



Validación de un test de Ureasa para diagnóstico de *Helicobacter Pylori* (H.P), en comparación con el CLOtest y en referencia a la Histología

Gustavo Calle • Telmo Galindo ••

Resumen

Introducción.

Tests de ureasa no comercializados se utilizan para el diagnóstico del H.P. Tienen la ventaja de su bajo costo, lo que es importante para un considerable número de pacientes; por otra parte, en nuestro medio, existe la necesidad de incrementar técnicas propias de diagnóstico validadas con rigor metodológico. La literatura recomienda que los tests en mención sean debidamente investigados en los lugares donde ellos se utilizan.

Objetivo.

Validar una preparación de test de ureasa hecha en nuestra unidad ("test de laboratorio") comparándola con el CLOtest y teniendo como "gold estándar" a la histología.

Métodos.

Estudio de validación de tests de ureasa, prospectivo, randomizado y con enmascaramiento de resultados en pacientes con sintomatología digestiva e indicación de endoscopia. En un mismo paciente se tomó muestras de biopsia gástrica antral que se destinaron al azar para el test de laboratorio (urea pura en urea agar base con rojo fenol, como indicador de pH) y el CLOtest (Delta West Limited, Australia); dos muestras adicionales fueron para el estudio histológico. Se excluyeron a pacientes que días antes habían tomado medicación susceptible de alterar el diagnóstico de H.P. La lectura de resultados de los tests se realizó por diferentes personas que desconocían otros resultados; el patólogo desconocía los resultados de los tests de ureasa.

Resultados.

Fueron incluidos 105 pacientes (edad media 45.43 años $\pm$ 17 DS). El 70,4% de pacientes fueron positivos al examen por histología mientras que el 63,8% y 65,8% lo fueron al test de laboratorio y CLOtest, respectivamente ($p > 0,05$). En referencia a la histología, el valor global del test de laboratorio fue 93,33%

(95% IC: 86,27 – 97,04), con 7 falsos negativos y sin falsos positivos. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo fueron 90,54%, 100%, 100% y 81,57% respectivamente. Los resultados del CLOtest fueron similares: valor global de 95.23% (95% IC: 88,70 – 98,23), 5 falsos negativos y ningún falso positivo. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo fueron 93,24%, 100%, 100% y 86,11% respectivamente. Ninguno de los parámetros mostró diferencias significativas ($p > 0,05$). El tiempo de reacción de los test fue similar.

Conclusión.

La validación de nuestro test de laboratorio (con fórmula y procedimiento especificados), proporcionó resultados similares al CLOtest, ambas pruebas en referencia a la histología. Es evidente la significativa diferencia de precios entre los tests de ureasa comparados.

Palabras claves: Test ureasa, validación. CLOtest. Histología y *Helicobacter Pylori*

Summary

Background.

Non commercial ureasa tests are used to detect *Helicobacter pylori*. They have the advantage of its low cost. The necessity has been revised of carrying out clinical studies that validate them appropriately, in the places where they are used.

Objective.

To validate a preparation of ureasa test made in our unit ("laboratory test") in comparison with CLOtest and histologic result.

Methods.

prospective, randomized study of ureasa tests validation and results comparison, in patients with digestive symptoms and endoscopy indication.

• Médico Gastroenterólogo. Profesor de la Facultad de Ciencias Médicas. Centro de Enfermedades Digestivas, Clínica España
•• Microbiólogo. Profesor Microbiología. Facultad de Ciencias Médicas. Cuenca, Ecuador.

Random gastric antral biopsies were performed for the CLO-test and the lab test. In addition, two biopsies were performed for the histological study. We excluded patients who had recently taken medication that could change the HP diagnosis. The evaluation of the results was independently carried out.

Results.

105 patients were included (mean age 45.43 ± 17 DS). 70.4% tested positive on the histological exam, whereas 65.8% and 64.3% tested positive on the CLO-test and on the lab test respectively: these differences were not statistically significant ($p > 0.05$). The global value of the laboratory test was 93.33% (95% IC: 86.27 – 97.04); with 7 false negative and no false positive. The sensitivity, specificity, value positive and negative predictive values were 90.54%, 100%, 100% and 81.57% respectively. The results of the CLOtest were similar: global value of 95.23% (95% IC: 88.70 – 98.23); 5 false negative and no false positives. The sensitivity, specificity, value positive and negative predictive values were 93.24%, 100%, 100% and 86.11% respectively. None of the parameters showed significant differences ($p > 0.05$). The reaction times of the tests were similar.

Conclusion.

The validation of our laboratory test provided similar results to the CLOtest.

