico, così come nella patogenesi del MALT linfoma (linfoma del tessuto linfoide associato alla mucosa). Molti studi hanno dimostrato anche un'associazione tra l'*H.pylori* e patologie extra-gastriche, ad esempio l'artrite reumatoide (1) e alcune patologie cardiovascolari (2). È stato ampiamente dimostrato che tutti i soggetti con ulcera gastrica o duodenale e infezione da *H.pylori* devono essere trattati con agenti anti-microbici, poiché l'eradicazione di *H.pylori* causa la regressione dell'ulcera (3). L'infezione da *H.pylori* può essere trattata con una combinazione di inibitori della pompa protonica (IPP) e antibiotici. Claritromicina, amoxicillina, metronidazolo e tetraciclina sono spesso inclusi nei regimi di triplice o quadruplice terapia utilizzati per eradicare l'*H.pylori*. L'efficienza di questi regimi terapeutici può essere compromessa dall'instaurarsi della farmaco-resistenza (nell'ultimo decennio infatti i tassi d'eradicazione hanno subito un evidente calo) la cui causa predominante sembra essere la resistenza alla claritromicina, essendo questo il farmaco di prima scelta per il trattamento dell'infezione da *H.pylori*.

La claritromicina appartiene alla classe dei macrolidi, che legano la subunità 50S del ribosoma batterico e impediscono la sintesi proteica. La resistenza a questo farmaco è dovuta soprattutto a mutazioni puntiformi nella regione peptidil-trasferasica del rRNA 23S, che impediscono il legame del farmaco al ribosoma batterico. Nel genoma dell'*H.pylori*, il gene del rRNA 23S è presente in duplice copia, ben 8 mutazioni nella regione peptidil-trasferasica (A2115G, G2141A,

A2142G, A2142C, A2142T, A2143G, A2143C e T2182C) sono state associate alla resistenza alla claritromicina (4). Si è comunque osservato che la maggior parte dei casi di resistenza primaria alla claritromicina è dovuta a tre mutazioni (A2142C, A2142G e A2143G), che sono state correlate con diversi valori di MIC (minima concentrazione inibente) in vitro (5,6,7,8).

La resistenza alla claritromicina è spesso correlata a cross-resistenza con altri macrolidi, in particolare si è osservato che le mutazioni A2142G e A2142C causano un alto grado di resistenza a tutti i macrolidi, mentre la mutazione A2143G porta ad un alto grado di resistenza all'eritromicina e ad un livello intermedio di resistenza alla clindamicina e alla streptogramina (9,10).

Nella pratica clinica, la valutazione della resistenza batterica agli antibiotici viene effettuata tramite isolamento colturale e successivo antibiogramma; le tecniche disponibili sono l'agar dilution, la disk diffusion o l'E-test; quest'ultimo è il metodo più usato. Purtroppo, essendo l'*H.pylori* un batterio microaerofilo e a lenta crescita, ottenere la coltura batterica impone molte difficoltà e lunghi tempi d'attesa (11, 12). Per questi motivi, molte linee guida per il trattamento dell'infezione da *H.pylori* non consigliano l'antibiogramma in pazienti che non siano stati trattati in precedenza. Per la diagnosi e valutazione della resistenza alla claritromicina sono stati utilizzati molti metodi molecolari, come il DEI (Dna enzyme immunoassay) (13), il Li-PA (line probe assay) (14,15), la FISH (fluorescent in situ hybridization) (16) e la real-time PCR. Queste metodiche hanno dato buoni risultati e in brevi tempi (con la real-time PCR si possono ottenere risultati in 2 ore), inoltre si può utilizzare anche il DNA estratto da campioni biotici inclusi in paraffina (6). Molti autori concordano sulla scelta della real-time PCR come metodica di riferimento (17).

SCOPO DELLA RICERCA:

Lo scopo dello studio sarà di valutare l'accuratezza della TaqMan real-time PCR nel determinare la resistenza alla claritromicina rispetto al metodo colturale standard (E-Test).

In questo modo sarà inoltre possibile valutare le incidenze e gli effetti delle singole mutazioni coinvolte nella resistenza alla claritromicina in *H.pylori*.

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE ARRUOLATA

La popolazione dello studio consiste in 86 pazienti, che si sono sottoposti a 13C-UBT e EGDS nella nostra Unità Operativa, e sono risultati HP positivi.

Eseguendo l'esame colturale abbiamo ottenuto 2 gruppi:

46 pazienti resistenti alla claritromicina

40 pazienti sensibili alla claritromicina

Lo status HP è stato valutato con 13C-UBT, RUT (rapid urease test), esame istologico (giemsa) e colturale (e-test, AB Biodisks, Solna, Sweden)

Da sezioni dei paraffinati si è estratto il Dna per eseguire la TaqMan real-time PCR e l'esame molecolare.

Tra gli 86 pazienti arruolati, 66 non erano mai stati trattati, mentre 20 avevano assunto la triplice terapia e no erano stati eradicati, ciò permette di individuare eventuali differenze tra resistenza primaria e indotta.

COLTURE E E-TEST

Le colture batteriche sono state effettuate in piastre di agar pylori (biomerieux) al 5% di siero. Le piastre sono state incubate a 37.4°C in

giare contenenti un kit per generare l'ambiente microaerobico (Oxoid Camp GasPak, Oxoid, Unipath, Garbagnate Milanese, Italy).

Le colonie sono state identificate tramite i test ossidasi, catalasi e ureasi.

Una volta isolate, le colonie H.p. vengono sospese in soluzione salina alla concentrazione di circa 10^8 CFU/ml (opacità 4 McFarland) nella quale viene imbevuto un tampone sterile, che si passa sulla piastra in modo da formare una griglia. Una strip di E-test (E-Test; AB Biodisk, Solna, Sweden) viene posata su ogni piastra, che viene reincubata per 72 ore. i ceppi vengono considerati resistenti alla claritromicina se risultano vitali a concentrazioni superiori o uguali a $1\mu\text{g/ml}$ di antibiotico.

VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA ALLA CLARITROMICINA

L'identificazione delle 3 mutazioni di punto nel 23SrRNAS dell'H.pylori ((A2142C, A2142G and A2143G) è stata eseguita con la real-time PCR utilizzando il protocollo di Oleandro et al (18)

Brevemente, il dna è stato estratto utilizzando il Nucleo-SpinnTissue (Macherey- Nagel GmbH & Co., Duren, Germany) applicato alle sezioni paraffinate, che, per l'analisi del dna, costituiscono un substrato attendibile come i campioni freschi (19). La stessa procedura è stata applicata agli omogenati di colture batteriche di H.pylori (controlli positivi e negativi) nei quali la presenza o assenza di resistenza alla ch era già stata valutata tramite e-test. la concentrazione finale di Dna è stata valutata con l'assorbanza a 260 nm. Diversamente da Oleastro et al, è stata utilizzata la Taqman real-time PCR come riportato da Kobayashi et al (20) per ottenere una stima della carica batterica con il 100% di sensibilità e specificità (comparata con istologia, test rapido all'ureasi, coltura e breath test)

CARATTERIZZAZIONE DEI CONTROLLI POSITIVI E

NAGATIVI

Il frammento Hp23S è stato ottenuto tramite amplificazione del dna estratto dagli omogenati delle colture batteriche (ceppi con e senza resistenza alla claritromicina, precedentemente stimati con l'E-test) utilizzando come primers Hp23-F(5'-CCACAGGATGTGGTCTCAG-3') e Hp23-R (5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3'). Tutti i prodotti PCR sono stati purificati utilizzando il Wizard PCR preps (Promega, Madison, WI, USA) e sottoposti al sequenziamento, effettuato con gli stessi primers della PCR(21) utilizzando un Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA). Il sequenziamento è stato effettuato su entrambi i filamenti dei prodotti PCR con il sequenziatore automatizzato ABI Prism 377 (Applied Biosystems). Le sequenze nucleotiche risultanti sono state allineate utilizzando il software sequence navigator (Applied Biosystems).

