

Università degli Studi di Bologna

Dottorato di Ricerca in Biochimica

Coordinatore: Prof. Giorgio Lenaz

XIX Ciclo

*Polimorfismo Genetico ed
Infezione da Helicobacter Pylori*

Tesi di Dottorato del:

Dr. Federico Perna

Relatore: Chiar.mo

Prof. Dino Vaira

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/10

Anno 2007

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	<i>pag. 3</i>
<i>HELICOBACTER PYLORI: epidemiologia</i>	<i>pag.4</i>
<i>PATOGENESI</i>	<i>pag.10</i>
<i>DIAGNOSI</i>	<i>pag 21</i>
<i>TERAPIA</i>	<i>pag.30</i>
<i>CITOCROMO P450 2c19 e 3A4</i>	<i>pag.34</i>
<i>SCOPO</i>	<i>pag.36</i>
<i>POPOLAZIONE E METODI</i>	<i>pag.37</i>
<i>RISULTATI</i>	<i>pag.41</i>
<i>DISCUSSIONE</i>	<i>pag.42</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>pag.47</i>

INTRODUZIONE

La scoperta dell'*Helicobacter pylori* (*H pylori*) è avvenuta casualmente. Sebbene Bizzozzero ed altri, già nel XIX secolo, avessero riportato la presenza di alcuni organismi nello stomaco umano ed animale, nessuno era mai riuscito ad isolarli. Così è stato necessario aspettare quasi due secoli e le vacanze pasquali di due medici australiani, Robin J. Warren and Barry J. Marshall (dimenticarono piastre seminate con biopsie gastriche all'interno della stufa durante quel periodo) per avere la dimostrazione microbiologica dell'esistenza di batteri all'interno dello stomaco. Attualmente, dopo poco più di venti anni di intensi studi, disponiamo di due sequenze (due ceppi diversi) del suo genoma e conosciamo diverse funzioni dei suoi geni, ma, soprattutto, sappiamo quali sono le implicazioni cliniche di questa infezione(1). La malattia peptica non è più una patologia psicosomatica o da stress, ad eziopatogenesi sconosciuta, ma è, in più del 90% dei casi, dovuta all'infezione da *H pylori* e si cura come tale, ovvero con un semplice ciclo di antibiotici. L'*H pylori* è anche la causa principale di gastrite istologica ed è associato in maniera significativa con il cancro gastrico tanto da ottenere, da parte dell'Associazione Mondiale della Sanità (WHO), la denominazione di carcinogeno di classe I. Questo batterio ha inoltre un ruolo importante nei MALTomi a basso grado dello stomaco (regressione dopo l'eradicazione variabile dal 40% al 70%) e sono anche state studiate possibili associazioni con manifestazioni extra-intestinali quali patologie cardiovascolari, emicrania o fenomeno di Raynaud. Risulta quindi chiaro che questo microrganismo non è importante solo per gli addetti ai lavori (i gastroenterologi) ma anche, e forse soprattutto, per i medici di base. Nel Settembre del 2000 a Maastricht si sono riuniti per la seconda volta i maggiori esperti mondiali per redigere una *consensus* sull'*H pylori*. Lo scopo era quello di creare non solo una omogeneità nel management dell'infezione (dalla diagnosi alla terapia) ma anche quello di fare un "up to date" su quelle che sono le più attuali conoscenze (alla luce delle quali sono state stilate le linee guida) e, indirettamente, stimolare la ricerca partendo da problemi clinici reali. E proprio alla

luce di Maastricht, abbiamo voluto esporre in questa breve review, l'attuale "knowhow" sull'*H pylori* in termini di epidemiologia, fisiopatologia, diagnosi e terapia, cercando di guardare i diversi capitoli di questo affascinante argomento sempre con una particolare attenzione diretta verso gli aspetti clinici, ovvero verso quei problemi che più frequentemente possono rivelarsi nel rapporto diretto col paziente infetto.

HELICOBACTER PYLORI: epidemiologia

Sebbene la scoperta dell'*Helicobacter pylori* (*H pylori*) sia avvenuta quasi venti anni fa, rimane ancora largamente sconosciuta la sua modalità di trasmissione. Le informazioni maggiori derivano dagli studi epidemiologici che evidenziano alcune possibili fonti di infezione, suggeriscono vie di trasmissione ed allo stesso tempo individuano fattori di rischio associati al contagio. Qualunque sia la modalità con cui l'*H pylori* sia giunto nello stomaco dell'uomo, ora è un'infezione molto comune, seconda solo alla malattia periodontale in termini di prevalenza.

H pylori: da dove viene

E' stato suggerito che il genere *Helicobacter* abbia colonizzato l'epitelio acido-secreto per millenni e che il microrganismo e l'ospite abbiano raggiunto un adattamento in cui solo un grado di infiammazione è tollerato, anche se vi è chi sostiene che il batterio sia stato solo recentemente acquisito dal genere umano. Infatti, un interessante studio della microflora intestinale effettuato sull'uomo di Otz (e' la mummia trovata qualche anno fa in trentino, perfettamente conservata) non ha rilevato la presenza di *H pylori* nello stomaco. La distribuzione geografica dei diversi alleli delle citotossine del batterio mostra pattern differenti a seconda delle diverse aree considerate (Europa, Estremo Oriente, Nord e Sud America). La predominanza degli stessi alleli nella penisola Iberica e in Sud America potrebbe essere compatibile con la ben nota migrazione di persone dal Sud Europa al Sud America ed è stato suggerito che l'*H pylori* sia stato introdotto in queste regioni solo circa 500 anni fa. Altri studi hanno comunque indicato la presenza dell'*Helicobacter* in resti umani

dell'epoca pre-Colombiana. L'*H pylori* è comunque uno degli organismi geneticamente più diversi attualmente noti: sarebbe possibile dire che ogni individuo infettato porta fondamentalmente un unico ceppo. Il genoma infatti ha una struttura panmimica, in contrasto con la maggior parte degli altri patogeni umani che hanno una struttura clonale. Tale tipo di struttura genomica indica che all'interno del genere *Helicobacter* è avvenuta un'estesa ricombinazione. Vi sono infatti regioni del genoma con divergente rapporto Guanina/Citosina come l'isola di patogenicità (PAI) e la regione plastica, indicanti un probabile transfer orizzontale da un altro genoma.

H pylori e fattori socio-economici

La prevalenza dell'infezione è bassa nei paesi industrializzati e tende ad aumentare con l'età mentre è invece alta nei paesi in via di sviluppo senza un aumento età relata. La spiegazione dell'aumento con l'età nei paesi industrializzati è da ricercarsi in un effetto coorte. Infatti la maggiore prevalenza si ha in soggetti d'età superiore ai 60 anni, i quali hanno contratto l'infezione nell'infanzia mentre una minore prevalenza si ha nei gruppi di età più giovane riflettendo probabilmente un miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie negli ultimi decenni. Diversi studi sierologici che hanno dimostrato che il basso stato socio-economico è inversamente correlato con la prevalenza dell'infezione. Le condizioni di vita della popolazione infantile, l'educazione, il luogo di residenza (urbano piuttosto che rurale), il reddito mensile, la densità della popolazione, il sovraffollamento all'interno delle abitazioni sono tutti fattori significativamente correlati con l'infezione. Ad esempio sia in uno studio condotto a Glasgow su 1600 individui, che in uno studio condotto negli USA su più di 1000 soggetti, è stata evidenziata una correlazione tra colonizzazione ed età, sovraffollamento familiare e residenza urbana. Un altro fattore correlato con una maggiore prevalenza dell'infezione sembra essere la carenza di un rifornimento idrico all'interno delle abitazioni, cosicché, il miglioramento di tutti questi elementi avvenuto negli ultimi anni, avvalorati da dati molto recenti che mostrano la prevalenza dell'infezione in calo sia nei Paesi Occidentali che in quelli dell'Estremo Oriente. Esiste inoltre una chiara correlazione fra origine etnica della

popolazione testata e prevalenza dell'infezione. In uno studio condotto in America, la prevalenza dell'infezione tra gli americani nativi (20-29 anni), paragonati agli immigrati cinesi, messicani ed indiani risultava essere rispettivamente del 21%, 67% 33% e 46%. Il diverso assetto genomico delle popolazioni, e quindi differente pattern HLA, viene ad incidere in maniera significativa probabilmente influenzando la capacità del batterio di legarsi agli appropriati recettori nello stomaco.

Vie di trasmissione

La trasmissione dell'*H pylori* sembra avvenire principalmente fra i membri di uno stesso nucleo familiare, ed in particolare dai genitori ai figli e non *viceversa*. Diversi studi suggeriscono che l'acquisizione dell'infezione avviene prevalentemente nell'infanzia e che la prevalenza nei genitori tende ad essere maggiore rispetto a quella nei bambini. Inoltre il basso rischio di reinfezione dopo l'eradicazione del batterio negli adulti e nei bambini con età superiore ai 5 anni rispetto a quelli con età inferiore a 5 anni, suggerisce che la prima infanzia possa essere un periodo critico per l'acquisizione dell'infezione. Appare comunque improbabile che l'infezione avvenga durante il primo anno di vita, o almeno nei paesi industrializzati anche se le madri hanno l'infezione da *H pylori*. Il periodo nel quale la trasmissione può avvenire sembra quindi essere quello fra il secondo e il 5 anno di vita. Inoltre diversi lavori suggeriscono una relazione fra l'ordine di nascita dei fratelli e la loro possibilità di essere *H pylori* positivi, essendo i fratelli maggiori più a rischio di contrarre l'infezione rispetto a quelli minori(2) .

Trasmissione gastro-oro-orale

Numerosi sono stati i tentativi di isolare l'*H pylori* dalla saliva o dalla placca dentale, anche se positivi solo in una piccola percentuale di casi ed il più delle volte mediante polymerase chain reaction (PCR). Il batterio è stato ritrovato anche in campioni salivari mediante tecniche di immunofluorescenza con anticorpi monoclonali. Evidenze epidemiologiche suggeriscono che la

placca possa essere un importante reservoir, ed in uno studio su 217 soggetti, la colonizzazione del batterio era correlata con un alto score nella placca. In un altro studio, la presenza dell'*H pylori* nella placca dentale, ricercata mediante PCR, era correlata alla presenza del batterio nello stomaco nel 64% dei casi. Il ritrovamento dell'*H pylori* nella placca dentale potrebbe dipendere dal livello di igiene orale, dalla popolazione studiata e dalla presenza di reflusso gastrico. Quest'ultima condizione potrebbe determinare una colonizzazione orale di tipo intermittente, dipendente dall'entità del reflusso, e rendere conto quindi della bassa frequenza di isolamento. Questa modalità sottolinea inoltre l'importante ruolo delle secrezioni gastriche come veicolo di trasmissione dell'infezione. Diversi studi hanno rilevato la presenza di *H pylori* nel succo gastrico suggerendo l'ipotesi che il reflusso gastro-esofageo ed il vomito possano essere il veicolo di trasmissione e che la colonizzazione orale possa solo essere episodica. L'importanza della cavità orale come sorgente di infezione è inoltre legata a fattori socio-economici, Nei paesi in via di sviluppo è stata riscontrata un'alta prevalenza di Helicobacter nella placca dentale, sia mediante coltura che PCR. A favore della trasmissione oro-orale, almeno nei paesi in via di sviluppo, vi è inoltre il ritrovamento del batterio sotto le unghie della mano dominante nei soggetti infetti.

