

Evaluación del desempeño de dos pruebas para la detección de antígeno de *Helicobacter pylori* en heces

Evaluation of the accuracy of two stool antigen tests for *Helicobacter pylori* infection

Huong Nguyen Thi,^I Rosabel Falcón Márquez,^I Susana Vázquez Ramudo,^I Tatiana Almaguer Rodríguez,^I Celia Tamayo Brito,^I Rosabel Corrales Sánchez,^{II} María Del Pilar Escobar Capote,^{III} Ariadna González García,^{III} Oderay Gutiérrez González,^I Rafael Llanes Caballero^I

^I Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Departamento de Bacteriología y Micología. La Habana, Cuba.

^{II} Policlínico "Eduardo Díaz". Guanajay. Artemisa, Cuba.

^{III} Policlínico "Pedro Borrás". Plaza de la Revolución. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la detección de antígeno en heces se ha considerado una prueba prometedora para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. Para su introducción en la práctica médica, es un requisito indispensable demostrar el desempeño adecuado del método en la población de estudio.

Objetivo: evaluar la capacidad diagnóstica de los sistemas comerciales ELISA SD y SD BIOLINE, del fabricante Standard Diagnostics, Corea, en pacientes cubanos con síntomas gastroduodenales.

Métodos: se evaluaron 101 muestras de heces de pacientes previamente clasificados como *H. pylori* positivos y negativos por las pruebas de referencia de histología y prueba rápida de la ureasa. Se calcularon los parámetros de desempeño de ambos sistemas diagnósticos por el programa EPIDAT 3.1.

Resultados: la sensibilidad para los sistemas ELISA SD y SD BIOLINE fue de 85,25 % y 75,41 %, respectivamente. La especificidad para ambos fue de 92,50 %. Los valores predictivos positivos y negativos, los índices de validez y de Youden y la confiabilidad diagnóstica de ambas pruebas fueron satisfactorios.

Conclusiones: Los sistemas evaluados exhibieron un desempeño comparable con la histología y la prueba rápida de ureasa para la detección activa de la infección por *H. pylori*, lo que demuestra su utilidad para el diagnóstico y el manejo oportuno del paciente, sin la necesidad de emplear pruebas invasivas.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*; detección de antígeno en heces.

ABSTRACT

Introduction: stool antigen tests have been considered to be promising for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. For their incorporation into medical practice, it is indispensable to demonstrate their accuracy in a study population.

Objective: evaluate the diagnostic capacity of the commercial systems ELISA SD and SD BIOLINE, Standards Diagnostics, Korea, in Cuban patients with gastroduodenal symptoms.

Methods: an evaluation was conducted of 101 stool samples from patients previously classified as *H. pylori* positive and negative by reference histological tests and the rapid urease test. Estimation was made of performance parameters for both diagnostic systems using the software EPIDAT 3.1.

Results: Sensitivity for the systems ELISA SD and SD BIOLINE was 85.25 % and 75.41 %, respectively. Specificity for both was 92.50 %. Positive and negative predictive values, validity and Youden's indices, and diagnostic reliability were satisfactory for both tests.

Conclusions: the systems evaluated were found to have a performance level comparable with histological tests and the rapid urease test for active detection of *H. pylori* infection. This confirms their usefulness for the diagnosis and timely management of patients without having to use invasive tests.

Keywords: *Helicobacter pylori*; stool sample-based antigen detection.

Helicobacter pylori es el agente causal de diferentes enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y adenocarcinoma gástrico,¹ siendo clasificado por la Agencia de Investigaciones para el Cáncer como un carcinógeno de tipo I.²

Los métodos de diagnóstico considerados como "patrón de oro" requieren de endoscopia para la obtención de la biopsia de tejido gástrico, por lo que el uso de métodos no invasivos ha adquirido especial interés ya que son herramientas rápidas y reproducibles, de ejecución sencilla, y se emplean con frecuencia en estudios epidemiológicos.³

En Cuba, el diagnóstico de *H. pylori* se realiza en los centros hospitalarios y policlínicos con servicio de endoscopia, empleando la prueba rápida de la ureasa (PRU) y el estudio histopatológico.^{4,5} Sin embargo, la sensibilidad de estas pruebas está comprometida por la distribución "parcheada" heterogénea de la bacteria en el estómago, lo que pudiera producir resultados falsos negativos.⁶ Además, la invasividad del método endoscópico, hace que muchos pacientes permanezcan sin diagnosticar, lo que propicia que empeore su estado de salud.⁷

La detección de antígeno específico en heces es un método diagnóstico que permite detectar la infección activa por *H. pylori*.⁸ Esta prueba debe demostrar una eficacia semejante a la del patrón de referencia para que sea recomendado su uso en el diagnóstico. En el presente estudio, se propone evaluar la validez diagnóstica de los sistemas comerciales ELISA SD y SD BIOLINE de detección de antígeno de *H. pylori* en heces y compararlos con las pruebas de referencia que se realizan a pacientes cubanos con síntomas gastroduodenales.