PREPARAZIONE DI SONDE E PRIMERS

Sonde e primers, che si ibridassero col Dna wild-type e mutato, sono state progettate con il "Express program and Genotyping Assay Service (Applied Biosystems)" che sintetizza i primers e le sonde per ogni mutazione.

GENOTIPIZZAZIONE

I reagenti per la genotipizzazione delle mutazioni di punto (Assays-by-Design service) consistono di un mix di primers per PCR non marcati e sonde Taqman MGB (leganti il solco minore) marcate con i fluorocromi FAM e VIC. Questi saggi sono stati progettati per la tipizzazione di specifiche mutazioni. Ogni saggio permette di identificare entrambi i genotipi in un singolo pozzetto.

La coniugazione delle MGB agli oligonucleotidi stabilizza i duplex di acidi nucleici, causando un enorme aumento della T_m (melting temperature – temperatura di fusione).(note 27 28)

Il legame delle MGB permette l'uso di sonde fluorogene più corte e quindi porta ad una migliore identificazione dei mismatch. Le sonde si possono distinguere tramite marcatura con diversi fluorocromi (FAM e VIC). Un aumento solo nella fluorescenza associata a FAM o a VIC indica l'omozigosi dell'allele specifico per FAM o VIC, mentre l'aumento di entrambi i segnali indica l'eterozigosi. (22)

REAL-TIME PCR E DISCRIMINAZIONE ALLELICA

Il composto per la real-time PCR è stato preparato raggiungendo un volume finale di 25uL contenente il Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems): 36uM di primers, la concentrazione ottimale (8uM) di sonde MGB marcate con FAM e VIC e 10 ng di Dna purificato.

La PCR è stata effettuata con uno strumento ABI Prism 7900HT instrument (Applied Biosystems).

Le condizioni per l'amplificazione PCR sono: 95° per 10min e 40 cicli a 92° per 15 sec e 60°C per 1 min. procedura per l'identificazione delle mutazioni effettuata secondo le indicazioni di Wada et al. per M. tuberculosis (23)

Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato e in ogni saggio sono stati inclusi sempre i controlli positivi e negativi. i dati sono stati analizzati con il software SEQUENCE DETECTOR(Applied Biosystems) selezionando un valore per il ciclo-soglia (ct) definito come il primo ciclo di PCR in cui i sono aumentati i parametri ed è stata osservata la fluorescenza.

Questa procedura indica una PCR efficace, l'annealing specifico delle sonde e una ottimale separazione delle molecole "reporter". La fluorescenza delle sonde ibridate è stata analizzata con grafici a più

componenti in cui la marcatura specifica (Fam e VIC), la fluorescenza di background e del controllo passivo (marcato col fluorocromo ROX) sono espressi come segnale reporter normalizzato (DRn). Tutti i campioni sono stati raggruppati usando il Maximum Likelihood Algorithm basato sul segnale reporter.

Da questa analisi sono risultati 3 maggiori gruppi corrispondenti ai tre genotipi costituenti: wild-type omozigote, mutato omozigote e eterozigote.

SENSIBILITA' DELLA real-time TaqMan PCR

Per valutare la soglia minima del protocollo real-time PCR, sono state processate diluizioni seriali del DNA H.pylori estratto sia dalle biopsie paraffinate sia dagli omogenati cellulari ottenuti dalle colture. Le diluizioni (da 100 ng a 100 fg) sono state analizzate prima di eseguire la real-time PCR e una linearità nell'amplificazione si è ottenuta a 500 fg.

L'efficienza di amplificazione del dna ottenuto da biopsie in paraffina è uguale a quella del dna ottenuto dagli omogenati cellulari (24).

La sensibilità della PCR nell'individuare ceppi multipli nello stesso campione è stata valutata mixando il DNA wild-type con e ceppi mutati A2142G, A2143G, A2142C nelle proporzioni del 50%, 25%, 10% e 5%. Queste miscele sono state analizzate con la real-time PCR e il dna mutato viene individuato già alla concentrazione del 10% (18).

ANALISI STATISTICA

Le differenze statistiche tra i gruppi sono state analizzate tramite il test t di Student per dati indipendenti, il test del chi quadrato e il test di fisher con la correzione di Yaate per i numeri piccoli. Le differenze sono state considerate significative assumendo il livello di probabilità del 5%.

Software: STATSOFT 6.0 per windows 98.0.

RISULTATI

Utilizzando la TaqMan real-time PCR, 37 campioni sono risultati sensibili alla claritromicina (gene wild), mentre nei rimanenti 49 campioni (57%) si è osservata una delle 3 mutazioni considerate (A2142C, A2142G, A2143G). In particolare, 32 ceppi (65,3% dei ceppi resistenti) sono risultati “puramente resistenti”, mentre in 17 (34,7%) ceppi si è ottenuto il segnale sia del dna wild che del dna mutato (stato etero-resistente). La mutazione A2143G è presente in 26 ceppi (53.1%), la A2142G in 9 ceppi (18.3%), la A2142C in 8 ceppi (16.3%), mentre in 6 casi si è osservata una doppia mutazione di punto (A2142G/A2142C e A2143G/A2142C in 1 caso, A2143G/A2142G in 4 casi). Si può perciò confermare che la mutazione A2143G, singola o combinata, sia quella più frequentemente associata alla resistenza alla claritromicina, con un totale di 31 casi su 49 (63.3%).fig1

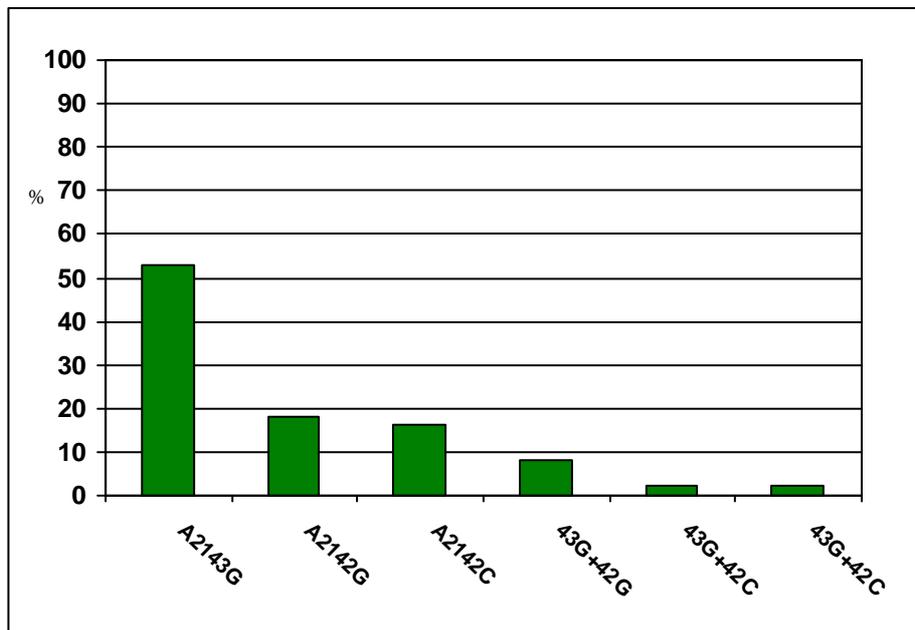


Fig.1 distribuzione delle mutazioni nei 49 ceppi mutati.