La via fecale e la sorgente ambientale

La trasmissione dell'infezione potrebbe avvenire anche attraverso la via oro-fecale. Topi inoculati con *H pylori*, messi a contatto con topi non inoculati in gabbie che consentivano o meno la coprofagia, hanno dimostrato che benché l'*H pylori* non sia stato isolato dalle feci di alcun topo, solo i topi posti nelle gabbie che non impedivano la coprofagia divenivano infetti, supportando la possibilità di questa via di trasmissione. La letteratura riporta evidenze sieroepidemiologiche sia pro che contro questa via di trasmissione, come dimostrato in studi che paragonavano la sieroprevalenza dell'*H pylori* con quella di patogeni per i quali è nota la trasmissione oro-fecale, (ad esempio l'epatite A). In uno studio su 434 membri di uno staff ospedaliero vi era una stretta correlazione tra la sieroprevalenza di entrambi gli organismi (*H pylori* e HAV). Al contrario, in un altro lavoro

effettuato su 466 soggetti analizzati per entrambi gli organismi, vi era una scarsa correlazione con la sieropositività. Anche l'acqua, se contaminata da scarichi reflui, può essere un determinante fattore per questa via di trasmissione. In uno studio condotto in Perù, l'analisi di 48 campioni di acqua potabile mediante PCR ha riscontrato la presenza dell'*H pylori* in 24 di essi, suggerendo un suo ruolo potenzialmente importante nella trasmissione dell'infezione. Ulteriori evidenze che l'acqua possa essere positivamente associata all'infezione in Sud America, provengono dall'associazione tra sieroprevalenza per *H pylori* ed consumo di vegetali crudi, probabilmente irrigati con acqua contaminata da quelle di scolo. Il consumo di vegetali in sé però non è un fattore di rischio, come emerge da due studi sieroepidemiologici, uno inglese e l'altro americano, che non mostrano differenze nella sieroprevalenza tra vegetariani e non. Un'evidenza circostanziale che il cibo contaminato da materiale fecale possa costituire una sorgente di infezione è la sopravvivenza del batterio in cibo contaminato artificialmente (pollo e latte). Nel latte contaminato artificialmente, l'*H pylori* può sopravvivere per più di 6 giorni a 4°C e 3-4 giorni a temperatura ambiente. Quando posto in sospensione salina o in brodo di pollo, l'*H pylori* sopravvive 2 giorni a temperatura ambiente e 3 giorni se refrigerato, mentre a -20°C sopravvive almeno 4 settimane. È stata investigata anche la sopravvivenza su superfici di legno, plastica e ceramica: il batterio rimane vitale per soli 30-90 minuti, raggiungendo le 3 ore solo se la superficie veniva raffreddata.

Cibo di origine animale e animali domestici: possibile reservoir di infezione?

La prima ipotesi che gli animali potessero essere una sorgente di infezione per l'uomo venne formulata in studi di sieroprevalenza condotti su categorie di lavoratori strettamente a contatto con gli animali, quali i veterinari e operai dei mattatoi(3). La più elevata sieroprevalenza in queste categorie fu però spiegata come risultato di una cross reazione nei test sierologici con *Helicobacter* di origine animale, dato l'aumentato numero di specie animali risultate colonizzate da una varietà di nuove specie di *Helicobacter*. Altre evidenze contro gli animali come serbatoio per l'infezione da *H pylori* derivano dalla difficoltà di colonizzare sperimentalmente il tratto gastrointestinale di animali

ed è pertanto improbabile che l'infezione si realizzi naturalmente. L'isolamento dell'*H pylori* dagli animali non è semplice: il batterio comunque è stato isolato in coltura dalla scimmia Rhesus, ove si presenta apparentemente come un'infezione naturale. Occasionalmente è stato isolato nel maiale, ma questa viene considerata un'antroposi e, pertanto, non rilevante per la trasmissione all'uomo. L'*H pylori* è stato isolato nel latte di pecora in Sardegna ed in Colombia, ed in entrambe le regioni le persone a contatto con le pecore avevano una sieroprevalenza molto più elevata rispetto ad un'adeguata popolazione di controllo. Questi dati hanno rafforzato l'ipotesi che l'*H pylori* sia stato inizialmente trasmesso all'*Homo sapiens* con l'addomesticamento degli animali circa 10.000 anni fa. In aggiunta, è improbabile che gli animali domestici siano una sorgente di infezione, poiché diversi studi non hanno mostrato alcuna significatività né correlazione tra il possesso di animali domestici e la malattia ulcerosa peptica. Vi sono invece evidenze convincenti che l'*H heilmanii* sia una zoonosi e che l'infezione possa essere acquisita dai cani. In uno studio sierologico su 125 individui con infezione dimostrata da *H heilmanii*, il 70% avevano contatti con animali domestici rispetto al 37% della popolazione di controllo.

Esposizione occupazionale

Questa via di trasmissione si potrebbe realizzare sia nei pazienti che nei membri dello staff attraverso due vie: materiale non adeguatamente decontaminato e/o secrezioni infette. L'evidenza che un endoscopio potrebbe essere un veicolo di trasmissione tra pazienti deriva dal ritrovamento del batterio (isolato sia mediante coltura che PCR) da campioni di lavaggio del canale di aspirazione-biopsia, nonostante questo fosse stato lavato manualmente. In un altro studio, 5 su 60 pazienti hanno mostrato sierconversione dopo essere stati sottoposti ad endoscopia, ed in un altro lavoro il 61% dei pazienti endoscopizzati era contaminato dal batterio dopo un endoscopia effettuata su pazienti *H pylori* positivi. Per eliminare questa potenziale, benché numericamente inferiore, via di trasmissione è necessaria una stretta osservanza delle procedure di decontaminazione degli endoscopi. In Australia è stato condotto uno studio per valutare la sier-

prevalenza dell'infezione nei gastroenterologi e nelle infermiere degli ambulatori di gastroenterologia rispetto al personale medico e paramedico non addetto ai servizi di endoscopia digestiva ed alla popolazione non medica. Il tasso di prevalenza era del 69% per i gastroenterologi rispetto al 40% della restante popolazione medica. Le infermiere degli ambulatori di gastroenterologia mostravano una prevalenza del 19%, contro il 17% delle infermiere di altri reparti. Questo studio concluse che una trasmissione occupazionale poteva realizzarsi dai pazienti ai gastroenterologi. Gli odontoiatri sembrano invece non essere a rischio di contagio in quanto le misure precauzionali adottate interrompono qualunque potenziale trasmissione dalle secrezioni orali.

PATOGENESI

La scoperta dell'*Helicobacter pylori* (*H pylori*) ha totalmente modificato l'approccio patogenico alla patologia gastroduodenale. Le sequenze fisio-patologiche che si determinano in seguito all'infezione di questo microrganismo variano a seconda della sensibilità individuale, del genoma batterico e dei fattori ambientali.

FATTORI DI VIRULENZA

Motilità e adesione batterica

Lo strato mucoso che permette allo stomaco di non essere attaccato dal pH acido fisiologicamente presente, viene penetrato dall'*H Pylori* grazie ai flagelli unipolari (da 1 a 5) che il microrganismo possiede, e alla sua azione mucolitica. I flagelli conferiscono motilità al batterio, caratteristica essenziale per la colonizzazione: infatti i mutanti aflagellati non presentano patogenicità. La motilità consente al microrganismo di resistere allo svuotamento gastrico e di insinuarsi fino alle cellule epiteliale sottostanti. Una volta penetrato lo strato di muco, l'*H pylori* aderisce all'epitelio gastrico (anche se ectopico ad es. metaplasia gastrica in duodeno). Il legame con queste cellule è dovuto ad adesine specifiche come quelle per gangliosidi di tipo GM1 e GM2 o per l'N-

acetilneuraminilactosio (N-ANL). Nei casi di gravi gastriti si può avere la colonizzazione degli interstizi giunzionali fra le cellule mucipare o della lamina propria ma è raro trovare l'*H pylori* all'interno delle cellule gastriche. Una volta adeso all'epitelio, il microrganismo libera cataboliti e sostanze citotossiche in prossimità delle cellule gastriche innescando la risposta infiammatoria. Alcune proteine del core oligosaccaridico batterico sono immunologicamente simili agli antigeni x e y di Lewis. Questa omologia se da un lato permette un mimetismo nei confronti del sistema immunitario dell'ospite, dall'altro, può innescare una reazione autoimmunitaria verso gli antigeni self, ed in particolare, nei confronti delle catene beta della ATPasi K^+/H^+ gastrica ricca di tali epitopi. Questo meccanismo potrebbe essere coinvolto nel determinare l'insorgenza di atrofia gastrica e conseguente ipocloridria.

Attività Ureasica

La resistenza dell'*H pylori* a condizioni del tutto inospitali per la maggior parte dei batteri, quali quelle presenti nello stomaco, è dovuta alla presenza di un'enzima: l'ureasi. L'enzima è in grado di idrolizzare l'urea in ammoniaca e CO_2 . Fino a pochi anni fa non era conosciuto l'esatto meccanismo della sua azione: ora sappiamo che l'attività ureasica è fundamentalmente concentrata all'interno del citoplasma batterico. Quando vi è una diminuzione del pH intragastrico, una proteina codificata dal gene *UreI* presenta sulla membrana che separa lo spazio citoplasmatico da quello periplasmatico, determina un maggior ingresso di urea all'interno del citoplasma. L' NH_3 prodotta è quindi trasferita nel periplasma batterico e all'esterno della membrana batterica con formazione di ioni ammonio. Quando invece il pH intragastrico aumenta (come durante la fase digestiva), la proteina codificata dal gene *UreI* determina una riduzione dell'ingresso di urea nel citoplasma di circa 300 volte, evitando che vi sia una produzione eccessiva di valenze alcaline che risulterebbero letali per il batterio. L' NH_3 oltre a far innalzare il pH in prossimità del microrganismo, ha un effetto inibitorio sulle attività proteolitiche dei lisosomi e impedisce il flusso di protoni dalle cellule ossintiche verso il lume. Inoltre l'aumento della concentrazione di ioni ammonio ha un effetto

tossico sulle cellule epiteliali e sul muco. La sintesi di questo enzima rappresenta circa il 15% di tutta la sintesi proteica del batterio e da conto del suo ruolo fondamentale per la sopravvivenza e colonizzazione dell'ambiente gastrico.

L'isola di patogenicità.

Numerosi sono i fattori supposti patogenetici(4).All'interno del cromosoma batterico è stata individuata una regione di circa 40 kilobasi e che codifica circa 40 proteine chiamata cagPAI (cytotoxin associated pathogenicity island). Tale regione differisce nella proporzione di basi rispetto al restante menoma batterico suggerendo che possa provenire, almeno in parte, da altri batteri. Infatti alcune sequenze sono condivise da batteri come *Eschirichia coli*, *Yersinia pestis* e *Vibrio Colera*. La presenza di tale isola sembra essere un fattore importante di virulenza. Uno dei geni presenti all'interno di tale isola è il gene *cagA*. La proteina *cagA* (cytotoxin associated gene A) è un antigene di 128 Kda con forte potere immunogeno, per cui i soggetti infetti da ceppi *cagA* positivi sviluppano una risposta anticorpale più velocemente. Numerosi studi portano a concludere che nei paesi sviluppati l'ulcera duodenale, l'atrofia e il carcinoma gastrico sono più comuni nei pazienti infetti da ceppi *cagA* positivi. A monte del locus genico di *cagA* vi sono due loci, *picA* (36 KDa) e *picB* (101 KDa), analoghi della tossina della Bordetella Pertussis (Ptlc), responsabili dell'induzione di IL-8 che porta ad un aumento della risposta infiammatoria. Questa interleuchina viene prodotta dalla mucosa gastrica infetta, stimolando la chemiotassi nei confronti dei granulociti neutrofili, che rilasciano, fra le varie sostanze flogogene, la mieloperossidasi e la lattoferrina.