Tipo de estudio. Validación prospectiva de la capacidad diagnóstica de dos pruebas comerciales en comparación con las pruebas de histología y PRU para detectar la infección por *H. pylori* en pacientes que asisten a la consulta de Gastroenterología de tres instituciones de la atención primaria de salud durante el período de julio de 2015 a junio de 2016. El estudio se llevó a cabo en los policlínicos "Eduardo Díaz" del municipio de Guanajay, provincia Artemisa; 19 de Abril y Pedro Borrás, del municipio Plaza de la Revolución, provincia La Habana. El protocolo de estudio fue aprobado por las Comisiones Científica y de Ética del IPK (CEI-IPK 41-15).

Pacientes estudiados. Se incluyeron 101 pacientes con sintomatología gastroduodenal e indicación de una endoscopia digestiva superior, que aceptaron participar en el estudio dando su consentimiento por escrito. Aquellos que recibieron tratamiento antimicrobiano y/o de inhibidores de la bomba de protones en las últimas 3 semanas previo a la toma de muestras fueron excluidos.

Pruebas de referencia. A los pacientes se les realizó el diagnóstico de *H. pylori* por las pruebas de referencia, PRU e histología.^{5,6} La coincidencia en los resultados de ambas técnicas de referencia se consideró para la confirmación diagnóstica de positivo o negativo a la infección por *H. pylori*.

Panel de muestras de heces. Se recolectaron muestras de heces a los pacientes, las cuales se trasladaron al Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias patógenas y Helicobacter del Instituto Pedro Kourí, en termos refrigerados y se almacenaron a 2-8 °C hasta ser estudiadas. Las muestras que no se procesaron en el intervalo de las 24 h, se congelaron a -20 °C hasta su uso.

ELISA SD. Se realizó según las recomendaciones del fabricante Standard Diagnostics, Corea. La muestra se colocó a temperatura ambiente (15-30 °C) y una pequeña porción de heces (aproximadamente 50 g) se cargó con un hisopo y se transfirió a un tubo de prueba con 1 mL del diluyente de la muestra. El tubo de prueba se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. Cien microlitros de los controles positivo y negativo y de las muestras pre-diluidas se colocaron en la placa de microtitulación que contiene anticuerpos monoclonales contra *H. pylori*. Posteriormente se añadieron 25 µL del conjugado enzimático en cada pocillo y la placa se incubó 60 min a 37 °C en cámara húmeda. La placa se sometió a cinco lavados consecutivos añadiendo 350 µL de solución de lavado diluida (1:20) en cada pocillo. Cien µL de la solución de sustrato TMB, preparada antes del uso, se añadió a cada pocillo. La placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo 100 µL de la solución de parada en cada pocillo. La lectura de la placa se realizó en un lector de microELISA (MRX Revelation, Dynex Technologies, Alemania) a 450 nm empleando como referencia 620 nm.

La interpretación de los resultados se realizó mediante el cálculo del valor de corte (VC), teniendo en cuenta la media aritmética de las densidades ópticas (DO) del control negativo (Cn) por triplicado y se calculó según la siguiente fórmula:

$$VC = (DO_{Cn1} + DO_{Cn2} + DO_{Cn3}) / 3 + 0.1.$$

El resultado fue considerado positivo cuando la DO de la muestra fue mayor o igual que el VC.

SD BIOLINE. El ensayo inmunocromatográfico que emplea un anticuerpo monoclonal se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras y el dispositivo de prueba se colocaron a temperatura ambiente. Dos volúmenes del diluyente (2 mL) se transfirieron al tubo de recolección de muestras. Posteriormente se añadieron 4 gotas en el pozo del dispositivo de prueba y se incubó de 10 a 15 min.

El resultado fue positivo cuando dos líneas rosa (débil o fuerte) se observaron en la zona del control y de la prueba. Se consideró negativo cuando solo se observó una línea rosa en la zona del control. La prueba se clasificó como no válida cuando no se observó ninguna banda color rosa en la zona control y se determinó repetir la muestra nuevamente usando un dispositivo de prueba nuevo.

Análisis estadístico. Mediante EPIDAT 3.1 se analizaron los parámetros de desempeño de los sistemas en comparación con las pruebas de referencia. De los 101 pacientes, 61 resultaron positivos a la infección con *H. pylori*, de ellos 52 fueron positivos por ELISA SD y 46 por SD BIOLINE. Los dos sistemas fueron capaces de detectar el mismo número de muestras negativas (37) del total de 40 muestras colectadas de pacientes confirmados sin infección por *H. pylori* (tabla 1). La evaluación del desempeño de los sistemas ELISA SD y SD BIOLINE con respecto a las pruebas de referencia exhibió valores comparables de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo (VPP) (tabla 2).