Considerando il metodo colturale (E-Test) come gold standard, analizziamo i risultati ottenuti con la PCR: dei 46 casi risultati

resistenti alla claritromicina tramite l'E-Test, 40 sono stati confermati dalla PCR, mentre in 6 ceppi non si è trovata alcuna delle mutazioni considerate. La sensibilità della TaqMan real-time PCR sarebbe perciò del 87%. D'altra parte, dei risultati sensibili alla claritromicina tramite l'E-Test, in 31 ceppi non sono state effettivamente trovate mutazioni, mentre 9 ceppi risultavano mutati nel gene del 23S rRNA. La specificità della TaqMan real-time PCR sarebbe perciò del 77.5%. (fig 2)

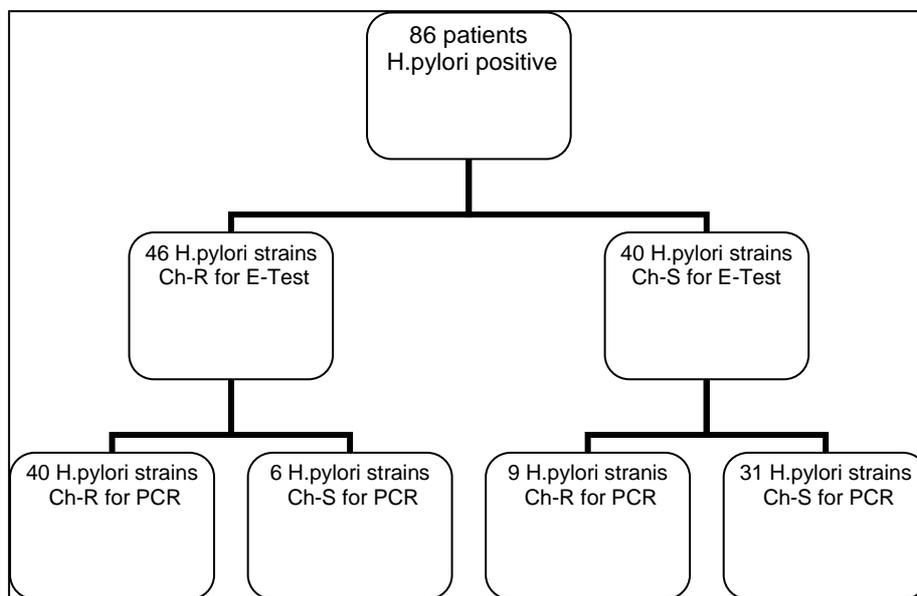


Fig 2: flow-chart.distribuzione dei risultati pcr/e-test

Nel primo caso di discordanza (ceppi non mutati - resistenti) si può ipotizzare che altre varianti genetiche, diverse da quelle da noi considerate, siano responsabili della farmaco resistenza alla claritromicina.

Nel secondo caso di discordanza (ceppi mutati - sensibili) si può ipotizzare l'esistenza, nel campione biotico, di sub-cloni resistenti che non vengono individuati col metodo colturale; oppure che le mutazioni da noi considerate nel gene del 23S rRNA non creino una

condizione sufficiente all'instaurarsi delle resistenza alla claritromicina.

Un ulteriore passo nell'interpretazione dei risultati di questo studio è quello di analizzare le eventuali relazioni tra le diverse mutazioni e gli effetti fenotipici prodotti.

Come già detto in precedenza, la mutazione A2143G è comparsa in 26 ceppi di H.pylori, 9 dei quali sono "eteroresistenti"(o misti). Il fenotipo resistente si è manifestato in 14 casi tra i 17 ceppi omogenei (82% dei ceppi omogenei) e in 5 casi tra i 9 ceppi misti (55% dei ceppi misti), per un totale di 19 casi (73%).

D'altra parte tutti i 9 campioni recanti la mutazione A2142G hanno confermato un fenotipo resistente con l'E-Test, tra questi 6 ceppi erano misti. La mutazione A2142C, presente in 8 campioni, ha recato un fenotipo resistente nei 6 ceppi omogenei, mentre i 2 ceppi misti hanno mostrato un fenotipo sensibile.

Infine, tutti i 6 campioni recanti mutazioni doppie hanno mostrato un fenotipo resistente con l'E-Test.

Si può ipotizzare che la mutazione A2142G esprima sempre un fenotipo resistente, non influenzato dalla presenza di infezioni miste e che la A2142C sia in relazione al fenotipo resistente solo se il ceppo è omogeneamente mutato. La mutazione A2143G mostra una relazione meno forte, anche se il ceppo omogeneo porta a un fenotipo resistente più di frequente. Fig 3

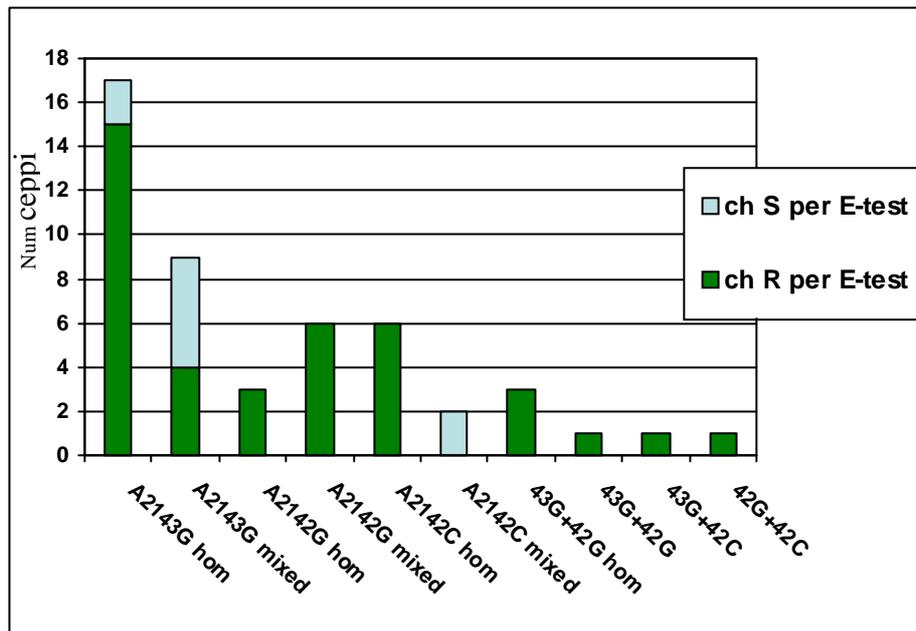


Fig 3 concordanza pcr-e-test in presenza delle diverse mutazioni (in ascissa è riportato il numero di ceppi).

Se leggiamo i dati ottenuti da un'altra prospettiva, considerando cioè che la TaqMan real-time PCR sia più sensibile dell'E-Test. 40 dei 49 campioni recanti mutazioni sono risultati resistenti con l'E-Test (81.6%), dei 9 campioni risultati sensibili, 7(2 omogenei e 5 misti) recano la mutazione A2143G, e 2 (misti) recano la mutazione A2142C. Si potrebbe quindi concludere che l'E-Test sia meno sensibile della PCR, soprattutto in caso di infezioni con ceppi misti o eterozigoti per la mutazione e/o in presenza di alcuni tipi di mutazione. Inoltre, i casi in cui la PCR non ha segnalato mutazioni in ceppi con fenotipo resistente, possono essere facilmente spiegati con la presenza di mutazioni diverse da quelle da noi considerate.

Considerando sempre gli eventuali effetti fenotipici prodotti dalle diverse mutazioni, abbiamo cercato di individuare una relazione tra mutazione – MIC (minimal inhibitory concentration). Tab1

	MIC molto alta (forte resistenza)	MIC intermedia (resistenza intermedia)	MIC bassa (debole resistenza)	MIC molto bassa (sensibilità)
A2143G 26 campioni	3	10	6	7
A2142G 9 campioni	6	3		
A2142C 9 campioni	2	4		2
MUTAZIONI DOPPIE 6 campioni	5	1		

Tab1 mic osservate per ogni tipo di mutazione

Analizzando statisticamente i risultati, non si riscontra alcuna relazione tra le diverse mutazioni e il grado di resistenza alla claritromicina. Probabilmente il trend diventa più chiaro analizzando una popolazione sempre più numerosa e/o analizzando tutte le mutazioni di punto implicate.