Citotossina vacuolizzante

Vi è una proteina in *H pylori*, non codificata dalle sequenze geniche dell'isola di patogenicità, con un forte effetto citopatico, in grado di vacuolizzare in vitro le cellule. Questa, chiamata *vacA* (vacuolizing-associated gene A), è costituita da due anelli di sei sub-unità ciascuno, con un peso complessivo di 972 KDa. All'interno del gene che codifica la tossina vi è eterogeneità con almeno

quattro sequenze: S1a, S1b, S1c e S2, e due sequenze della regione media M1 e M2. Sebbene la maggior parte dei ceppi possieda il gene *vacA* solo quelli che possiedono anche il gene *cagA* sono tossigeni (Tipo I). Quelli *vacA* positivi ma *cagA* negativi sono relativamente non tossigeni (Tipo II). Il fenotipo tossigeno è correlato con il genotipo molecolare: gli S1/M1 sono altamente tossigeni mentre gli S2/M2 non lo sono affatto. La tossina inducendo una ATPasi vacuolare altera il normale ciclo delle vescicole di endocitosi che fondendosi tra loro formano dei vacuoli responsabili della successiva apoptosi. VacA è inoltre in grado di aumentare le concentrazioni di secondi messaggeri intracellulari come l'AMPc e l'inositolo fosfato e attivare, attraverso la fosforilazione, proteine espresse sulle cellule gastriche coinvolte nella secrezione di pepsinogeno. Il gene *vacA* viene espresso solo nei ceppi *cagA* positivi dando origine al fenotipo tossigenico (tipo I). I ceppi *cagA* negativi, invece, pur potendo avere il gene *vacA* non sono tossigenici (tipo II). Il batterio di tipo I oltre ad essere causa di una maggiore infiammazione è associato all'ulcera peptica e colonizza l'epitelio gastrico con una più alta densità.

Catalasi, Superossidodismutasi, Fosfolipasi A2 e C, Alcool deidrogenasi

Altri fattori di virulenza sono rappresentati dalla Catalasi, Superossidodismutasi e Fosfolipasi che permettono all'*Helicobacter* di neutralizzare i radicali tossici dell'ossigeno liberati dai PMN. Inoltre, è stato suggerito che il microrganismo possa resistere alla risposta immunitaria aspecifica mediante una elastasi con funzione antiproteasica. L'alcool deidrogenasi è un enzima è coinvolto nella reazione reversibile di etanolo in acetaldeide. Se la concentrazione di etanolo è alta, l'acetaldeide viene prodotta. L'*H pylori* non possedendo l'enzima specifico per quest'ultimo prodotto, forma un eccesso di acetaldeide che potrebbe avere un ruolo nel danno tissutale determinando lisi del muco con inibizione della proliferazione cellulare e perossidazione lipidica grazie alla produzione di acetato attraverso la xantina ossidasi(4) .

RISPOSTA DELL'OSPITE

L'*H pylori* interagisce inizialmente con le cellule gastriche determinando una induzione degli antigeni HLA-DR con conseguente espressione aberrante degli antigeni di istocompatibilità di classe II (MHCII). Segue una iperregolazione del NF- κ B (fattore di trascrizione dell'infiammazione cronica), nonché una maggiore sintesi e rilascio di IL-8. L'aumento di IL-8 stimola l'infiltrazione dei granulociti neutrofili e la produzione di radicali dell'ossigeno. Il rilascio di sostanze tossiche porta ad un danno tissutale e all'aumento della flogosi. Tutto ciò è anche favorito anche dai diminuiti livelli di acido ascorbico nel succo gastrico legati alla presenza del batterio. La mucosa gastrica è infiltrata anche da eosinofili che rilasciano proteine basiche e contribuiscono al danno tissutale. La degranolazione degli eosinofili è probabilmente attivata dalla presenza di immunocomplessi formati da IgA di tipo secretorio e antigeni solubili del microrganismo. Infatti la risposta dell'ospite all'*H pylori* è anche di tipo immunologico sia attraverso la produzione di anticorpi, sia cellulo-mediata. I linfociti T, in particolare, del tipo CD4⁺, sono significativamente aumentati a livello della lamina propria.

Secrezione gastrica: gastrina, pepsinogeno, acido ascorbico

Un ruolo importante nella patogenesi del danno tissutale è la capacità di modificare la normale fisiologia delle cellule gastriche acido secernenti. In particolare, la colonizzazione è associata spesso con ipergastrinemia dovuta all'aumento di gastrina-17. Questa sostanza, prodotta dalle cellule G della regione antro-pylorica, ha un'azione diretta sulle cellule parietali stimolando la secrezione di ioni H⁺. L'aumento dei livelli di gastrina è dovuto all'inibizione, causata dal batterio, della sintesi di somatostatina prodotta dalle cellule D, o alla riduzione del numero di queste cellule, importanti nel controllo della secrezione acida. L'ipergastrinemia è, inoltre, stimolata dall'*N*- α metil-histamina sintetizzata dal batterio, che agisce sulle cellule parietali a livello dei recettori H₂ attivando l'adenil-ciclastasi. Nell'infezione da *H pylori* si ha spesso un aumento dei livelli di pepsinogeno, probabilmente dovuto all'effetto dei LPS. È stato suggerito che il rilascio di pepsina

possa favorire l'ulcerogenesi danneggiando la mucosa. Il livello di acido ascorbico nel succo gastrico invece diminuisce in presenza dell'*Helicobacter*. Le concentrazioni medie di questo acido passano da 17,8 µg/ml, per soggetti *Helicobacter* negativi, a 2,8 µg/ml per quelli positivi.

H PYLORI E MALATTIE GASTRODUODENALI

La colonizzazione dell'*H Pylori*, come già detto carcinogeno di classe I, è inevitabilmente associata a gastrite, benché la maggior parte degli individui infetti rimanga asintomatica. Una piccola frazione di persone colpite può sviluppare ulcera peptica, grave gastrite cronica atrofica, accompagnata o meno da metaplasia intestinale, che può condurre ad adenocarcinoma gastrico o malattie linfoproliferative. Sono invece tuttora controversi i ruoli dell'infezione nella patogenesi della dispepsia funzionale e nel GERD.

H pylori e gastrite

La gastrite è un processo infiammatorio della mucosa gastrica la cui diagnosi è basata sull'esame istologico. Le gastriti acute da *H pylori* sono riscontrate di rado data la quasi completa asintomaticità dell'infezione in questa fase. Dal punto di vista istologico vi è un infiltrato di polimorfonucleati neutrofili di grado variabile normalmente localizzato sulla superficie epiteliale e nelle foveole interessando in maniera relativamente uguale sia l'antro che il corpo. Numerosi studi hanno evidenziato la strettissima associazione fra il batterio e la gastrite cronica attiva (dall'86% al 100%). L'infiltrato di polimorfonucleati neutrofili rappresenta la caratteristica principale di questo tipo di patologia ed è strettamente correlato con la presenza del batterio. Diversi sono gli elementi a favore del ruolo patogenetico dell'*H pylori* in questa forma di flogosi: lo stretto rapporto esistente tra presenza del batterio e gastrite; la correlazione fra numero di polimorfonucleati e presenza dell'organismo; lo scarso numero di neutrofili in aree di mucosa gastrica senza *H pylori*; il miglioramento dell'aspetto istologico dopo terapia selettiva contro il batterio. Topograficamente le lesioni possono localizzarsi prevalentemente nell'antro (antral-predominant), nel corpo (corpus-

predominant) o in entrambi i distretti (pangastritis). La gastrite linfocitica, caratterizzata dall'infiltrazione epiteliale da parte di un elevato numero di linfociti prevalentemente di tipo T può essere associata ad infezione da *H pylori* in circa il 5% con maggior prevalenza nel corpo (a differenza dell'analoga forma associata a malattia celiaca nel 30% con prevalenza antrale). L'infezione da *H pylori* è inoltre correlata con lo sviluppo di gastrite atrofica. Questa è caratterizzata da un infiltrato infiammatorio cronico presente nell'intero spessore della mucosa con atrofia delle ghiandole gastriche ovvero perdita delle stesse associata a deposizione di materiale fibroso. È in genere indice di una flogosi di lunga durata ed è spesso associata a metaplasia intestinale. La difficoltà nella diagnosi di atrofia nonché il frequente disaccordo tra gli istopatologi deriva dalla mancanza al momento di rigidi criteri classificativi. Inoltre una flogosi massiva, può, ad esempio, simulare una gastrite atrofica a causa della sostituzione delle ghiandole gastriche da parte dell'infiltrato infiammatorio, in assenza di una vera atrofia ghiandolare. Studi di follow-up a lungo termine hanno evidenziato che la gastrite atrofica si sviluppa nell'antro in circa il 10% degli individui e nel corpo in più del 35%. Essa è più comune in pazienti colonizzati da ceppi *cagA* e sembra inoltre essere correlata anche a fattori legati all'ospite. In particolare l'aplotipo HLA DQA1*0102 sembra possa conferire resistenza allo sviluppo di gastrite atrofica. Allo stato attuale non vi sono convincenti evidenze che la gastrite atrofica possa essere un processo patologico reversibile anche dopo l'eradicazione del batterio. La metaplasia intestinale a livello gastrico può essere associata alla colonizzazione dell'*H pylori*. Essa consiste nella perdita del normale epitelio gastrico sostituito con epitelio di tipo intestinale e si presenta in tre varietà. L'istomorfologia delle gastriti viene descritta utilizzando le linee guida del The Updated Sydney System' del 1996, dove l'infiammazione viene presa in esame sia in termini di variabili graduabili quali il tipo di cellule infiammatorie, il grado di attività, la presenza di atrofia con o senza metaplasia intestinale, la presenza di *H pylori*, che di variabili non graduabili (specifiche e non specifiche) (visual analogue scale).

Ulcera peptica

L' *H pylori* è associato alla malattia ulcerosa peptica, sia gastrica che duodenale. E' inoltre noto che la colonizzazione determina un aumento del rischio di sanguinamento di entrambe le ulcere, e che l'eradicazione riduce drammaticamente il tasso di ricorrenza della malattia. L'associazione tra infezione ed ulcera duodenale è estremamente significativa: la percentuale di ulcere duodenali positive per *H pylori* è di circa il 90-95%. L' *H pylori* è anche in grado di colonizzare aree di metaplasia gastrica in duodeno. Queste aree sarebbero indotte da una iperstimolazione cronica della secrezione acida gastrica. Una sequenza di eventi plausibile può quindi prevedere una iniziale colonizzazione gastrica da parte del batterio che indurrebbe, oltre ad un danno della mucosa, una serie di perturbazioni della fisiologia gastrica che si tradurrebbero in alterazioni della secrezione clorido-peptica. Questo determinerebbe la comparsa di aree di metaplasia gastrica in duodeno che successivamente verrebbero colonizzate dai batteri provenienti dallo stomaco. La colonizzazione duodenale può innescare un danno epiteliale che rende più suscettibile la mucosa all'azione lesiva delle secrezioni acide provenienti dallo stomaco. Per quanto riguarda l'ulcera gastrica i dati della sua associazione con l'infezione si attestano intorno all'80-85%. L'ulcerazione si sviluppa più frequentemente nelle zone di transizione: tra il piloro e l'antro (a livello della incisura lungo la piccola curva), tra l'antro e il corpo e tra fondo e cardias. Con l'avanzare dell'età, il confine tra mucosa infiammata e normale si spinge verso il fondo, rendendo ragione della maggiore frequenza di ulcere gastrite prossimali rispetto alle ulcere antrali osservata negli anziani. Anche per l'ulcera gastrica il processo patogenetico è determinato da uno squilibrio che si viene a creare tra i fattori lesivi e protettivi per la mucosa(4) .

Dispepsia funzionale

La dispepsia è una sindrome caratterizzata da dolore e/o discomfort (termine che racchiude sintomi quali ripienezza post-prandiale, sazietà precoce, distensione epigastrica, nausea) persistenti o ricorrenti localizzati nella parte centrale dei quadranti addominali superiori. Sul piano

eziopatogenetico, la dispepsia viene distinta in secondaria, riferibile cioè ad una patologia di base clinicamente evidente, e funzionale (o idiopatica), quando non è possibile identificare alcuna lesione organica, sistemica o metabolica. La diagnosi in quest'ultimo caso è formulata per esclusione. Nell'ambito della forma funzionale, è possibile inoltre identificare due sottogruppi: una forma simil-ulcerosa, con dolore e/o bruciore epigastrico come sintomi predominanti, e una forma simil-motoria, dove il quadro clinico è dominato dai sintomi non dolorosi (discomfort). I principali meccanismi ipotizzati alla base della dispepsia simil-motoria sono costituiti dal ritardato svuotamento gastrico, dall'ectasia dell'antra e dalla ridotta accomodazione fundica. Si ipotizza che la forma simil-ulcerosa sia invece riconducibile a processi infiammatori, quali quelli in corso di infezione di *H pylori*, o a una ipersecrezione acida. Comunque il ruolo "sintomatologico" dell'infezione da *H pylori* nella dispepsia funzionale è alquanto controverso così come l'eventuale possibilità di eradicare tali pazienti.