Introducción

Se considera que una de las enfermedades infecciosas crónicas más frecuentes de la actualidad es la ocasionada por la bacteria *Helicobacter Pylori* (1)(H.P). En ciertas localidades de países en desarrollo pueden hallarse prevalencias superiores al 80%(2). El H.P tiene rol protagónico en la etiopatogenia de la úlcera péptica, gastritis crónica activa y ha sido considerado un factor de riesgo de primer grado en el desarrollo del cáncer gástrico(3).

Para el diagnóstico de la infección existen varios métodos, los que son agrupados en invasivos y no invasivos, según requieran o no endoscopia y biopsia en el diagnóstico.

La infección suele ocasionar clínicamente un síndrome dispeptico con o sin síndrome de reflujo gastroesofágico, los cuales tienen definiciones comúnmente aceptadas (4,5). En pacientes con dichos síndromes, úlcera gastroduodenal, patología esofágica y cáncer gástrico pueden sumar hasta el 40% de etiologías diagnosticadas por endoscopia(6). Se ha tratado de correlacionar las manifestaciones clínicas

con el diagnóstico endoscópico en la úlcera péptica(7) y en otros diagnósticos sin resultados positivos. En la actualidad las indicaciones del examen endoscópico obedecen a recomendaciones de consenso(8).

La importancia del diagnóstico de la infección por H.P radica en que ésta debe ser necesariamente tratada en pacientes con úlcera, linfoma de Malt y en caso de gastrectomía por cáncer gástrico. En la dispepsia no ulcerosa, catalogada así luego de endoscopia(9) se discute si el tratamiento es eficaz y útil. Investigaciones de meta-análisis se inclina por el tratamiento(10,11).

El diagnóstico histológico de las biopsias gástricas obtenidas por endoscopia constituye el examen confirmatorio del grado de lesión de la mucosa y permite con alta precisión el diagnóstico de la bacteria, constituyendo una prueba de referencia en estudios de validación de métodos diagnósticos (12).

Desde su origen y primeras publicaciones en 1985, los test de ureasa, que utilizan igualmente la muestra de biopsia gástrica obtenida por endoscopia, demostraron un rendimiento diagnóstico similar a la histología. Se basan en la potente actividad de la ureasa de la bacteria que hidroliza a la úrea agar gel del test para formar bicarbonato y amoníaco, elevando el pH, lo cual es detectado por el indicador rojo fenol. El CLOtest fue el primero en utilizarse y permanece como el test de referencia(13) cuando se valoran nuevos test con fines de mejorar la relación costo/beneficio y rapidez de acción.

En este sentido, se han valorado tests de ureasa no comercializados realizados en laboratorios locales, llamados también test “caseros.” Estas investigaciones han proporcionado resultados entre aceptables a óptimos (14,15,16). A pesar que la obtención del test es simple y obedece a fórmula y procedimientos estándares, una reciente publicación refiere la necesidad de una apropiada validación de dichos tests en los diferentes lugares en los que se utiliza (17). Algunos estudios han valorado el costo de estos tests demostrando que son muy inferiores a los que actualmente existen en el mercado (18,19).

La ventaja del test de ureasa sobre el examen histológico es su facilidad de interpretación y rapidez en obtención de resultados, los que generalmente se disponen en pocas horas, necesitando esperar como máximo 24 horas para su lectura final. En la actualidad es la prueba más recomendada para el diagnóstico de infección por H.P durante el examen endoscópico el resultado del test determina el tratamiento a seguir mientras se espera el diagnóstico histológico, en aquellos pacientes

que requirieron de este último examen, puesto que el test no diagnostica el estado lesional de la mucosa gástrica.

En nuestro medio no existe investigación que valide el uso de tests obtenidos en laboratorios de microbiología. Nuestro laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas elabora tests para la detección de H.P sujetándose a las normas establecidas. De esta manera se evita adquirir tests importados de mayor costo y se puede disponer de ellos con mayor facilidad. Resta conocer si pasa una prueba de validación con rigor metodológico.

El objetivo del presente estudio fue validar nuestro test de laboratorio en comparación con el CLOtest, y en referencia al resultado histológico.

Metodología

El presente es un estudio prospectivo y randomizado de validación de tests de ureasa en pacientes con sintomatología digestiva: síndrome dispéptico y/o de reflujo gastroesofágico e indicación de endoscopia, que acudieron a nuestra unidad entre marzo y noviembre del 2002.

Definición de variables.

Se consideró que un paciente presentaba síndrome dispéptico cuando al interrogatorio refería dolor (generalmente en epigastrio) y/o "malestar abdominal", recidivante o persistente, supraumbilical (4).