Come in precedenza specificato, in questo studio sono stati arruolati 66 pazienti mai trattati per l'infezione da H.pylori e 20 pazienti che, sottoposti a triplice terapia, non erano stati eradicati. In questo modo possiamo ipotizzare che nel secondo caso la resistenza alla claritromicina fosse indotta e non primaria.

Nel gruppo NT (never treated) l'esame colturale ha individuato 26 ceppi ch-resistenti, 21 dei quali sono risultati mutati nel dna del 23SrRNA. D'altra parte la PCR ha individuato una mutazione anche in 9 dei 40 ceppi risultati sensibili alla claritromicina tramite e-test (totale dei ceppi mutati: 30).

Nel gruppo NE (nen eradicated), tutti i 20 ceppi sono risultati resistenti alla claritromicina tramite e-test, tra questi solo 1 non è risultato mutato.(tab2 e fig 4)

	A2143G	A2142G	A2142C	A2143G+42G	A2143G+42C	A2142G+42C
NT *	15 (50%)	6 (20%)	7 (23.3%)	2 (6.7%)	/	/
NE **	11 (57.9%)	3 (15.7%)	1 (5.3%)	2 (10.5%)	1 (5.3%)	1 (5.3%)
Total	26 (53.1%)	9 (18.3%)	8 (16.3%)	4 (8.1%)	1 (2.1%)	1 (2.1%)

Tab2: *percentuale delle mutazioni di punto nei 30 casi di ceppi NT risultati mutati con la real-time PCR

**Percentuale delle mutazioni di punto nei 19 casi di ceppi NE risultati mutati con la real.time PCR.

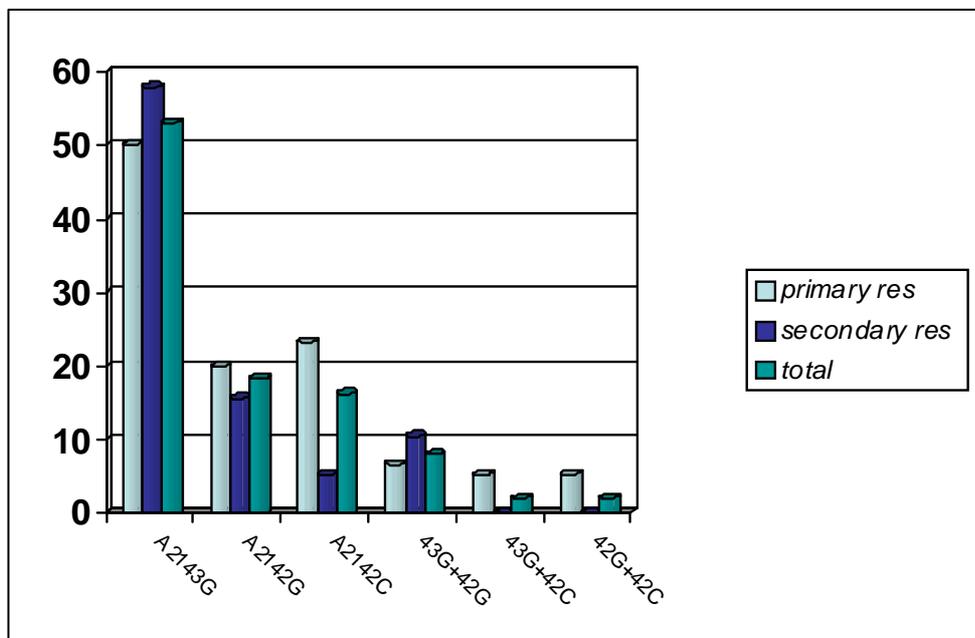


Fig4: grafico che illustra la distribuzione delle mutazioni nei casi di resistenza primaria e indotta. (In ascissa: % di ceppi)

Non tenendo conto delle mutazioni doppie, la prevalenza del genotipo mutato A2143G risulta più alta nei pazienti non eradicati, per i quali ipotizziamo la presenza di una farmaco resistenza indotta. Questa osservazione è in accordo con precedenti studi nei quali si è riscontrato che l'infezione da H.pylori viene eradicata solo nel 48% dei pazienti

con ceppi resistenti alla claritromicina recanti la mutazione A2143G, mentre in presenza delle altre 2 mutazioni (A2142G e A2142C) l'eradicazione si ottiene nel 93% dei casi (25).

Potremmo quindi ipotizzare che la mutazione A2143G, oltre ad essere la più frequente, sia quella maggiormente implicata nell'esito della terapia antibiotica, poiché sembra che le altre due mutazioni abbiano un ruolo marginale.

Anche nel caso delle mutazioni doppie, l'unica coppia che aumenta nei pazienti non eradicati è quella dove compare la A2143G.

Indagare su un numero maggiore di ceppi per ottenere una statistica più robusta, e soprattutto seguire l'esito dell'iter terapeutico potrebbe essere un importante passo per capire i meccanismi genetici della farmaco resistenza e soprattutto sviluppare tecniche molecolari che diano risultati accurati e in breve tempo.

TEST FECALI NELLA DIAGNOSTICA DEL CARCINOMA COLORETTALE

INTRODUZIONE

Il carcinoma colo-rettale (CCR) costituisce uno dei principali problemi sanitari nei paesi europei ove rappresenta la seconda più comune forma di cancro (dopo il carcinoma mammario) nel sesso femminile, e la terza nel sesso maschile (rispettivamente dopo il carcinoma prostatico e quello polmonare). Inoltre, va ricordato che l'incidenza di questo tipo di tumore è andata via crescendo in Europa nel corso delle ultime decadi, con un tasso di incremento dell' 1.8% nel periodo 2004 - 2006 (1). In Italia, nel 2005, si sono registrati 46.000 casi incidenti di CCR, 267.000 casi prevalenti, e 16.000 morti per questo tumore (2). Circa il 55% dei casi di CCR che vengono diagnosticati nel nostro Paese presentano, già al momento della diagnosi, metastasi linfonodali o a distanza (CCR in stadio III o IV) e, pertanto, il tasso di sopravvivenza standardizzato a 5 anni per CCR non è superiore al 59% (come in altre nazioni dell'Europa occidentale) (3). Il carcinoma colo-rettale è una malattia ideale da sottoporre a screening di popolazione, in virtù della sua elevata frequenza e del suo lento sviluppo a partire da una nota lesione precancerosa (il polipo adenomatoso), la cui rimozione è in grado di ridurre significativamente il successivo rischio di sviluppare il CCR (4). Quattro grossi trial clinici randomizzati, che hanno arruolato un totale di 260.188 soggetti di entrambi i sessi, hanno chiaramente dimostrato che lo screening di massa della popolazione generale (a partire dai 45 o 50 anni di età, a seconda dello studio) mediante ricerca del sangue occulto fecale (FOBT), con successiva coloscopia totale nei soggetti FOBT-positivi, è in grado di ridurre la mortalità specifica per CCR (del 12-33% a seconda dello studio) nei soggetti screenati rispetto ai non-screenati (5-8). Tali trend di incidenza del CCR in

Europa, unitamente alla dimostrazione che lo screening di massa è in grado di ridurre la mortalità per questa malattia, hanno spinto le autorità sanitarie di molti paesi europei a lanciare campagne di screening per il CCR, con modalità diverse da Nazione a Nazione (9). Ad esempio, in Finlandia, Francia e Regno Unito sono state lanciate campagne nazionali di screening basate sulla ricerca biennale del sangue occulto fecale nelle fasce d'età a rischio, mentre in Germania è stato adottato, già dall'anno 2002, un programma nazionale di screening del CCR mediante coloscopia totale una volta nella vita per la popolazione di entrambi i sessi di età superiore ai 50 anni. In Italia, il Ministero della Salute ha deciso nel 2005 che lo screening del CCR dovesse essere gradualmente implementato nel paese su base regionale, demandando alle singole autorità sanitarie regionali l'organizzazione delle campagne di screening, così come la scelta della metodica da impiegare. A tutt'oggi 11 delle 21 regioni italiane sono partite con programmi regionali di screening per CCR per lo più basati (fatta eccezione per la regione Piemonte, ove è stata proposta, in associazione al FOBT, la rettosigmoidoscopia) sulla ricerca, mediante metodica immunochimica, del sangue occulto fecale, seguita dalla coloscopia totale nei soggetti FOBT-positivi. Risultati preliminari in province pilota nelle Regioni italiane che sono partite per prime con queste campagne di screening dimostrano una buona adesione della popolazione (10).