Malattia da reflusso gastro-esofageo (GERD)

I dati relativi all'interazione tra infezione da *H pylori* e malattia da reflusso gastroesofageo (GERD) sono limitati, controversi e di difficile interpretazione(5). Infatti la maggior parte di questi proviene da lavori che non avevano come obiettivo primario la valutazione dell'interazione tra l'infezione da *H pylori*, la sua eradicazione e la malattia da reflusso ma da subanalisi di trials per l'eradicazione del batterio. Questi trials inoltre non erano disegnati per controllare l'influenza della terapia acido-soppressiva nell'esofagite da reflusso pre-eradicazione e lo stato dei sintomi. Recentemente una particolare enfasi è stata posta sulle conseguenze dell'infezione da *H pylori* sulla secrezione acida gastrica. In pazienti con gastrite del corpo moderata-severa *H pylori* correlata, l'eradicazione può determinare un aumento della secrezione acida a livelli tali da precipitare la malattia da reflusso gastroesofageo, qualora preesista una insufficienza subclinica dello sfintere esofageo inferiore. Invece nei pazienti con ulcera duodenale, in contrasto a quanto emerso in precedenti studi, la malattia da reflusso trae probabilmente deboli benefici dall'eradicazione del batterio. Sembra inoltre

che l'eradicazione dell' *H pylori* non abbia un significativo impatto sulla malattia da reflusso in soggetti sani e in individui in cui la malattia rappresenta il problema principale. I pazienti con malattia da reflusso infetti da *H pylori* sembrano invece trarre maggiori benefici dalla terapia con inibitori della pompa protonica (PPI). Questi agenti causano, comunque, una modificazione della distribuzione topografica della gastrite dall'antro al corpo il cui significato clinico è tuttora controverso. Indipendentemente dalla patologia riscontrata, il bilancio potrebbe essere in favore dell'eradicazione dell' *H pylori*. Per coloro i quali lo sviluppo di una esofagite da reflusso rappresenta una chiara possibilità, essa sarà normalmente lieve, facilmente trattabile ed è altamente improbabile che si associ ad un aumentato rischio di adenocarcinoma esofageo.

Cancro gastrico

Nel 1994 la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha deciso di considerare *H pylori* un agente carcinogeno di prima classe per l'adenocarcinoma gastrico(6). Infatti l'analisi di diversi studi, fondamentalmente a carattere epidemiologico, ha portato a stimare che il valore del rischio relativo di sviluppo di carcinoma gastrico in soggetti infetti rispetto ai non infetti è di 3.8. In una recente meta-analisi che analizzava 48 studi effettuati tra il 1982 ed il 1998, cinque studi coorte hanno mostrato un odd ratio variabile da 2.8 a 6.0, contrapposti ad un solo studio che non ha dimostrato alcuna relazione tra infezione e cancro. Complessivamente sembra che l'*H pylori* contribuisca per circa un terzo all'incidenza globale di cancro gastrico(7) . Non sono comunque ancora chiare le modalità attraverso le quali l'infezione possa agire. E' stato ipotizzato che il batterio possa essere un determinante essenziale nell'accelerazione del processo "gastrite atrofica, metaplasia intestinale, displasia" . Altri meccanismi comunque potrebbero essere coinvolti: questi includono un maggior danno mucoso ed una gastrite più severa nei soggetti *cagA* positivi, un maggiore turnover cellulare ed una riduzione dell'acido ascorbico nel succo gastrico durante l'infezione. Recentemente è stata anche proposta anche una correlazione fra l'infezione, l'IL-1 β e ipocloridria. Uno studio non controllato giapponese mostra come l'eradicazione può ridurre

l'incidenza di adenocarcinoma gastrico metacrono, suggerendo che l'infezione possa avere un ruolo anche come promotore oltre che iniziatore. Un altro studio giapponese non controllato dimostra come l'eradicazione possa inoltre prevenire la progressione di una adenoma gastrico a displasia e a cancro.

Malt linfomi

I linfomi MALT sono linfomi a cellule B che derivano dal MALT (tessuto linfoide associato alla mucosa), la cui acquisizione a livello gastrico è una diretta conseguenza dell'infezione da *H pylori*(8) . La mucosa gastrica normale contiene aggregati linfoidei sparsi, normalmente localizzati alla base della mucosa antrale o ossintica, ma è assolutamente infrequente il reperto di follicoli linfoidei con centro germinativo. In corso di infezione da *H pylori*, sotto lo stimolo dei linfociti T sensibilizzati, si osserva un continuo accumulo di popolazioni monoclonali di cellule B nell'ambito del processo infiammatorio, che si organizzano in strutture follicolari con un centro germinativo ed una zona mantellare ben definiti. Si costituisce in questo modo il MALT, che ha il significato biologico di un sistema immunologico di difesa per il controllo locale dell'infezione. Successivamente, per l'intervento di fattori sconosciuti, una di queste popolazioni monoclonali può acquisire un vantaggio proliferativo con insorgenza del linfoma. La maggior parte di questo tipo di linfomi mostra inizialmente un accrescimento lento ed un buon grado di differenziazione (linfomi B MALTomi a basso grado). Successivamente in alcuni casi si può osservare un'evoluzione verso forme indifferenziate altamente maligne che tendono a disseminare alle stazioni linfonodali e ad altri organi. L'analisi degli eventi genetici alla base dell'evoluzione clonale e, infine, della trasformazione maligna, ha condotto all'identificazione di una specifica caratteristica dei MALT linfomi, la traslocazione t(11;18), non nota per i linfomi nodali. E' stato riportato che i MALT linfomi rispondenti all'eradicazione dell'*H pylori* sono t(11;18) negativi, e che la traslocazione si presenta prevalentemente nei linfomi in stadio più avanzato; pertanto la traslocazione t(11;18) potrebbe essere un marker clonale di progressione del linfoma. L'acquisizione che lo sviluppo dei

MALT linfomi è associato all'infezione da *H pylori*, ha rivoluzionato l'approccio terapeutico a questa patologia. Dopo il primo caso di regressione dell'infiltrato linfomatoso a seguito di terapia eradicante per *H pylori*, riportato nel 1993, sono stati condotti numerosi studi che hanno mostrato che il trattamento dell'infezione in pazienti con MALT linfoma a basso grado è associato ad una remissione completa della patologia neoplastica nel 40-100% dei casi, in un periodo medio di circa sei mesi. La variabilità della percentuale di regressione è da ricondursi a definiti fattori predittivi; occorre quindi individuare i pazienti che potrebbero maggiormente beneficiare di un trattamento antibiotico. In particolare, sono cinque i fattori da prendere in considerazione: 1) *grado di malignità (basso grado/alto grado) all'esame istologico*; 2) *stadio della malattia*; 3) *status HP*; 4) *fattori demografici*; 5) *durata del follow-up*. Il trattamento eradicante per l'infezione da *H pylori* in pazienti con MALT linfoma a basso grado localizzato, senza interessamento linfonodale all'eco-endoscopia, è associato ad una remissione completa in circa il 77-79% dei casi, valore che potrebbe raggiungere il 100% sotto adeguata stadiazione e protocollo di follow-up. Tumori ad alto grado di malignità o con coinvolgimento linfonodale, non possono in alcun modo beneficiare di tale possibilità.

DIAGNOSI

Il report pubblicato nel 1983 da Warren e Marshall sulla presenza di un batterio nello stomaco, ha portato ad un incredibile sconvolgimento della patologia gastroduodenale. Le infezioni da *Helicobacter pylori (H pylori)* e da *Streptococco mutans*, il principale agente cariogeno, sono probabilmente le più comuni e diffuse patologie croniche infettive umane. Negli ultimi anni diverse sono state le metodiche messe a punto per fare diagnosi di infezione. I test disponibili possono essere di due tipi: 1) *invasivi*, ovvero che richiedono l'esame endoscopico e il prelievo di campioni biotici; 2) *non invasivi* (sierologia, Urea Breath Test, ricerca dell'antigene del batterio nelle feci). Le metodiche attualmente disponibili hanno dimostrato di avere una buona affidabilità anche se è

ormai chiaro che nessun singolo esame è ottimale e solo una combinazione dei diversi test è in grado di garantire un'adeguata accuratezza diagnostica.

Metodiche Invasive

Istologia

L'esame istologico permette d'avere informazioni sulla presenza del batterio e sulle caratteristiche dell'eventuale infiltrato infiammatorio riscontrato. La prima colorazione utilizzata per diagnosticare quest'infezione è stata la Wharthin-Starry. Diverse sono le colorazioni disponibili per individuare l'*H pylori* (tabella 3). L'immunoistochimica viene considerata la colorazione "gold standard". Comunque un recente studio ha evidenziato come la colorazione "Giemsa modificata" sia da preferire rispetto alle altre sia in termini di risultati, sia in termini di costi. Quasi tutte queste colorazioni elettive vengono effettuate in combinazione con la colorazione "ematossilina ed eosina" che permette di valutare l'istopatologia associata con l'infezione. Sebbene la sensibilità dell'istologia sia generalmente alta, essa può essere inficiata dal prelevamento bioptico ovvero dal sito, dal numero e dalle dimensioni delle biopsie(9). Vi sono spesso differenze nella densità di colonizzazione nelle diverse regioni gastriche che possono essere causa di errori. La sensibilità può essere migliorata prelevando diversi campioni provenienti dall'antro e dal corpo (sono raccomandate due campioni per ciascun sito) ed una dall'angulus . Inoltre piccoli campioni o un cattivo orientamento degli stessi possono contribuire a determinare falsi negativi. In assoluto, tuttavia, il più importante fattore che può inficiare la sensibilità è l'esperienza del patologo. Frettolose osservazioni soprattutto quando effettuate solo con una colorazione possono determinare falsi negativi in soggetti con infezioni caratterizzate da bassa densità batterica. Tuttavia, anche quando sono state condotte attente valutazioni in studi che miravano ad analizzare il grado di accordo fra i diversi patologi nella diagnosi, i risultati sono stati poco soddisfacenti. La specificità

non è un problema: la caratteristica morfologia a spirale e la sua stretta relazione con l'epitelio gastrico rendono improbabile la confusione con altri patogeni.

Test all'ureasi

La presenza di ureasi (ovvero di un enzima in grado di scindere l'urea in ammonio ed anidride carbonica) nella mucosa gastrica umana e animale è stata riportata per la prima volta da Luck e Seth nel 1924. Le osservazioni che l'*H pylori* era in grado di produrre notevoli quantità di urea hanno spinto i ricercatori a trovare il modo di utilizzare questo enzima come indicatore della presenza dell'infezione. L'attività ureasica è principalmente localizzata, se presente, al di sotto dello strato mucoso dove il pH è più elevato e dove è presente il batterio. Il test rapido all'ureasi sfrutta quindi le elevate concentrazioni di ureasi presenti all'interno di una biopsia gastrica contenente *H pylori* che determinano un cambiamento di pH del medium valutato attraverso il cambio di colore di un indicatore. La sensibilità di questo test dipende dal numero di batteri presenti nella biopsia (è stato calcolato che 10^4 organismi sono necessari per un test positivo) e dallo spessore dello strato di muco presente nella biopsia. Diversi sono i kit attualmente in commercio, tutti dotati di buoni valori di sensibilità e specificità (tabella 4).