El reflujo gastro esofágico se definió por la presencia de regurgitaciones y/o pirosis(5). Tanto el test de ureasa de laboratorio, como el CLOtest fueron positivos cuando cambiaron su color inicial al rosa o rojo. La histología se reportó positiva cuando el patólogo constató la presencia de bacilos en la muestra. La variable de información adicional diagnóstico endoscópico se ciñó a las definiciones y clasificación recomendadas por la OMED (Organización Mundial de Endoscopia Digestiva) (Anexo 1).

Muestra. Criterios de inclusión y exclusión.

Se consideró un tamaño muestral de 105 pacientes. Se incluyó pacientes de ambos géneros con edades entre 18 y 80 años, que no recibieron tratamiento para H.P al menos 2 años antes y que luego de ser debidamente informados, firmaron su autorización de ser parte del estudio.

Se excluyó los pacientes que habían tomado antibióticos susceptibles de actuar sobre el H.P durante el mes anterior al estudio. También se excluyó a los que habían

tomado inhibidores de bomba de protones hasta 8 días antes y bloqueadores de receptores H2 hasta 1 día antes del inicio del estudio. Estos tratamientos pueden producir aclaramiento de la bacteria, sobre todo en zona antral gástrica, y proporcionar falsos negativos(20). Los pacientes con presencia de sangre en el estómago fueron excluidos debido a que la sangre disminuye la sensibilidad del test(21), y finalmente se excluyeron a pacientes con trastornos de la coagulación y riesgo de sangrado a las biopsias.

Procedimiento.

Durante la consulta médica se llenó la parte inicial de un formulario, que sería completado luego de los resultados de los diferentes exámenes. (Anexo 2)

Se seleccionaron 105 pacientes, que cumplieron criterios de inclusión y exclusión, y se realizaron durante el examen endoscópico 4 biopsias en cada paciente, obtenidas de sitios cercanos de la región antral a más de 2 cm del píloro ya sea de pequeña o gran curvatura. Una de las biopsias se colocó en el tubo del test de laboratorio y luego se mantuvo a la temperatura ambiente oculta dentro de un recipiente. El test fue leído por el endoscopista a las 6 horas y a las 24 horas. El cambio del color amarillo inicial al rosa o rojo significó reacción positiva del test y si no hubo cambio de color a las 24 horas el resultado se consideró negativo. No se consideró el cambio de color después de las 24 horas, debido a que la positividad más allá de este tiempo puede relacionarse con la presencia de enterobacterias y *Pseudomona* sp, que pueden estar presentes en pacientes hipo o aclorhídricos(22).

Otra muestra de biopsia se colocó en el recipiente del CLOtest, el que igualmente se mantuvo a la temperatura ambiente, oculto dentro de un recipiente. Este fue leído por la auxiliar de endoscopia a las 6 y 24 horas.

La etiqueta del test señala cuándo debe considerarse positivo y negativo en relación con los colores amarillo y rosa respectivamente, de manera similar a lo descrito para el test de laboratorio. Igualmente el tiempo de lectura máximo fue de 24 horas y no tuvo validez cualquier cambio de color más allá de esta hora. (Anexo 3: imágenes del test de Laboratorio y CLOtest).

El orden de utilización del test se randomizó de acuerdo al número de ingreso al estudio: el test de laboratorio fue primero si el número era impar y el CLOtest fue primero si el número era par.

La lectura de los observadores fue independiente, es decir, sin conocer el resultado del otro test. Finalmente,

se tomaron dos biopsias para el estudio histológico las que fueron vehiculizadas en frascos con formalina al 10% y su tinción fue con hematoxilina-eosina o tinción de Genta según criterio del patólogo experto en la materia, quién desconocía los resultados de los test.

Si los dos test de ureasa coincidían ya sea como positivos o como negativos y el resultado de histología era diferente, se requirió el diagnóstico de un segundo experto en patología. En los casos que no coincidieron los dos patólogos, un tercero dirimió el diagnóstico. De esta manera el resultado histológico constituyó el “gold standar” para la validación.

Procedencia de los test de laboratorio.

Nuestro test de laboratorio es realizado por la unidad de microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la siguiente manera:

1. Componente A: Urea pura certificada (Laboratorio Merk. Darmstadt. Germany): 2gr de Urea, se mezcla en 15cc de agua destilada y se esteriliza por filtración de membrana.
2. Componente B: agar urea base (Peptona 1.0g. Glucosa 10g, ClNa 5.0g, Rojo de Fenol 0.012g, Agar 12g): 2.1gr de este componente, se mezcla con 85cc de agua destilada y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. Mezcla de componentes: cuando el componente B se halla a 50°C se mezcla con el componente A y antes de su solidificación se dispersa 1.5cc en tubos de laboratorio.
4. Almacenamiento: se realiza en refrigeración a 4°C y puede ser útil al menos 3 meses; cuando existen cambios espontáneos de color indican que no son aptos para su utilización.