SCREENING DI MASSA: COME AUMENTARNE L'EFFICIENZA E RAZIONALIZZARE LE COLONSCOPIE.

Il FOBT costituisce a tutt'oggi l'unica metodica disponibile per lo screening non invasivo di popolazione del CCR, con una sensibilità compresa tra il 26 ed il 69% per la diagnosi di CCR e del 9 – 36% per la diagnosi di adenoma (11).

Considerando che lo screening di massa comporterebbe inevitabilmente un aumento delle colonscopie, in primis sarebbe molto importante validare un test (o un'associazione di test) che abbia una maggiore efficienza nella diagnosi degli stati neoplastici e preneoplastici; inoltre, considerando più test, si potrebbe creare un "panel" per dare la giusta priorità all'esame endoscopico, cioè identificare quali colonscopie siano prioritarie e quali possano essere evitate o dilazionate nel tempo.

In questo studio abbiamo dunque cercato di validare i test MPK2 e CALP allo scopo di verificare se possano essere utilizzati al fine di prioritizzare le Colonscopie.

RAZIONALE

E' da tempo noto che le cellule neoplastiche sono capaci di sopravvivere e proliferare anche in condizioni "ambientali sfavorevoli" quali quelle caratterizzate da uno scarso apporto di ossigeno e di nutrienti. Un ruolo chiave di questa capacità peculiare delle cellule tumorali è svolto dalla piruvato chinasi, un enzima glicolitico in grado di regolare la quantità relativa di glucosio da incanalare nei processi di biosintesi o da utilizzare per la produzione di energia. La piruvato chinasi può essere espressa sotto forma di differenti isoenzimi in funzione delle diverse esigenze metaboliche. Durante il processo di trasformazione neoplastica le piruvato-chinasi tissutali specifiche vengono rimpiazzate dall'isoenzima M2-PK: nella sua forma tetramerică più attiva M2-PK porta ad un accumulo di fosfometaboliti che vengono incanalati verso i processi biosintetici, quali quelli degli acidi nucleici, aminoacidi e fosfolipidi (12). In tal modo le cellule neoplastiche si procurano energia attraverso la glutaminolisi, un processo ossigeno-dipendente. In condizioni di ridotto apporto di ossigeno la glutaminolisi viene inibita e l'M2-PK viene shiftata nella sua forma dimerica meno attiva. Ciò consente alla cellula neoplastica

di passare facilmente da uno stato anabolico ad uno catabolico in funzione dell'apporto di ossigeno e nutrienti (13),

Molti tipi di tumore, inclusi la maggior parte dei carcinomi gastrointestinali (il carcinoma esofageo, gastrico, pancreatico ed il cancro colo-rettale), sovraesprimono l'M2-piruvato chinasi che può essere riscontrata non solo nei campioni tissutali, ma anche nel sangue e nelle feci dei pazienti affetti. E' stato recentemente messo a punto un test di tipo ELISA per il dosaggio della forma dimerica dell'isoenzima piruvato chinasi (tumor-M2PK) nelle feci di pazienti affetti da carcinoma gastrointestinale (14-17). Un epitopo della M2PK è, infatti, in grado di rimanere stabile nel materiale fecale a temperatura ambiente per un periodo di tempo superiore a 48 ore e per più di 1 anno a temperature di -20°C , consentendo quindi di superare i limiti dei test precedenti che necessitavano di un campione fecale fresco. La determinazione fecale della forma dimerica della piruvato chinasi di tipo M2 è stata quindi proposta in studi pilota nella diagnostica del CCR con risultati incoraggianti (18-21). Tuttavia, non sono a tutt'oggi disponibili in letteratura ampi studi clinici di confronto tra livelli fecali di M2PK e risultati del FOBT di tipo immunochimico nello screening di popolazione del CCR; inoltre, ancora poco si sa circa la correlazione esistente tra livelli fecali di M2PK e stadio della neoplasia colo-rettale o le dimensioni, le caratteristiche istologiche ed il numero dei polipi adenomatosi riscontrati.

OBIETTIVI

Gli obiettivi primari sono di valutare la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo (VPP) ed il valore predittivo negativo (VPN) della ricerca fecale della piruvato chinasi di tipo 2 (M2PK) nella diagnostica delle lesioni neoplastiche e preneoplastiche del colon rispetto al FOBT di tipo immunochimico, utilizzando come "gold standard" la colonscopia, in una popolazione selezionata di pazienti

afferenti agli ambulatori di Gastroenterologia dei centri partecipanti allo studio (ospedale A.Manzoni , Lecco; Ospedale S.Orsola, Bologna e Ospedale Regina Margherita, Roma)e per i quali è indicata (ed appropriata) l'esecuzione di una coloscopia totale.

LA CALPROTECTINA

Questa è una proteina legante il calcio, concentrata soprattutto nel citosol dei neutrofili. La sua presenza nelle feci è un indice di infiammazione intestinale.

Finora il suo dosaggio è servito in clinica per discriminare i sintomi IBS (sindrome del colon irritabile – livelli basali di calprotectina) dai sintomi IBD (malattia infiammatoria intestinale- morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa – alti livelli di calprotectina)

METODI

PAZIENTI

Criteri d'inclusione:

- ◇ Pazienti di entrambi i sessi di età compresa tra 50 e 80 anni.
- ◇ Pazienti con sintomatologia addominale per i quali sia indicata, dal punto di vista clinico, l'esecuzione di una coloscopia totale a carattere diagnostico.
- ◇ Pazienti con diagnosi radiologica di patologia neoplastica o preneoplastica del colon che debbano essere sottoposti a coloscopia con biopsia confirmatoria della lesione o a polipectomia endoscopica della stessa.
- ◇ Pazienti che abbiano firmato il consenso informato.
- ◇ Pazienti in grado di comprendere la finalità dello studio e di rispondere alle domande del questionario.

Criteri di esclusione

- ◇ Pazienti di entrambi i sessi di età inferiore a 50 anni.

- ◇ Pazienti già sottoposti ad intervento chirurgico/endoscopico per patologia neoplastica del colon ed in follow-up endoscopico post-intervento.
- ◇ Pazienti che abbiano eseguito una coloscopia diagnostica o terapeutica nel corso degli ultimi 3 anni.
- ◇ Pazienti noti portatori di malattie infiammatorie croniche intestinali in follow-up clinicoendoscopico.
- ◇ Pazienti con controindicazioni all'esecuzione di una coloscopia.
- ◇

SOMMINISTRAZIONE TEST FECALI

A tutti i pazienti reclutati nello studio, dopo l'acquisizione del consenso informato e prima di essere sottoposti alla coloscopia, sono stati forniti 2 raccoglitori sterili per le feci (su 1 si effettuano le analisi e il secondo è conservato intatto per eventuali prove di ripetibilità).