Coltura

Le colture di *H pylori* sono ottenute da biopsie gastriche, sono ureasi, ossidasi e catalasi positive e quando esaminate al microscopio le colonie appaiono costituite da bacilli ricurvi, Gram negativi. Il batterio perde rapidamente vitalità al di fuori dell'ambiente gastrico per cui la coltura deve essere effettuata il prima possibile. Le biopsie possono comunque essere conservate in un *medium* (Stuart's transport medium) per 24h a 4°C. Diversi sono stati i terreni di coltura proposti e generalmente essi sono basati su agar sangue (Columbia o Brain heart infusion), a cui vengono eventualmente aggiunti ciclodestrina, albumina sierica bovina e antibiotici in diverse combinazioni per produrre terreni selettivi. Sebbene specifica al 100%, la sensibilità di questo test può essere

inficiata da problemi di campionamento, ritardo nel trasporto delle biopsie al laboratorio, esposizione di queste o delle colture all'aria, condizioni di laboratorio sub-ottimali ed esperienza del microbiologo. Inoltre è necessario che il paziente non abbia preso antibiotici o inibitori della pompa protonica (PPI) nelle ultime due settimane. Tali caratteristiche spesso limitano l'utilizzo di questo test nei centri di ricerca. L'esame colturale permette inoltre di valutare le antibiotico resistenze, e quindi poter effettuare un trattamento antibiotico mirato.

Metodiche molecolari

Queste tecniche sono normalmente effettuate in centri specializzati e la loro principale applicazione avviene nell'ambito della ricerca. La tecnica più usata è quella della polymerase chain reaction (PCR), anche nelle sue diverse varianti (RFLP: PCR based restriction fragment length polymorphism analysis; REP: ripetitive extragenic palindromic PCR). A seconda del tipo di primer utilizzato è possibile rilevare la presenza di 10 – 100 batteri. Tali metodiche sono utilizzate per identificare il batterio non solo nelle biopsie gastriche, ma anche nella placca dentale, nel succo gastrico, nelle feci. Inoltre l'utilizzo di tali tecniche ha permesso di comprendere meglio l'antibiotico resistenza del batterio. Per esempio, la resistenza alla claritromicina è dovuta ad una mutazione puntiforme (principalmente transizione A-G) in una ansa conservata della sub-unità 23S rRNA.

Test non invasivi

Sierologia

La colonizzazione della mucosa gastrica da parte del batterio determina una risposta immunitaria sistemica e locale. Gli anticorpi sistemici (IgG) sono diretti contro diverse proteine di membrana e lipopolisaccaridi. La risposta locale determina la formazione di specifici anticorpi IgA e IgM, ritrovati nei succhi gastrici di pazienti con gastrite associata ad *H pylori*. Esistono diverse tecniche per la ricerca degli anticorpi e la metodica più comunemente utilizzata è il test ELISA (Enzyme-

Linked ImmunoSorbant Assay). Un altro test, più spesso utilizzato per fini di ricerca, è rappresentato dal Western Blotting (WB): questo permette di valutare la risposta sierologica nei confronti di diversi antigeni provenienti dal batterio ottenendo più informazioni rispetto ad un test Elisa. Si è potuto così evidenziare una risposta sierologia specifica verso una proteina chiamata CagA, di 120-138 kDa. Il limite principale dei test sierologici è dato dal fatto che non ci danno informazioni sulla presenza di una infezione “attiva”, ma solo che vi è stato un contatto fra il patogeno ed il sistema immunitario dell’ospite. Recentemente la Medical Device Agency inglese ha valutato un largo numero di test ELISA. 588 sieri sono stati testati con 16 kit differenti. L’accuratezza diagnostica globale è stata del 78% (range 68%-82%). Un’accuratezza diagnostica così bassa non permette un largo e sicuro utilizzo di tale metodica, né sembra giustificarne il costo, seppur basso. Questa metodica, pioniera fra le metodologie non invasive, rimane però sicuramente importante per l’esecuzione di studi epidemiologici, così come per valutazione delle caratteristiche dei ceppi (*cag A*, *vacA*) importanti per gli studi di patogenesi.

Near Patient Testing

La possibilità di disporre di un “near patient test” valido permetterebbe al medico di base di gestire molti dei pazienti con infezione da *H pylori*. Molti di questi utilizzano sangue intero mentre altri richiedono la separazione del siero e ciò ne limita il loro uso. Diverse sono comunque le critiche che possono essere mosse a questo tipo di approccio. Questi test possono variare nel risultato quando è difficile ottenere una goccia di sangue. Ad esempio lo spremere il dito può determinare un cambio nel valore di ematocrito mescolando liquido interstiziale con il sangue, alterando così la concentrazione degli anticorpi. Inoltre le metodiche su sangue intero sono soggette alla presenza di chilomicroni che possono modificare la permeabilità del plasma attraverso le membrane che costituiscono questi test. Sono state inoltre notate variazioni della sensibilità e della specificità a seconda che si utilizzi del sangue capillare o venoso. Una valutazione di questi test effettuata su

3805 pazienti in otto studi eseguiti fra il 1999 e il 2000 ha evidenziato dei valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 71.1% e 87.6%.

Urea breath test (UBT)

Come per il test all'ureasi, questa metodica sfrutta la produzione dell'enzima ureasi da parte del batterio per fare diagnosi. Il test utilizza urea marcata con ^{13}C o ^{14}C . Questa una volta diffusa attraverso lo strato mucoso viene eventualmente a contatto con l'enzima, e scissa in ammonio e anidride carbonica marcata. Poiché questa reazione avviene al di sotto dello strato mucoso, la CO_2 marcata formata ha poche probabilità di diffondere nel lume gastrico e infatti la maggior parte di questa, data la vicinanza dei vasi sanguigni della mucosa gastrica, diffonde in questi. Dopo poco tempo sarà quindi possibile ritrovare l'isotopo marcato nel respiro. Il ^{14}C è un isotopo radioattivo. Sebbene le prime pubblicazioni riportassero l'utilizzo di $10\mu\text{Ci}$ di ^{14}C , molti degli Autori sono ora concordi che la dose sufficiente è di $1\mu\text{Ci}$. Questa dose determina una esposizione di 0.3 mrem, ovvero 1/60 delle radiazioni assorbite durante una radiografia del torace (20 mrem) e inferiore alla quantità di radiazioni presenti naturalmente ogni giorno nell'ambiente. Viene comunque consigliato di non eseguire questo test nelle donne in gravidanza e nei bambini. Negli Stati Uniti il ^{14}C non deve essere eseguito nei reparti di Medicina Nucleare e in Australia è possibile spedire i campioni per posta. In Europa invece la legislazione più severa in materia, ne ha limitato fortemente l'uso nonostante i valori di sensibilità e specificità del test rispettivamente del 97% e 95%. Il test viene inficiato dall'utilizzo di PPI, antibiotici o composti bismutati e viene infatti consigliata una sospensione di questi farmaci almeno una settimana prima dell'esecuzione del test per evitare risultati falsi negativi. Falsi negativi si possono anche riscontrare qualora il test venga effettuato su pazienti precedentemente sottoposti a chirurgia gastrica. L'UBT con ^{13}C è identico all'UBT con ^{14}C eccetto per l'utilizzo di un isotopo non radioattivo, il ^{13}C . Poiché il ^{13}C è un isotopo naturale, viene misurato come rapporto del ^{12}C , uno degli isotopi del carbonio più abbondanti in natura. Normalmente il test si effettua somministrando al paziente urea marcata (75 mg) e un pasto, il cui

scopo è quello di rallentare lo svuotamento gastrico e quindi massimizzare la distribuzione dell'urea all'interno dello stomaco, ovvero il tempo di contatto fra l'urea e la mucosa gastrica così come l'area di distribuzione della stessa. Diversi tipi di pasti sono stati testati compresi quelli a base di acido citrico anche se non sembra che né la forma o la composizione di proteine, carboidrati o grassi possano rappresentare un fattore critico. Normalmente viene inoltre richiesto un digiuno di almeno 4 ore prima di effettuare il test, sebbene recenti studi suggeriscano la possibilità di evitare il pasto così come di accorciare il tempo di esecuzione del test senza inficiare l'accuratezza dello stesso. Come per il ^{14}C , il ^{13}C può risultare falsamente negativo se non vi è una sospensione della terapia con PPI, antibiotici o composti bismutati almeno 7 giorni prima dell'esecuzione del test. Vista la natura non radioattiva, il ^{13}C può essere usato con sicurezza nei bambini e nelle donne gravide. Un'analisi dei risultati riportati in studi effettuati fra il 1999 e il 2000 nei quali il ^{13}C UBT è stato comparato contro definiti gold standard diagnostici ha evidenziato che su 3643 pazienti la sensibilità e la specificità del test erano rispettivamente del 94.7% e del 95.7%. Questi valori sono inoltre sovrapponibili a quelli che si ottengono nei pazienti dopo 4 settimane dalla fine terapia per valutare l'eradicazione e ne fanno un gold standard come metodica non invasiva nella diagnosi e nel follow-up del paziente.

Ricerca degli antigeni di *H pylori* nelle feci

Negli ultimi anni è stato possibile ottenere delle colture di *H pylori* a partire a campioni di materiale fecale umano anche se è stato notato che organismi vitali erano presenti solo in una minima percentuale. Da pochi anni è disponibile un test immunoenzimatico (EIA) che permette di determinare la presenza di materiale antigenico di *H pylori* nelle feci (*H pylori*SA™ - Helicobacter pylori Stool Antigen Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati USA). Il test *H pylori*SA ha recentemente ricevuto l'approvazione dall'American Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti con una doppia indicazione: 1) diagnosi di infezione in pazienti adulti e sintomatici e 2) monitoraggio post-terapia nei medesimi pazienti. Il test utilizza anticorpi policlonali anti *H pylori*

adsorbiti su microcelle. Il campione di feci da utilizzare per il test può essere conservato a 2-8 °C fino a tre giorni o indefinitamente a -20°. Questo permette la raccolta per settimane o mesi di molti campioni (soprattutto nei piccoli ospedali con pochi pazienti) in modo da essere testati tutti assieme con notevole riduzione dei costi ed essere ulteriormente impiegati in future analisi. Il test è molto semplice: utilizza anticorpi policlonali marcati con perossidasi per individuare antigeni del batterio presenti nelle feci. L'utilizzo successivo del substrato per la perossidasi permette di valutare la presenza o meno degli antigeni utilizzando una reazione colorimetrica letta con spettrometro (450 nm). I valori limite convenzionali sono i seguenti: < 0.140 nm negativo (assenza di antigeni batterici nel campione: il paziente non è infetto); tra 0.140 nm e 0.159 nm: valore equivoco/non determinato (il test andrebbe ripetuto e se nuovamente dubbio andrebbe prelevato un nuovo campione) e ≥ 0.160 nm: positivo (antigeni batterici presenti, il paziente è infetto).

H pyloriSA: clinical evidence

Dati recenti evidenziano che nel pre-treatment l'HpSA presenta valori di specificità e sensibilità sovrapponibili al ¹³C UBT. Negli studi pubblicati fra il 1999 e i primi sei mesi del 2001 sono stati testati 3419 pazienti utilizzando questo test comparato a definiti gold standard quali l'endoscopia o l'UBT con dei valori finali di sensibilità e specificità (espressi come media pesata) del 93.2% e 93.2% rispettivamente. Infatti lo "European Helicobacter pylori study group" a Maastrich 2000 raccomandava l'utilizzo della ricerca dell'antigene dell' *H pylori* nelle feci, assieme al ¹³C UBT, come metodiche non invasive elettive per la diagnosi primaria di infezione. Contrastanti sono invece i dati per quanto riguarda l'utilizzo del test nel follow-up. Negli studi effettuati fra 1999 e i primi sei mesi del 2001 che hanno usato come gold standard per definire l'infezione da *H pylori* quanto raccomandato dallo European *H pylori* study group, sono stati valutati 332 patients e il test fecale ha riportato valori di sensibilità e specificità (espressi come medi pesata) rispettivamente del 92,1% e 87,6%. Negli studi dove invece il gold standard era rappresentato dall'UBT, sono stati studiati 790 pazienti e il test fecale ha riportato valori di sensibilità e specificità (espressi come medi

pesata) rispettivamente del 88,8% e 87,3%. Sebbene siano necessari più studi con popolazioni numericamente maggiori, lo European Helicobacter pylori study group a Maastrich 2000 suggerisce che questo test può essere una valida alternativa all'UBT nel follow-up del paziente post trattamento. Il test fecale è semplice da utilizzare poiché tutti i laboratori possono essere in grado di usare il kit, senza specifiche necessarie, non richiede alcuna spesa aggiuntiva a quella del kit (a differenza del ¹³C UBT, dove il costo dello spettrometro di massa incide notevolmente sul costo del test) e non è necessario personale dedicato, in quanto il paziente deve solo consegnare il campione fecale al laboratorio.