La elaboración del test fue simple y su bajo costo similar a los ya establecidos en otros estudios. Una investigación piloto sirvió de control de calidad.

Procedencia del CLOtest.

Los CLOtest son de importación, manufacturados por Delta West Limited. Bentley. Western Australia.

Aspectos Éticos.

Luego de la correspondiente información al paciente se obtuvo su autorización por escrito como condición para incluirlo al estudio (“Consentimiento Informado”) (Anexo 4). El protocolo incorporó las sugerencias del comité de ética para su aprobación.

Análisis de datos.

El procesamiento y análisis de datos se hizo a través de una matriz en SPSS en la que se obtuvo la media de

edad, frecuencia de variables adicionales y los falsos positivos y negativos de los test de ureasa en relación a la histología. Para el análisis de validación: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, valor global de la prueba con sus Intervalos de Confianza, de utilizó Epidat. En el estudio comparativo se aplicó el Chi cuadrado para diferencias de proporciones con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Resultados

Cientocinco pacientes con síndrome dispéptico, 55 hombres y 50 mujeres, con edad media 45.43 $\pm$ 17 DS y procedencia urbana en su mayoría, 77%, fueron examinados por video endoscopia. Se realizó en total 105 biopsias para cada test de ureasa y 210 para el estudio histológico. No hubo complicaciones en los procedimientos. Los principales diagnósticos fueron en 16.4% úlcera péptica, 2.8% carcinoma gástrico, 6.6 esofagitis por reflujo, 8.5 examen normal y el resto, gastropatías de diversa índole.

De los 105 pacientes investigados, 74 (70,4 %) tuvieron H.P a la de histología, mientras que 67 (63,8%) lo tuvieron con nuestro test de laboratorio y 69 (65,8%) con el CLOtest; estos diferentes resultados no revelan significancia estadística ($p > 0.05$)

Nuestro test de laboratorio proporcionó 7 falsos negativos y ningún falso positivo, mientras que el CLOtest obtuvo 5 falsos positivos e igualmente ningún falso negativo. Las tablas de contingencia 1 y 2 nos muestran estos resultados comparados con el resultado histológico (“gold standar”).

Tabla 1. Tabla de contingencia: Test de Laboratorio Vs diagnóstico Histológico

	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO		TOTAL
Test de Laboratorio	Positivo	Negativo	
Positivo	67	0	67
Negativo	7	31	38
Total	74	31	105

Tabla 2. Tabla de contingencia CLOtest Vs diagnóstico histológico

			TOTAL
CLOtest	Positivo	Negativo	
Positivo	69	0	69
Negativo	5	31	36
Total	74	31	105

Con el software Epidat se obtiene los siguientes resultados: valor global del Test de laboratorio 93,33% (95% IC: 86,27 – 97,04) La sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo son de 90,54%, 100%, 100% y 81,57% respectivamente. La categorización errónea corresponde al 6,67%

Los resultados del CLOtest son los siguientes: valor global de la prueba 95.23% (95% Intervalo de Confianza-IC: 88,70-98,23). La sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo y negativo son 93,24%, 100%, 100% y 86,11% respectivamente. La categorización errónea 4,77%.

La tabla 3 compara los resultados de la validación de los dos tests, demostrando que existe similitud entre los mismos, en efecto las diferencias, que son leves, no tienen valor significativo estadísticamente ($p>0.05$).

V.P.P: valor predictivo positivo. V.P.N: valor predictivo negativo. V Global: valor global. C. Errónea: categorización errónea.

Tanto los CLOtest como los test de laboratorio, dieron resultados positivos en un 97% de casos a las 6 horas; los restantes 3% fueron positivos a 24 horas.

Tabla 3. Comparación de parámetros de validación entre CLOtest y test de laboratorio

PRUEBA	Sensibil.	Especif.	V. P.P.	V. P.N.	V. Global	C errónea
CLOtest	93.24%	100%	100%	86.11%	95.23%	4.77%
Test de Lab	90.54%	100%	100%	81.57%	93.33%	6.67%
Chi2 p <0.05	p >0.05			p> 0.05	p> 0.05	p> 0.05

Discusión.

Tanto nuestro test de laboratorio como el CLOtest demostraron tener una óptima especificidad (100%), es decir, no proporcionaron falsos positivos y por consiguiente su valor predictivo positivo fue de 100%. El resultado positivo del Test de ureasa, obtenido en pocas horas, autoriza un tratamiento de erradicación del H.P en los casos que lo amerita.