I pazienti hanno riconsegnato i campioni fecali entro il giorno successivo quello della raccolta. I campioni sono stati stoccati in frigorifero a -20 C° .

MISURAZIONE DEI TESTS FECALI

SANGUE OCCULTO - METODO IMMUNOCHEMICO (i-FOBT)

Per il test del sangue occulto sono state utilizzate le cuvette "OC autosampling bottle 3" (Eiken Chem, Tokio. Rivenditore Wellkang Tech, London), inviate al Laboratorio Centralizzato dell'ospedale S.Orsola e analizzate con "DIANA oc sensor system" con cut-off di 100ug/ml.

CALPROTECTINA

La calprotectina è stata quantificata con 2 metodi:

test ELISA(Calprotectin Buhlmann ELISA; Buhlmann Laboratories AG, Basel, Switzerland) e test RAPIDO SU CARD (Quantum Blue

Reader – Buhlmann). Dalla stessa estrazione, per il primo è stata fatta una diluizione di 1:50 e per il secondo di 1:16. Per entrambi i test il cut-off è di 50 ug/g.

TUMOR-M2PK

Le concentrazioni del tumor-M2PK fecale sono state determinate usando un test ELISA con due differenti anticorpi monoclonali (ScheBo® • Biotech AG, Giessen, Germany); cut-off di 4 U/ml.

ANALISI DEI RISULTATI ENDOSCOPICI

Le variabili considerate per tutti i pazienti sono state: sesso, età, refertazioni istologiche e endoscopiche e lesioni trovate. Una colonscopia è considerata normale quando non sono stati osservati polipi adenomatosi e/o tumori. Gli adenomi sono stati classificati istologicamente come tubulari, tubulo-villosi (25-70%), villosi o serrati. Sono stati considerati come avanzati gli adenomi con almeno 10 mm di diametro e displasia ad alto grado.

Il cancro è stato definito carcinoma se era stata invasa la sottomucosa. I cancri in situ e intramucosali sono stati classificati come displasie ad alto grado. I tumori sono stati suddivisi in 4 stati, in accordo con la classificazione TNM (tumor node metastasis). Gli adenomi asportati durante la colonscopia, se risultati “trasformati” sono stati classificati come tumori al primo stadio.

ANALISI STATISTICA

La validazione dei tests di screening è stata effettuata mediante la compilazione di una tabella a 4 entrate (variabili singole o combinate), comparate con il gold-standard (colonscopia-istologia).

software: STATA10 per c.i.open epi.

L'analisi statistica per ogni tipo d'esame è stata effettuata 2 volte:

la prima considerando come gruppo “positivo” solo i pz con neoplasia, la seconda considerando come gruppo “positivo” i pz con neoplasia e adenomi ad alto rischio.

RISULTATI

In questa fase della ricerca la popolazione è stata selezionata per ottenere un numero valido di casi Neo, AR, BR. Sono stati arruolati 280 pazienti (157 maschi/123 femmine, età media 67 anni con un range da 50 a 80 anni). Le indicazioni per l’esecuzione dell’esame endoscopico sono riportate in tabella 1.

Indication	No. (%)
Rectal bleeding/Hematochezia	73 (26%)
Abdominal pain	50 (18%)
Change in bowel habits	67 (24%)
Abnormal findings at radiology (barium enema,CT scan)	25 (9%)
Anemia of unknown etiology	42 (15%)
Weight loss	31 (11%)
Other	14 (5%)
Total of indications	302 *

Tabella 1: indicazioni per l’esecuzione della colonscopia.
(*Il totale è superiore a 100 perché molti pazienti avevano più di una indicazione).

RISULTATI ENDOSCOPICI

Il cancro colo-rettale è stato individuato in 47 casi e i polipi adenomatosi in 107 (85 adenomi avanzati e 22 a basso rischio); 126 pazienti sono risultati negativi (assenza di alterazioni, diverticoli e/o polipi molto piccoli). (tab 2)

Esito endoscopia	donne		uomini		Totale	
	n	%	n	%	n	%
negativo	67	54.5	59	37.6	126	45.0
neoplasia	18	14.6	29	18.5	47	16.8
adenoma alto rischio	28	22.8	57	36.6	85	30.4
adenoma basso rischio	10	8.1	12	7.6	22	7.9
Total	123	100.0	157	100.0	280	100.0

Tab2: risultati endoscopici

Le distribuzioni delle concentrazioni di calprotectina e tumor-M2PK nei sottogruppi diagnostici (cancro-adenomi-normale) sono mostrati in fig 1 e tab 2.

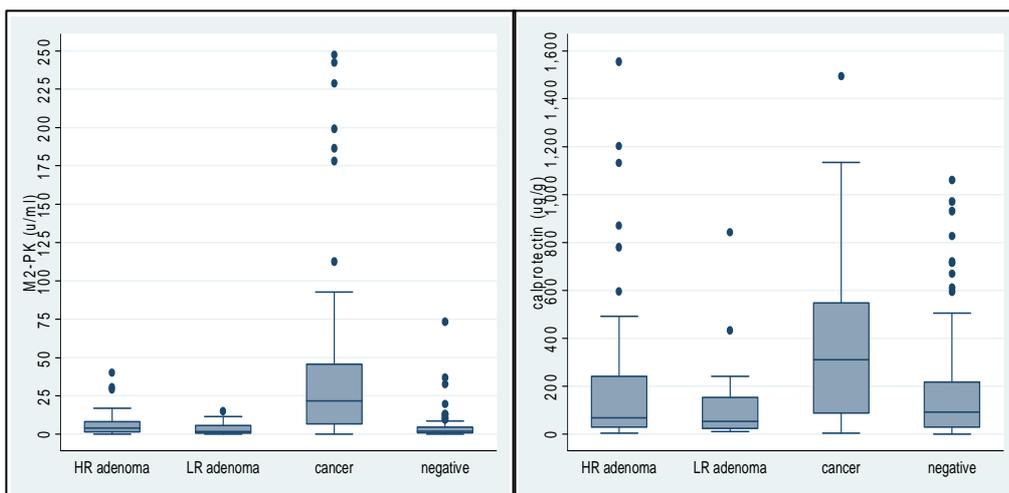


Fig.1

Calprotectin (ug/g)				
	negative	LR adenoma	HR adenoma	cancer
mean	175.47	132.27	190.87	557.88
st.dev.	222.68	197.27	292.66	859.94
smallest	0.73	10.48	3.86	3.81
largest	1061.53	842.36	1554.86	5191.42
1 percentile	0.86	10.48	3.86	3.82
5 percentile	4.09	11.03	5.26	5.26
10 percentile	7.50	14.16	8.45	11.16
25 percentile	26.86	23.011	28.04	92.33
50 percentile	92.58	54.21	68.96	353.57
75 percentile	218.73	153.40	240.87	618.53
90 percentile	461.78	337.61	433.33	1132.10
95 percentile	714.02	637.87	870.71	1494.10
99 percentile	970.44	842.36	1554.86	5191.42

M2-PK (u/ml)				
	negative	LR adenoma	HR adenoma	cancer
mean	4.16	3.51	5.99	47.60
st.dev.	8.04	3.93	6.85	68.73
smallest	0	0.13	0	0.21
largest	73.24	14.78	39.96	247.39
1 percentile	0.10	0.13	0	0.21
5 percentile	0.21	0.41	0.04	1.00
10 percentile	0.42	0.53	0.29	1.23
25 percentile	0.89	0.74	1.51	6.55
50 percentile	2.06	1.74	3.96	21.64
75 percentile	4.44	5.46	8.07	45.65
90 percentile	8.29	7.88	12.31	186.58
95 percentile	12.80	11.48	16.47	228.68

Fig 1 e Tab 2. distribuzioni delle concentrazioni di calprotectina (ug/g) e tumor-M2PK (U/ml) nei diversi sotto-gruppi diagnostici.