Altri test

La ricerca di anticorpi anti *H pylori* nelle urine e nella saliva sono state proposte come metodiche non invasive alternative. I risultati sulla saliva sono stati deludenti (sensibilità 81%, specificità 73%). Per quanto riguarda il test sull'urina fino ad oggi un solo studio condotto su 132 pazienti ha dimostrato di raggiungere valori di sensibilità e specificità accettabili (86% e 91%).

Considerazioni

Scegliere il test “giusto” non è semplice. Da una parte bisogna considerare le caratteristiche tecniche del test quali sensibilità, specificità, likelihood ratio (che a differenza dei valori predittivi positivi e negativi vengono influenzati in maniera molto minore dalla prevalenza dell'infezione) e dalla costo-efficacia. Dall'altra vi sono i possibili scenari clinici. L'esame endoscopico è costoso, poco gradito dal paziente e comporta una serie di complicazioni infrequenti ma ben descritte in letteratura (perforazioni, infezioni, sanguinamenti, problemi connessi all'utilizzo dei farmaci per sedare il paziente). La strategia del “test and treat”, utilizzando metodiche non invasive quali l'UBT o il test fecale, nei soggetti dispeptici d'età inferiore ai 45 anni, privi di sintomi d'allarme (sanguinamento, perdita di peso, disfagia, etc) e che non assumano di FANS, è sicura, riduce il numero d'endoscopie e diversi studi hanno provato la sua costo-efficacia. Tale strategia consente al

gastroenterologo, come al medico di base, la possibilità di chiudere l'iter diagnostico in molti casi in maniera semplice e rapida. Pazienti dispeptici d'età superiore ai 45 anni o con sintomi di allarme dovrebbero essere invece endoscopizzati. La scelta di effettuare il test rapido all'ureasi o l'esame istologico (più costoso) è invece lasciata al gastroenterologo che dovrebbe valutarne i costi-benefici alla luce della clinica. Anche nel follow up le metodiche non invasive possono essere considerate d'elezione, effettuando l'esame endoscopico solo in specifici contesti.

TERAPIA

Nel corso degli ultimi incontri internazionali, numerosi sono stati gli studi sulla terapia tutti diretti al tentativo comune di ricercare uno schema terapeutico ideale. Così, sia pure tra le difficoltà derivate dal numero e dalla non omogeneità di regimi differenti, spesso non paragonabili tra loro, abbiamo cercato di evidenziare le eventuali novità proposte e, per cercare di sintetizzare e semplificare i diversi schemi farmacologici proposti, abbiamo suddiviso gli studi presentati in quattro sottogruppi:

1. Trial in doppio cieco;
2. Inibitori della pompa protonica (IPP) per meno di 7 giorni;
3. Inibitori della pompa protonica (IPP) per 7 giorni;
4. Inibitori della pompa protonica (IPP) per più di 1 settimana

1. Trial in doppio cieco

L'attenzione di tutti è sempre rivolta innanzitutto agli studi "in doppio cieco", in genere svolti su grandi popolazioni per cercare di trarre linee-guida. In uno studio americano, in una popolazione mista, (dispepsia non ulcerosa/ulcera duodenale) sono stati riportati migliori risultati, non sorprendentemente, con claritromicina (500mg bid) ed amoxicillina più omeprazolo rispetto al placebo, (eradicazione pari al 84% e 39%). In altri due trial esaminati, uno australiano ed uno europeo, gli Autori hanno ricercato l'eventuale correlazione tra terapia eradicante e placebo nel

miglioramento della sintomatologia dispeptica. Come atteso, il tasso di eradicazione riportato era maggiore e, statisticamente significativo, quando veniva usata la classica terapia eradicante con claritromicina (500mg bid), amoxicillina ed omeprazolo (85%,79%) rispetto al solo placebo o al solo omeprazolo (3%,4%) mentre nessuna differenza era riscontrata dal punto di vista sintomatologico. Due studi "poderosi" provenienti dall'Ungheria e dal Canada con 446 e 448 pazienti rispettivamente, mostrano l'eguaglianza del tasso di eradicazione, sia con omeprazolo che con il nuovo nato della famiglia degli inibitori della pompa protonica, l'esomeprazolo (tasso di eradicazione del 90%). Un altro grosso studio multicentrico che proviene dall'Italia sancisce definitivamente la superiore efficacia in termini di eradicazione, della triplice terapia estesa ad una settimana rispetto alla duplice terapia per una settimana e la triplice terapia per due settimane

2. IPP per meno di 7 giorni

Una delle principali condizioni che determina il successo o meno di uno schema terapeutico è la reale "compliance" del paziente, e perchè questa si realizzi, si cerca di ridurre il numero dei farmaci o, nel caso in cui ciò sia impossibile, il tempo di assunzione degli stessi. In questo senso si spiegano dunque gli studi presentati con il comune fine di verificare l'efficacia della terapia assunta per meno di una settimana. La quadruplica terapia con diversi PPI ha mostrato risultati davvero importanti. Infatti assumendo la claritromicina 1000 mg/die, solo per quattro giorni con amoxicillina, tinidazolo ed omeprazolo, si può ottenere un tasso di eradicazione del 92%. L'aumento della dose di amoxicillina non determina invece differenze in termine di successo terapeutico (79%).

3. IPP per 7 giorni

Omeprazolo +Claritromicina (500 mg/die)

In uno studio in pazienti con ulcera duodenale, sono stati messi a confronto due schemi terapeutici utilizzando la claritromicina per sette giorni (500 mg/die) o per tre giorni (750 mg/die) in associazione con omeprazolo e metronidazolo. Il tasso di eradicazione riportato era sostanzialmente

sovrapponibile (77% vs 73 %). E' europeo lo studio che ha riportato i migliori risultati (94%) con l'associazione della claritromicina 500 mg /die con metronidazolo ed omeprazolo. In un altro studio, su pazienti con ulcera peptica, è stata sottolineata invece l'importanza di un maggiore dosaggio della claritromicina (1000 mg/die) paragonando due regimi terapeutici con omeprazolo, claritromicina, amoxicillina, o omeprazolo metronidazolo e dosaggi inferiori di claritromicina (il tasso di eradicazione era pari al 91% e 81%).

Omeprazolo +Claritromicina (1000 mg/die)

In una popolazione di pazienti con ulcera duodenale, è stata proposta la classica triplice terapia per sette giorni con claritromicina ed amoxicillina affiancata ad omeprazolo o RBC riportando risultati controversi (79% l'eradicazione con l'omeprazolo e 70% con RBC). Come già riscontrato in studi precedenti, non si registra alcuna differenza in termini di eradicazione se all'associazione claritromicina ed amoxicillina si affiancavano diversi protettori gastrici (omeprazolo= 93%; lansoprazolo= 93%; RBC= 96%). In uno studio inglese è invece riportato quello che vorremmo che fosse il nostro ideale tasso di eradicazione (100%), utilizzando una triplice terapia a base di omeprazolo, claritromicina e tinidazolo .

4. IPP per più di 7 giorni

Omeprazolo + Claritromicina 500 mg/die

Si è detto come la quadruplica terapia rappresenti uno dei più efficaci regimi terapeutici tra quelli estesi a meno o più di sette giorni. Tuttavia, quando la quadruplica viene somministrata per più di una settimana, il tasso di eradicazione "scende" all' 82% (94% quando la terapia è assunta per meno di una settimana).

Omeprazolo + Claritromicina 600 mg/die

Recentemente, è stato utilizzato un nuovo farmaco mucoprotettivo, il sofalcone, con la classica triplice terapia: claritromicina (somministrata tre volte/die), amoxicillina ed omeprazolo a diversi dosaggi con risultati soddisfacenti (86%).

Omeprazolo + Claritromicina 750 mg/die

La claritromicina è stata inoltre associata con amoxicillina, omeprazolo ed un nuovo protettore gastrico, la rebamipide, per due settimane. Il tasso di eradicazione ottenuto era di 85% vs 61% (senza la rebamipide).

Farmaco-resistenza

L'*H pylori* è sensibile a diversi antibiotici in vitro: i beta-lattamici, i macrolidi e le tetracicline, gli imidazoli. Comunque il sito dell'infezione, la mucosa gastrica, è estremamente difficile da "raggiungere" per gli antibiotici: lo strato viscoso del muco ostacola infatti la diffusione degli antibiotici rendendo difficile il raggiungimento del batterio. La resistenza alla Claritromicina è causata da una mutazione puntiforme o da una trasversione dell'rRNA 23S. La resistenza a questo antibiotico è associata anche a quella di altri macrolidi quali l'azitromicina o eritromicina. Nel caso del metronidazolo si ha invece lo sviluppo di una attività piruvato-ossidoreduttasica o alfa-glutarato-ossidoreduttasica, che inattiva il farmaco. Per valutare la resistenza batterica, utile al fine di comprendere se la terapia andrà a buon fine, si ricorre all'antibiogramma. Questo può essere condotto per mezzo di diverse metodiche quali l'agar dilution, la disk diffusion o l'E-test, tutti intenti a valutare la minima concentrazione inibente (MIC). Attraverso la conoscenza della MIC si può stabilire quindi la sensibilità o meno del batterio all'antibiotico ed eventualmente variare il dosaggio terapeutico a seconda dei diversi gradi di sensibilità. La prevalenza della resistenza al metronidazolo è notevolmente variabile potendo oscillare dal 5-90% a seconda della zona geografica considerata. Per i macrolidi vi è invece un gradiente geografico crescente di resistenze di tipo "Nord-Sud". Per quanto riguarda l'amoxicillina non è stata finora riscontrata una percentuale significativa di resistenza.

Citocromo P450 2c19 e 3A4

Una terapia antimicrobica ideale dovrebbe avere un tasso di eradicazione almeno del 90%, e meno del 5% di incidenza di effetti secondari severi .

Come accennato, le linee guida di riferimento dell'Helicobacter pylori Study Group (EHPSG) suggeriscono un primo trattamento con un inibitore della pompa protonica (PPI) più due antibiotici (amoxicillina e claritromicina o metronidazolo) per una settimana, inoltre l'applicazione di questo protocollo è stato recentemente confermato da un comitato di esperti internazionali.

Una recente meta-analisi, tuttavia, ha segnalato un deludente tasso di eradicazione (79%) di questo regime terapeutico . Questo anche a seguito del crescente aumento della presenza di ceppi resistenti sia negli Stati Uniti che in Europa .

Da questi dati emerge che il trattamento ottimale per l'eradicazione dell'infezione da H pylori rimane ancora da stabilire, ma oltre alla sensibilità agli antibiotici, bisogna tener conto anche dell'assetto genetico di ogni singolo individuo, che da dati recenti sembra influenzare il successo terapeutico. Infatti la claritromicina e l'omeprazolo sono metabolizzati da enzimi chiamati citocromo (CYP) P450 2C19 e 3A4 presenti nelle frazioni microsomiali epatiche. Mentre il PPI è metabolizzato maggiormente dal 2C19, la claritromicina è invece principalmente metabolizzata dal 3A4. Tra le diverse isoforme del CYP coinvolte nel metabolismo umano, il CYP3A4 e CYP2C19 metabolizzano più del 60% dei farmaci disponibili in commercio .