En lo que respecta a la sensibilidad el test de laboratorio se reveló ligeramente inferior al CLOtest (90.54% vs 93.24%: $p>0.05$). La sensibilidad de test de ureasa se reduce si la densidad bacteriana es débil (inferior a 10^7 bacterias)(23), lo que explicaría que aquella se halle alrededor del 92% frente a la histología la que si está en posibilidad de visualizar bacterias aunque fuesen escasas.

El uso adicional de una biopsia tomada del cuerpo gástrico no ha demostrado aumentar la sensibilidad en el diagnóstico, aunque podría ser útil en ciertas circunstancias como en el control post tratamiento (24), o como se ha comprobado en caso de úlcera gástrica, debido probablemente a la elevada prevalencia de atrofia antral con metaplasia intestinal que con frecuencia acompaña a la úlcera gástrica, lesiones que no son el hábitat del H.P y en donde la bacteria podría encontrarse en menor densidad(25). Es probable que al menos 3 de nuestros pacientes con úlcera gástrica y resultado negativo en los test de ureasa, se hubieran beneficiado de una biopsia adicional del cuerpo y quizás mejorado la sensibilidad de los test.

En caso que un test de ureasa resultara negativo, se justifica completar su investigación con otro método tal como lo recomienda la American College of Gastroenterology² Se ha demostrado que los diferentes métodos tienen una excelente especificidad, mas la sensibilidad se sitúa entre el 90 y 95%. La combinación de dos técnicas puede incrementar la sensibilidad virtualmente al 100%, se recomienda que en ensayos clínicos controlados se evalúen tratamientos(26).

Vale remarcar que todos los parámetros de validación de los tests de ureasa en comparación o son similares o sus diferencias son pequeñas sin significación estadística ($p>0.05$). Los resultados son equivalentes a los obtenidos en investigaciones sobre tests “caseros” o “locales” que se han realizados en otros países, los más recientes, de manera paralela a nuestra estudio (27,28).

El orden de utilización del test fue hecho aleatoriamente y la interpretación de resultados de manera independiente. Esto evitó sesgos de interpretación.

La administración previa de simeticona (29) y xilocaína (30) comúnmente utilizados en endoscopia, como la inserción previa de la pinza de biopsia en formalina(31) no alteran el rendimiento de los test de ureasa. Tampoco este depende del tamaño de la muestra de biopsia, aunque es probable que ésta se relacione con la velocidad de positividad (32).

Se ha referido que el tipo y concentración del búffer

puede influenciar en la velocidad del resultado positivo y el tiempo de almacenamiento (17); nuestra concentración del 2% proporciona una positividad a las 6 horas de 97% similar al CLOtest de más reciente comercialización. La preparación que se utiliza en nuestro test permitiría un almacenamiento prolongado en refrigeración a 4°C, suficiente para su utilización.

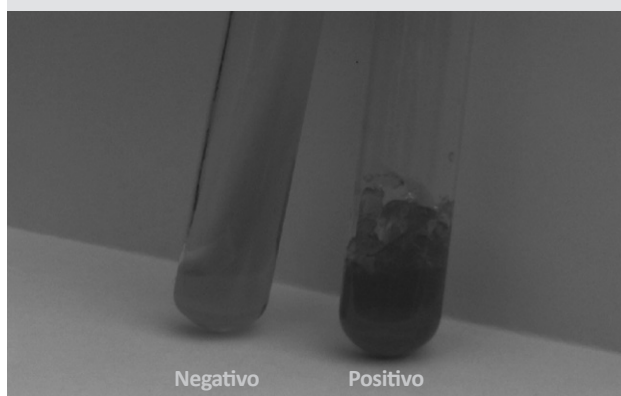
Nuestro estudio no incluye datos y análisis sobre el costo del test de laboratorio; sin embargo, hemos de señalar que los materiales y proceso de elaboración son simples y estándares, y por consiguiente los costos en la obtención del producto se han demostrado que

son bajos y significativamente inferiores a los que actualmente existen en el mercado (CLOtets, Testing Line, PyloroTek y otros (15-18)

En conclusión la validación de nuestro test de laboratorio demostró parámetros similares al CLOtest.

A más de las características de facilidad de interpretación y rapidez de resultados inherentes a los test de ureasa, hemos de añadir que la elaboración de nuestro test de ureasa no presentó dificultad y que podemos disponer de él de manera permanente y a bajo costo.

1. Test obtenido en el Laboratorio
de la Facultad de Ciencias Médicas



2. CLOtest
importado