In tutti i test l'adenoma ad alto rischio crea una "zona grigia" con dispersione dei dati. In ogni caso i risultati tendono a un miglioramento se si include l'AR nel gruppo dei negativi, nel caso contrario, tende ad aumentare solo il valore predittivo positivo (poiché una frazione maggiore dei positivi al test viene considerato come "vero positivo").

Nei casi di carcinoma colo-rettale, le concentrazioni di M2PK fecale correlano con la classificazione di "Dukes": la concentrazione fecale media dell'M2PK è di 26.8U/ml (1.1 – 112.6) negli stadi I e II, 35.3 U/ml (1.2-199.3) nello stadio III e 100.1 U/ml (30.5 – 274.4) nello stadio IV. Nelle tabelle 3 e 4 sono mostrati sensibilità, specificità,

valore predittivo positivo e negativo per tutti i 3 tests.(cut-off: 100ug/gfobt, 4u/mlm2pk, 50ug/gcalp).

	fobt	M2pk	Calp	Fobt+calp*	Fobt+m2pk*	Calp+m2pk*	Tripletta*
Sens %	61.7	87.23	85.71	90.91	91.49	95.74	95.74
Spec%	88.84	62.66	39.71	35.89	57.08	26.39	24.07
Vpp%	52.73	32.03	22.22	22.99	30.07	22.06	21.53
Vpn%	92	96.05	93.26	94.94	97.08	96.61	96.3
Acc%	84.29	66.49	47.41	45.45	62.86	38.78	36.88

Table 3. caratteristiche dei 3 test nell'individuazione del carcinoma coloretale (considerando come gruppo positivo solo i CCR)

	fobt	M2pk	Calp	Fobt+calp*	Fobt+m2pk*	Calp+m2pk*	Tripletta*
Sens %	35.61	62.88	67.54	75.86	71.21	82.75	86.07
Spec %	94.59	69.59	37.96	37.23	66.89	26.95	26.24
Vpp%	85.45	68.84	47.53	50.57	65.73	49.51	50.24
Vpn%	62.22	97.76	58.43	64.56	72.26	64.41	68.52
Acc%	66.79	66.43	51.39	54.94	68.93	52.85	53.99

Tab 4. caratteristiche dei 3 test nell'individuazione dei carcinomi coloretali ad adenomi ad alto rischio.(* almeno 2 test positivo).

Considerando solo la diagnosi del CCR, il FOBT ha la più alta specificità (88.8%) e PPV (52.7%); il tumor-M2PK è risultato il test

con la migliore sensibilità (87.2%) e NPV (96.1%). La calprotectina ha mostrato performance simili al tumor-M2PK per quanto riguarda il NPV (91.8%), ma decisamente peggiori in termini di specificità e PPV (81.8% e 22.2%).

Dividendo la popolazione per età (>70 anni) e sesso, non si sono riscontrate differenze dai risultati ottenuti per la popolazione totale. Solo nel caso della calprotectina c'è una forte diminuzione della specificità nei pazienti over 70 anni, ciò potrebbe significare che negli anziani è presente uno stato infiammatorio, anche in assenza di ccr.

Per quanto osservato, la miglior combinazione di tests per predire nei nostri pazienti sintomatici il rischio di cancro; e quindi stabilire una priorità per gli esami endoscopici, risulta essere i-FOBT più tumor M2PK (tab 5).

	N° pazienti	N° CCR	PPV
Priorità1 +/+	40	27	67.5%
Priorità 2 +/- -/+	103	16	15.53%
Priorità3 -/-	137	4	2.92%
totale	280	47	

	N° pazienti	N° CCR+AR	PPV
Priorità1 +/+	40	36	90%
Priorità 2 +/- -/+	103	58	56.31%
Priorità3 -/-	137	38	27.74%
totale	280	132	

Tab 5: schema per la priorità d'accesso alla colonscopia, in relazione alla probabilità di cancro o di cancro + adenoma avanzato, valutata con la combinazione dei tests fecali i-FOBT e tumor-M2PK.

I pazienti con entrambi i tests fecali positivi hanno il 67.5% delle probabilità di avere un cancro. Nei pazienti risultati negativi a entrambi i tests, la probabilità di trovare un cancro è del 2.9%. I pazienti con risultati discordanti presentano un rischio di cancro del 15.5%.

DISCUSSIONE

In questo studio è stata testata una combinazione di tests fecali: tumor-M2PK, calprotectina, i-FOBT effettuati da un singolo campione fecale. Lo scopo è di capire se possano migliorare la diagnosi del CCR e degli adenomi ad alto rischio nella routine ambulatoriale. Il test M2PK mostra nell'insieme una sensibilità superiore al test calprotectina e i-FOBT.

Il test M2PK (cut-off 4 U/ml) ha una sensibilità del 87% per i CCR, superiore alla sensibilità sia dell'i-FOBT che della calprotectina, che sono rispettivamente 62% e 85%, in tutti i casi la sensibilità diminuisce se consideriamo come gruppo positivo i CCR insieme agli AR. Questi dati sono in linea con una serie di studi prospettici di recente pubblicazione, che riportano un range di sensibilità dal 73 al 81% (19, 21, 22, 23, 24)

Osservando l'andamento della sensibilità in base agli stadi tumorali, si rileva che ci sono solo lievi differenze tra gli stadi I-IV, sebbene con i tumori allo stadio IV si ottenga una sensibilità più alta. In questo studio il numero di casi per ogni stadio tumorale è limitato, perciò sarà utile analizzare sempre più casi per fare delle stime più precise.

La specificità del test tumor-M2PK riguardo i CCR (identificazione soggetti che non hanno il CCR, ma non è escluso che abbiano adenomi) è del 63%. Questo dato è superiore al test calprotectina che è del 40%, ma inferiore a quello dell' i-FOBT, che è del 89%

Si può migliorare l'accuratezza dei tests combinandoli con altri markers. Infatti combinando i test i-FOBT e tumor-M2PK si ottiene

una migliore accuratezza diagnostica per il CCR, con un PPV del 67% nei casi in cui entrambi i test siano positivi.

Basandoci su questi risultati potremmo selezionare l'accesso alla colonscopia, in pazienti per i quali questo esame venga richiesto, in differenti livelli di priorità. Saranno quindi sottoposti per primi all'esame i pazienti con entrambi i test positivi (probabilità del 67.5% di trovare un cancro), andranno invece in fondo alla lista d'attesa quelli con entrambi i test negativi (probabilità di trovare un cancro del 2.9%), mentre i pazienti con test discordanti avranno un medio livello di priorità (prob di cancro del 15.5%).

Questa "griglia" sarebbe molto utile nel management delle liste d'attesa per le PCS nelle unità operative di gastroenterologia.

Un altro aspetto da considerare è il potenziale ruolo di questi markers fecali nella diagnosi degli adenomi, soprattutto le forme avanzate, che sono ad alto rischio di trasformazione neoplastica.

Per l'individuazione dei cancri più gli adenomi ad alto rischio, il test M2PK da solo ha una sensibilità del 63% e una specificità del 70%. Effettuandolo insieme all'i-FOBT, se consideriamo come "positivi" i casi con almeno 1 dei due test positivi, si ha una sensibilità del 71% e una specificità del 67%.

Il fatto che i livelli di M2PK non siano marcatamente aumentati negli adenomi avanzati è coerente con un andamento stadio-dipendente delle performance di questo test: tutti gli studi pertinenti riportano una sensibilità maggiore nei CCR avanzati rispetto ai CR meno avanzati. (21, 23, 24). Ciò suggerisce che nella fase precancerosa non si raggiunga lo stadio critico della neoplasia che porta ad un aumento dei livelli della tumor-M2PK fecale.