Recentemente è stato trovato che l'assetto genotipico del CYP2C19 potrebbe influenzare l'efficacia dell' omeprazolo agendo sul pH gastrico nell'uomo .

Gli Alleli mutati (CYP2C19*2 e CYP2C19*3) sono associati ad una attività metabolica geneticamente difettosa o assente, diversamente distribuite a livello inter-individuale nelle diverse etnie (fra i caucasici la prevalenza è solo di 2-5% , mentre fra gli asiatici il "range" varia dal 12% nei Coreani al 70% nei nativi dell'isola di Vanuatu in Malesia).

Il CYP più rappresentato nel fegato umano e nell'intestino tenue è il CYP3A4, uno dei quattro membri conosciuti della famiglia di CYP3A (gli altri sono CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43). Il CYP è altamente polimorfo e contribuisce notevolmente alle variazioni nella biodisponibilità e nella clearance di molti xenobiotici. La Co-somministrazione di PPIs, dell'amoxicillina e della claritromicina è caratterizzata da sinergismo fra i farmaci, suggerendo un'interazione anche fra i componenti e i diversi genotipi del CYP.

SCOPO

Valutare il ruolo dell'assetto genotipico del CYP2C19 e del CYP3A4 nel eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori* in pazienti curati secondo la guida di riferimento di EHPSG.

In particolare abbiamo analizzato i due polimorfismi più importanti riguardanti il CYP2C19, vale a dire l'isoforma CYP2C19*2 e CYP2C19*3, nonché quelle riguardanti il CYP3A4 in particolare il CYP3A4*1B e i due polimorfismi recentemente scoperti, vale a dire CYP3A4*2 e CYP3A4*3.

I vari assetti ritrovati sono stati messi quindi in relazione al successo terapeutico.

POPOLAZIONE E METODI

Pazienti e Endoscopia

300 pazienti afferenti al Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia presso il policlino S. Orsola-Malpighi di Bologna con sintomi dell'apparato gastroenterico superiore e ritrovati positivi all'infezione da H pylori, sono stati arruolati in modo consecutivo in questo studio. Sono stati presi in considerazione solo pazienti mai trattati per l'infezione da H pylori.

Dallo studio sono stati esclusi coloro che avevano assunto antibiotici, preparati di bismuto o farmaci antisecretori (antagonisti H₂ o PPIs) durante le 4 settimane prima dell'endoscopia.

Tutte le endoscopie sono state effettuate sotto l'anestesia locale con lidocaina dallo stesso operatore (Professor Dino Vaira), usando un endoscopio Olympus GIF 100 video.

L'ulcera peptica è stata definita come una ulcerazione mucosa maggiore di 5 millimetri di diametro, mentre le caratteristiche istologiche della gastrite sono state classificate secondo il sistema aggiornato di Sydney .

All'endoscopia, due biopsie sono state prelevate dall'antro e due dal corpo per l'esame istologico (colorazione ematossilina-eosina e Giemsa).

Ulteriori prelievi biotipici sono stati prelevati dall'antro per l'esame culturale (effettuata sull'agar selettivo della Colombia arricchito con sangue di cavallo al 5% ad una temperatura di 37°C), e per il test rapido all'ureasi.

Secondo la guida di riferimento di EHPSG , i pazienti sono stati considerati positivi all'infezione da H pylori quando la coltura da sola era positiva e/o due o più prove risultavano positive (cioè, test rapido all'ureasi e colorazione di Giemsa nell'antro e/o nel corpo). I pazienti con qualunque altra combinazione dei risultati sono stati classificati come non infetti. Tutti i pazienti hanno controfirmato il consenso all'adesione allo studio. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Sant'Orsola.

Il trattamento e Follow Up:

Tutti i pazienti hanno ricevuto una triplice terapia per una settimana secondo le linee guida di riferimento dell'EHPHG , a base di omeprazolo 20 mg b.d., claritromicina 500 mg b.d e amoxicillina 1 g b.d.

Da 4 a 6 settimane dalla conclusione del trattamento, i pazienti hanno ripetuto l'esame endoscopico con prelievi biotici. In conformità alle linee guida di riferimento dell' EHPHG i pazienti sono stati considerati eradicati quando l'esame istologico, il test rapido all'ureasi e la coltura erano risultati tutti negativi per l'infezione del'H pylori .

La “compliance” del paziente è stata valutata anche chiedendo ai pazienti di restituire le confezioni dei farmaci prescritti.

I campioni di sangue e la purificazione del DNA:

Ad ogni paziente sono stati prelevati 8 ml di sangue in una fiala contenente sodio citrato e conservati a -80°C fino all'esecuzione dell'estrazione del DNA, tramite il protocollo modificato di Daly .

Brevemente, la purificazione è stata effettuata in un volume totale di 50 ml aggiungendo 42 ml di tampone di lisi (saccarosio 320 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, Tritone X-100 1%, Tris HCl 10 mmol/L, pH 7.4) a 8 ml di sangue intero. Dopo breve miscelazione è stato centrifugato a 3.000 g per 15 minuti a 4°C.

Il pellet è stato risospeso in 2 ml di una soluzione costituita da 150 mmol/L di NaCl, 60 mmol/L di acido etilenediamino-tetracetico [EDTA], solfato dodecilico di sodio all'1%, 400 mmol/L Tris HCl, pH 7.4 e successivamente in 0.5 ml di perclorato di sodio (5 mol/L).

La sospensione è stata mescolata meccanicamente per 15 minuti a temperatura ambiente e incubata a 65°C per 30 minuti. Il DNA è stato estratto aggiungendo 2 ml di cloroformio e meccanicamente mescolato per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi centrifugata a 3.000 g per 15 minuti.

Una volta condensatosi il DNA è stato concentrato mediante precipitazione aggiungendo 2 volumi di etanolo ghiacciato. Il DNA è stato poi purificato aggiungendo etanolo all'80% per due volte seguito da centrifugazione per 4 minuti (10.000 giri/min. a 4°C). Dopo esposizione a temperatura ambiente per 5-7 minuti è stato risospeso in Tris-EDTA .

PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Analisi del CYP2C19

Il gene wilde type CYP2C19 ed i due geni mutati, CYP2C19*2 e CYP2C19*3, sono stati identificati mediante PCR per mezzo di primer allele specifico. I seguenti primers sono stati sintetizzati da GIBCO-BRL (San Giuliano, Milanese, Italia) e sono stati utilizzati in questo studio: mlF, mlR m2F e m2R . Dopo PCR, gli ampliconi sono stati digeriti con una endonucleasi di restrizione.

I frammenti digeriti sono stati separati tramite l'elettroforesi su gel di agarosio al 4%, con un indicatore del peso molecolare del DNA . I tipi wilde type sono stati identificati per mezzo della presenza di due bande nel gel di agarosio.

Analisi del CYP3A4*1B

Un frammento genomico di 501-bp PCR che corrisponde ad una parte del promotore e ad una parte di esone 1 del gene CYP3A4 è stato amplificato dal DNA genomico umano, per mezzo dei primers CYP3A4 3B e CYP3A4 2B .

E' stata poi effettuata una seconda PCR con un primer denaturato CYP3A4 den2F e con un primer normale CYP3A4 2B. Dopo taglio con l'enzima di restrizione in over night i frammenti sono stati separati tramite l'elettroforesi su gel di agarosio al 4%. L'enzima utilizzato ha tagliato l'allele omozigote in tre parti; l'allele eterozigote in quattro parti e l'allele tipo wilde type in due parti.

Analisi del CYP3A4*2

Per questo allele è stato amplificato un frammento di 364-bp utilizzando i primers CYP3A4 7F2 e di CYP3A4 7R2 . E' stato utilizzato per una seconda PCR un primer denaturato CYP3A4 M3 più un primer normale di CYP3A4 7R2. Gli alleli sono stati distinti tramite digestione enzimatica con endonucleasi Mnl ed evidenziati tramite elettroforesi. Mnl I ha tagliato l'allele tipo wilde type in due parti.

Analisi del CYP3A4*3

Un frammento genomico di 401-bp PCR corrispondente all'esone 12 del gene CYP3A4 piu' AG e GT è stato amplificato da DNA genomico umano, usando CYP3A4 12F e CYP3A4 12R . La mutazione è stata identificata tramite digestione in over night con endonucleasi BssSI a 37°C ed è stata confermata con l'elettroforesi su gel di agarosio al 4%. BssSI taglia l'allele eterozigote in due parti .

Sequenziamento:

I pazienti eterozigoti o omozigoti per la mutazione sono stati sequenziati utilizzando uno dei primers utilizzati per la PCR .

Il sequenziamento del DNA è stato effettuato per mezzo di un sequenziatore Applied Biosystem, le sequenze sono state analizzate dal programma di MacVector (gruppo molecolare di Oxford, Campbell, CA) .

Analisi statistica

Per il calcolo statistico sono stati utilizzati il metodo suggerito da Newcombe per valutare i pazienti eradicati e non. Inoltre sono stati utilizzati i metodi del Chi-square test, Fisher's exact test e le regressioni logistiche multiple, sono stati considerati significativi differenze inferiori a 0.05.

RISULTATI

Nessuno dei 300 pazienti arruolati sono stati persi al follow-up. Le caratteristiche demografiche ed endoscopiche della popolazione sono indicate in tabella 1.

A seguito della terapia eradicante, l'infezione da H pylori e' stata eradicata in 195 pazienti mentre i rimanenti 105 sono rimasti positivi, in conformità al "gold standard" istologico utilizzato nei trials clinici per H. pylori. La prevalenza dei vari genotipi è indicata nella tabella 2.

In particolare, per quanto riguarda il genotipo CYP2C19, 243 pazienti sono stati riconosciuti omozigoti wilde type CYP2C19 *1/*1 ,identificati quindi come omozigoti alti metabolizzatori (homEM), 52 pazienti avevano il genotipo CYP2C19*1/*2 o il genotipo CYP2C19 *1/*3, identificati quindi come eterozigoti alti metabolizzatori (hetEM) e 5 pazienti , il genotipo CYP2C19 *2/*2 ,identificati come omozigoti bassi metabolizzatori (PM).

Per quanto riguarda CYP3A4, 251 pazienti possedevano il genotipo CYP3A4*1/*1, 34 con una singola mutazione di CYP3A4*1B, 8 con una singola mutazione CYP3A4*2, 4 con mutazione CYP3A4*3 e un tre pazienti con una doppia mutazione CYP3A4*1B, CYP3A4*2.

I tassi di eradicazione dell'H pylori in relazione al genotipo sono indicati in tabella 3.

L'unico genotipo significativamente associato ad una bassa percentuale di eradicazione era il CYP2C19 homEM, sia da analisi monovariate (OR 4.34, 95% CI = 1.27-4.82) che multivariate (OR 3.45, 95% CI = 1.11-10.70).

DISCUSSIONE

In questo studio di farmacogenomica abbiamo scelto di analizzare l'influenza specifica e combinata dei genotipi CYP2C19 e CYP3A4 in quanto i PPIs sono stereoselettivamente metabolizzati principalmente da CYP2C19 (ed in minor grado da CYP3A4) e la claritromicina è principalmente convertita nel suo metabolita attivo, 14-idrossi-claritromicina, da CYP3A4.

Esiste anche l'evidenza del coinvolgimento di CYP3A4 nel metabolismo del metronidazolo. Anche se l'amoxicillina non è metabolizzata direttamente da nessun membro della famiglia di CYP, la co-somministrazione con farmaci metabolizzati dai membri della famiglia del CYP influenzano la sua farmacocinetica. Effettivamente, la co-somministrazione di omeprazolo e claritromicina rende l'amoxicillina più stabile nello stomaco. Questa interazione favorevole dei farmaci costituisce il razionale delle raccomandazioni terapeutiche EHPSG per l'eradicazione del *H pylori*. Quindi, le differenze dei genotipi CYP2C19 e CYP3A4 fra la popolazione trattata possono contribuire a spiegare le diverse risposte al trattamento.