Una spiegazione plausibile potrebbe essere il fatto che negli stadi precoci il tumore è ancora molto piccolo e le cellule neoplastiche vengono raggiunte da ossigeno e nutrienti, cosicché non shiftano la M2PK nella forma dimerica.

E' interessante approfondire le conseguenze della creazione del "panel" con i test tumor-M2PK e i-FOBT.

Su 103 casi discordanti, 88 sono composti da i-FOBT negativi/M2PK positivi, la situazione opposta conta 15 casi

Il primo è composto da 36 negativi, 5 BR, 33 AR e 14 neoplasie.

Quindi se avessimo testato solo il FOBT, avremmo effettuato di fatto 88 colonscopie in meno, ma avremmo "perso" 33 AR e soprattutto 14 CCR.

Nel secondo caso, i 15 pazienti con FOBT positivo/M2PK negativo comprendono 3 negativi, 1 BR, 9 AR e solo 2 CCR.

Quindi è importante specificare che il nostro obiettivo non è tanto di diminuire il numero di esami endoscopici, ma di creare uno "score" per dilazionare gli esami nel tempo. Se non avessimo considerato il test M2PK, non avremmo individuato ben 14 cancri e 33 adenomi ad alto rischio.

In conclusione, la combinazione di 2 semplici tests potrebbe costituire un ottimo strumento per diagnosticare il più alto numero possibile di casi di AR e CCR, dando anche la giusta priorità ai pazienti per i quali è richiesto l'esame endoscopico, poiché ci permette la classificazione in differenti gruppi di rischio.

BIBIOGRAFIA 1

- 1) Zentilin P., Seriole B., Dulbecco P et al.: Eradication of *Helicobacter pylori* may reduce disease severity in rheumatoid arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1291-9.
- 2) Gunn M., Stephens J., Thompson J., Rathbone B., Samani N.: Significant association of CagA positive *Helicobacter pylori* strains with risk of premature myocardial infarction. *Heart* 2000; 84: 267-71.
- 3) NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 1994; 272: 65-9.
- 4) Posteraro P., Branca G., Sanguinetti M., Ranno S., Cammarota G., Rahimi S., De Carlo M., Posteraro B., Fadda G.: Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturino HPLC assay. *JAC* 2006; 57: 71-8.
- 5) Mengraud F.: *H.pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84
- 6) Owen R.J.: Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002; 50: 285-8.
- 7) van Doorn L.J., Glupczynski Y., Kusters J.G. et al. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1500-4.
- 8) Versalovic J., Osato M.S., Spakovsky K. et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 283-6.
- 9) Gerrits M.M.: Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *The Netherlands: Erasmus MC, 2004*.
- 10) Mégraud F.: *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. *Gut* 2004;53:1374-84.

- 11) Megraud F.: A growing demand for *Helicobacter pylori* culture in the near future. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29: 574–6.
- 12) Mégraud F.: Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:305–9.
- 13) Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Megraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut* 1999;44: 463–7.
- 14) van Doorn L.J., Debets-Ossenkopp Y.J., Marais A., Sanna R., Megraud F., Kusters J.G., Quint W.G.: Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1779–82.
- 15) van Doorn L.J., Glupczynski Y., Kusters J.G., Megraud F., Midolo P., Maggi-Solca N., Queiroz D.M., Nouhan N., Stet E., Quint W.G.: Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1500–4.
- 16) Trebesius K., Panthel K., Strobel S., Vogt K., Faller G., Kirchner T., Kist M., Heesemann J., Haas R.: Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 2000;46:608– 14.
- 17) Simala-Grant J.L., Taylor D.E.: Molecular biology methods for characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS* 2004; 112: 886-97.
- 18) Oleastro M, Menard A, Santos A, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to

clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 397–402.

19) Soltermann A, Perren A, Schmid S, et al. Assessment of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance mutations in archival gastric biopsy samples. *Swiss Med Wkly* 2005; 135: 327–32.

20) Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, et al. Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with result of urea breath test and histological grading. *J Med Microbiol* 2002; 51: 305–11.

21) Sanger F, Nickel S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463–7.

22) Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3761–6.

23) Wada T, Maeda S, Tamaru A, et al. Dual-probe assay for rapid detection of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5277–85.

24) Lascols C, Lamarque D, Costa JM, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4573–7.

25) De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med* 2006;144:94–100)

BIBLIOGRAFIA 2

- 1) Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.
- 2) Grande E, Inghelmann R, Francisci S, Verdecchia A, Micheli A, Baili P et al. Regional estimates of colorectal cancer burden in Italy. *Tumori* 2007;93:352-9.
- 3) Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data. *Lancet Oncology* 2007;8:784-796.
- 4) Ransohoff DF Colon cancer screening in 2005: status and challenges. *Gastroenterology* 2005;128:1685-95.
- 5) Mandel JS, Bond JH, Church TR et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for faecal occult blood. *N Engl J Med* 1993;328:1365-71.
- 6) Kewenter J, Brevinge H, Engaras B, Haglind E, Ahren C Results of screening, rescreening, and follow-up in a prospective randomized study for detection of colorectal cancer by faecal occult blood testing. Results for 68,308 subjects. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:468-73.
- 7) Kromborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sandergaard O Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal occult blood test. *Lancet* 1996;348:1467-71.
- 8) Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MHE et al. Randomised controlled trial of faecal occult blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-77.
- 9) West NJ, Boustiere C, Fischbach W, Parente F, Leicester R Colorectal cancer screening in Europe – Differences in approach, similar barriers to overcome. *BMJ submitted*.

- 10) Parente F, Marino B, Armellino A et al. Mass screening of colorectal cancer with an immunochemical faecal occult blood test in Italy. Preliminary results in a pilot province. *Gut* 2007;56(suppl.II):A25.
- 11) Allison J, Tekawa I, Ransom L. A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening. *New England Journal of Medicine*. 1996;334:155-159.
- 12) Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumour therapy. *J Bioenerg Biomembr*. 1997;29:315-330.
- 13) Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV- 16E7. *Oncogene*. 2001;20:6891-6898.
- 14) Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer H. Tumour M2-pyruvate kinase: a promising tumour marker in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*. 2000;20:4965-4968.
- 15) Schulze G. The Tumor Marker M2-PK: An application in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*. 2000;20:4961-4964.
- 16) Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang GB, Shen P. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J Gastroenterol*. 2004;10(11):1643-6.
- 17) Hardt PD, Toepler M, Ngoumou B, Rupp J, Kloer HU. Measurement of faecal pyruvate kinase type M2 (Tumour M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls. *Anticancer Res*. 2003;23:851-854.
- 18) Hardt P, Mazurek S, Toepler M, et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004:1-5.

- 19) Vogel T, Driemel C, Hauser A, et al. Comparison of different stool tests for the detection of cancer of the colon. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005;130(14):872-7.
- 20) Shastri Y, Naumann M, Oremek G, et al. Prospective multicenter evaluation of fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) as a screening biomarker for colorectal neoplasia. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2651-6.
- 21) Haug U, Rothenbacher D, Wente M, Seiler C, Stegmaier C, Brenner H. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: Comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2007;96(9):1329-34.
- 22) Shastri YM, Loitsch S, Hoepffner N, Povse N, Hanisch E, Rosch W et al. Comparison of an established simple office-based immunological FOBT with fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) for colorectal cancer screening: prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1496-1504.
- 23) Tonus C, Neupert G, Sellinger M Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumour M2-PK. *World J Gastroenterol* 2006;12:7007-7011
- 24) Hardt P, Mazurek S, Toepler M et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004:980-984.