I dati ottenuti dal nostro studio su una popolazione di 300 individui *H pylori* positivi forniscono un chiariscono il ruolo dei genotipi CYP2C19 e CYP3A4 nel successo terapeutico in una popolazione caucasica. L'eradicazione è stata valutata attraverso l'esame istologico che rappresenta il gold standard dell' EHPSG. 195 pazienti sono stati eradicati mentre i rimanenti 105 sono risultati infetti anche dopo il trattamento eradicante. L'analisi delle differenze nella distribuzione dei genotipi hetEM e homEM CYP2C19 fra gli eradicati ed i non eradicati (tabella 3) ha indicato che i portatori di homEM hanno ottenuto risultati significativamente peggiori rispetto ai portatori di hetEM (147/244 60.2% e 44/52 84.6% rispettivamente).

Sia all'analisi univariata che multivariata (sesso, età e genotipo CYP3A4) il genotipo homEM è associato ad una maggiore percentuale di insuccesso terapeutico.

Nella popolazione asiatica, in cui il genotipo CYP2C19 hetEM è molto più comune, è risaputo che i portatori di questo assetto genomico hanno un più alto successo terapeutico rispetto ai homEM. I nostri risultati evidenziano che questo principio può essere mantenuto fra i caucasici, malgrado la più bassa prevalenza sia della condizione eterozigote (hetEM) sia del genotipo omozigote “bassi metabolizzatori PM” renda più difficilmente analizzabili, a livello statistico, le differenze di eradicazione tra questi gruppi.

Queste osservazioni potrebbe contribuire a spiegare perchè i più alti tassi di eradicazione sono realizzati comunemente fra i pazienti asiatici.

Contrariamente a CYP2C19, la prevalenza dei polimorfismi CYP3A4 è molto più alta nei caucasici che negli asiatici. I nostri dati per quanto riguarda l'influenza relativa dei genotipi CYP3A4 e delle loro differenti combinazioni con genotipi CYP2C19 sull'eradicazione dell'H pylori non sono risultati significativi probabilmente. Tuttavia, i nostri dati forniscono indicazioni che potrebbero influenzare i genotipi CYP3A4 nell'eradicazione dell'H pylori. Infatti i portatori di polimorfismi CYP3A4 hanno realizzato tassi favorevoli di eradicazione similmente ai pazienti portatori di CYP2C19 (74% 35/47, e 85.7% 48/56 rispettivamente).

Infatti tutti i pazienti con la variante CYP3A4*2 sono stati eradicati e soltanto 29% di coloro che avevano la variante CYP3A4*1B non sono stati eradicati (inclusendo i pazienti con una doppia mutazione CYP3A4). È inoltre interessante che tutti i portatori di polimorfismi CYP3A4 nel sottogruppo dell'hetEM CYP2C19 siano stati curati, suggerendo la possibilità di sinergismo positivo tra CYP3A4 e CYP2C19.

In conclusione, i nostri risultati indicano che nei caucasici, come nelle popolazioni asiatiche, i genotipi CYP2C19 sono rilevanti per l'efficacia della terapia eradicante per l'infezione da H pylori. I futuri studi su grandi popolazioni caucasiche richiedono una verifica di queste ipotesi.

Tali studi, che dovrebbero anche considerare l'influenza della resistenza antibiotica (una limitazione del lavoro attuale), potrebbero identificare i fattori prognostici relativi all'eradicazione dell'H. pylori. Anche se la selezione sistematica di genotipo nel pre- trattamento dei pazienti infetti

da H pylori può attualmente sembrare poco pratica, l'utilizzo di metodiche meno costose e più rapide per l'individuazione del genotipo potrebbe finalmente fornire vantaggi importanti in termini di costi e benefici di questa come di altre patologie in cui è necessario conoscere l'assetto genomico individuale.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche ed endoscopiche della popolazione studiata

Caratteri	
Eta' media	53(13.74)
Rapporto Maschi/Femmine	140/160
Normali	206
Esofagite	44(14.7%)
Esofago di Barrett	4(1.3%)
Ulcera gastrica	8(2.7%)
Ulcera duodenale	38(12.7%)

Tabella 2. Prevalenza dei genotipi CYP2C19 e CYP3A4 nella popolazione studiata

Genotipo	Numero(%)
CYP2C19*1/*1(homEM)	243 (81)
CYP2C19*1/*2 e CYP2C19*1/*3(hetEM)	52 (17.3)
CYP2C19*2/*2(PM)	5 (1.7)
CYP3A4*1/*1	251 (83.7)
CYP3A4*1B	34 (11.3)
CYP3A4*2	8 (2.7)
CYP3A4*3	4 (1.3)
CYP3A4*1B+3°4*2	3 (1)

Tabella 3. Tassi di eradicazione dell'H pylori in relazione al genotipo

Genotipo	Pazienti eradicati (n=195) %(n)	Pazienti non eradicati %(n)
CYP2C19		
CYP2C19*1/*1(homEM)	75.3(147/195)	92.4(97/105)
CYP2C19*1/*2 e	22.6(44/195)	7.6(8/105)
CYP2C19*1/*3(hetEm)		
CYP2C19*2/*2-(PM)	2(4/195)	0(0/105)
CYP3A4		
CYP3A4*1/*1	81.5(159/195)	87.6(92/105)
CYP3A4*1B	12.8(25/195)	7.6(8/105)
CYP3A4*2	4.1(8/195)	0(0/105)
CYP3A4*3	1(2/195)	1.9(2/105)
CYP3A4*1B+3A4*2	0(0/195)	1.9(2/105)

Bibliografia

1. Woodward M, Morrison C, McColl KEL. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 175-181.
2. Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knayer U, Gonser T, Adler G, Brenner H. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J Infect Dis* 1999; 179: 398-402.
3. Stevenson TH, Bauer N, Lucia LM, et al. Attempts to isolate *Helicobacter pylori* from cattle and survival of *Helicobacter pylori* in beef products. *J Food Prot* 2000; 63: 174-178.
4. Holton J, Vaira D, Menegatti M, Miglioli M.
Helicobacter pylori Therapy: advance and opportunities.
Mosby-Wolfe.
5. Dent J. Review article: is *Helicobacter pylori* relevant in the management of reflux disease?
Aliment Pharmacol Ther 2001; 15 (suppl 1): 16-21.
6. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Infection with *Helicobacter pylori*. In: *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. Lyon: IARC, 1994: 177-202
7. Feldman RA. Review article: would eradication of *Helicobacter pylori* infection reduce the risk of gastric cancer? *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15 (suppl 1): 2-5.

8. Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. Helicobacter pylori associated gastric B-cell MALT-lymphoma: predictive factors for regression. *Gut* 2001; 48: 290-292.
9. Rotimi O, Cairns A, Gray S, Moayyedi P, Dixon MF. Histological identification of Helicobacter pylori: comparison of staining methods. *J Clin pathol* 2000; 53: 756-759.
10. Vaira D, Vakil N. Blood, urine, stool, breath, money and Helicobacter pylori. *Gut* 2001; 48: 287-89.
11. Lassen AT, Pederson FM, Bytzer P et al. Helicobacter pylori test-and eradicate versus prompt endoscopy for management of dyspeptic patients: a randomised trial. *Lancet* 2000; 356: 855-860
12. De Boer WA, Tytgar GNJ. Treatment of Helicobacter pylori infection. *BMJ* 2000; 320: 31-34.
- ¹³ Sacket DL, Haynes BR, Guyatt GH, Tugwell P. Clinical Epidemiology: a basic science for clinical medicine. In Little, Brawn and COMPANY, II edition, 1985.
- ¹⁴ Sharma P, Vakil N. Review Article: Helicobacter pylori and reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 297-305.
- ¹⁵ Laine L, Estrada R, Trujillo M, Knigge K, Fennerty MB. Effect of Proton Pump Inhibitor Therapy on Diagnostic Testing for Helicobacter pylori. *Ann Intern Med* 1998; 129: 547-50.
- ¹⁶ Manes G, Balzano A, Iaquinto G, Ricci C, Piccirillo MM, Giardullo N, Todisco , Lioniello M, Vaira D. Accuracy of the stool antigen test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection before treatment and in patients on omeprazole therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 73-9.

¹⁷ Bravo LE, Realpe JL, Campo C, Mera R, Correa P. Effects of acid suppression and bismuth medication on the performance of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 2380-83.

¹⁸Parente F, Sainaghi M, Sangaletti O, Imbesi V, Marconi G, Anderloni A, Bianchi Porro G. Different effects of short term omeprazole, lansoprazole or pantoprazole on the accuracy of the ¹³C-urea breath test. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 553-57.

¹⁹ Connor SJ, Seow F, Ngu MC, Katelaris PH. The effect of dosing with omeprazole on the accuracy of the ¹³C-urea breath test in *Helicobacter pylori* infected subjects. *Aliment pharmacol Ther* 1999; 13: 1287-93.

²⁰Dulbecco P, Gambaro C, Bilardi C, Zentilin P, Mele MR, Mansi C, Biagini R, Tessieri L, Iiritano E, Usai P, Vigneti S, Savarino V. Impact of long term ranitidine and pantoprazole on accuracy of ¹³C-urea breath test. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 315-21.

²¹Savarino V, Bisso G, Pivari M, Zentilin P, Bilardi C, Dulbecco P, Mele MR, Tracci D, Vigneti V. Effect of gastric acid suppression on ¹³C-urea breath test: comparison of ranitidine with omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 291-97.

²²Shirin H, Frenkel D, Shevah O, Levine A, Bruck R, Moss SF, Yaron N, Avni Y. Effect of proton pump inhibitors on the continuous real time ¹³C urea breath test, *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 46-50.

²³Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999; 45(Suppl 2): II37-II42.

- ²⁴ Working party of the European Helicobacter pylori Study Group. Technical annex: tests used to assess Helicobacter pylori infection. In : Guidelines for clinical trials in Helicobacter infection. Gut 1997; 41 (suppl 2): S10-18.
- ²⁵ Dixon MF, Genta RM, Yardley JJJH, et al. Classification and grading of gastritis: the update Sydney System. Am J Surg Pathol 1996; 20: 1161-81.
- ²⁶Gatta L, Vakil N, Ricci C, Hosborn J, Tampieri A, Perna F, Miglioli M, Vaira D. A rapid, low dose ¹³ C urea tablet for the detection of Helicobacter pylori infection before and treatment. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 793-798.
- ²⁷ Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon ATR, Delterne M, Hirschl A, Gasbrrini G, O' Morain C, Pajares JG, Quina M, Taaytgat GNNJ& European Helicobacter pylori HPSA study Group. Diagnosis of Helicobacter pylori using a novel , noninvasive antigen based assay in a European multicentre study. Lancet 1999; 354: 30-33.
- ²⁸Altman DG, Diagnostic tests. Statistics with Confidence. Second edition. Edited by Altman DG, Machin D, Trevor NB, GardnerMJ. BMJ Books 2000.
- ²⁹MalfertheinerP, Megraud F, O'Morain C, et al. Ccurrent concepts in the managment of Helicobacter pylori infection The Maastricht 2-2000 Consensus REPORT. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 167-180.
- ³⁰Rektorschek M, Weeks D, Sachs G, et al. Influence of ph on metabolism and urease activity of H pylori. Gastroenterology 1998, 115: 628-41.

³¹Chey WD, Chantadi KV, Montague J et al. Intra-gastric acidification reduces the occurrence of false negative urea breath test results in patient taking a proton pump inhibitor. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1028-32.

³²Thitiphuree S, Talley NJ (2000). Esomeprazole, a new proton pump inhibitor: pharmacological characteristics and clinical efficacy. *International journal of Clinical Practice* 54: 537-41.