Tabla 1. Comparación de la detección de antígeno en heces por los métodos ELISA SD y SD BIOLINE frente a las pruebas de referencia (histología/prueba rápida de la ureasa) que clasifican al paciente como positivo o negativo a la infección por *H. pylori*

	Infección por <i>H. pylori</i>		
	Positivo	Negativo	Total
ELISA SD <i>H. pylori</i>			
Positivo	52	3	55
Negativo	9	37	46
Total	61	40	101
SD BIOLINE <i>H. pylori</i>			
Positivo	46	3	49
Negativo	15	37	52
Total	61	40	101

La variabilidad en la sensibilidad de los sistemas de detección de antígenos de *H. pylori* en heces se ha informado en la literatura, siendo un intervalo de 82-95 % aceptable para el ELISA y de 71-91 % para el método inmunocromatográfico.⁹⁻¹¹ El presente estudio mostró un mejor resultado de sensibilidad con el sistema ELISA (85,25 %) que con el sistema inmunocromatográfico (75,41 %), aunque no hubo diferencias significativas entre ambos ensayos ($p= 0,255$). Para ambas pruebas se detectaron resultados falsos negativos. A pesar de que el traslado y conservación de las muestras de heces se realizó en un contenedor refrigerado, se considera que pudieran afectar el desempeño de estas pruebas, factores limitantes como el hecho de que las muestras no fueran colectadas frescas así como el tiempo que media hasta la entrega de las mismas donde se recolectan.

Tabla 2. Parámetros de desempeño de las pruebas ELISA SD y SD BIOLINE de detección de antígeno de *H. pylori* en heces

Parámetros	Pruebas (IC-95 %)	
	ELISA SD	SD BIOLINE
Sensibilidad	85,25 (75,53-94,97)	75,41 (63,78-87,04)
Especificidad	92,50 (83,09-100,00)	92,50 (83,09-100,00)
VPP	94,55 (87,63-100,00)	93,88 (86,14-100,00)
VPN	80,43 (67,88-92,99)	71,15 (57,88-84,43)
Índice de validez	0,881 (0,813-0,949)	0,822 (0,742-0,901)
Índice de Youden	0,78 (0,66-0,90)	0,68 (0,54-0,81)
Confiabilidad diagnóstica	0,95 (0,882-1,018)	0,934 (0,866-1,002)

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; IC: intervalo de confianza.

La especificidad de los métodos ELISA e inmunocromatográficos para detección de antígenos de *H. pylori* en heces que emplean anticuerpos monoclonales varía entre 91-100 %.¹² Los resultados obtenidos en este estudio revelaron muy buena especificidad (92,5 %), a pesar de que ambos sistemas detectaron tres muestras como falsos positivos. Se ha utilizado la hipótesis de que la contaminación externa del material fecal pudiera incidir en resultados falsos positivos.¹³ Algunos autores atribuyen la causa a la capacidad que tienen estos ensayos para detectar formas cocoides de *H. pylori*, que no son identificadas por las pruebas invasivas.^{14,15} A este fenotipo bacteriano considerado como no cultivable, se le ha atribuido una posible función biológica en la persistencia de la infección ante un ambiente adverso.¹⁶

Estudios de evaluación que emplean similares sistemas diagnósticos, número de pacientes con sintomatología gastroduodenal y pruebas de referencias (histología y PRU) obtuvieron valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN en el rango de 81-94 %, 80-91 %, 73-89 %, 86-92 %, respectivamente.^{17,18} Sin embargo, un estudio realizado en Brasil con 75 pacientes dispépticos que emplea un sistema ELISA comercial y solo la histología como método de referencia, reveló una sensibilidad de 87,2 % y especificidad de 44 %.¹⁹ En la actualidad, para diagnosticar con certeza la infección por *H. pylori* se recomienda emplear al menos dos o más métodos de diagnóstico validados.²⁰

Los valores predictivos positivos fueron superiores a los negativos, lo que puede interpretarse como una mejor predicción del método para confirmar la presencia de *H. pylori*. Asimismo, los cálculos de los índices de validez, de Youden y la confiabilidad diagnóstica de los sistemas evaluados fueron satisfactorios y avalan el buen desempeño de estas pruebas.

Los sistemas de detección de antígeno evaluados en el presente estudio, exhibieron un desempeño comparable a la histología y la prueba rápida de ureasa para la detección activa de la infección por *H. pylori*.

La sencillez y fiabilidad de sus técnicas, así como la anticipación de los resultados del examen convierten al ELISA SD y al SD BIOLINE en pruebas promisorias para el diagnóstico, sin necesidad de realizar las pruebas invasivas.

El empleo futuro de estas pruebas en la detección de la infección por *H. pylori* pudiera ser de utilidad, en especial en el ámbito de la atención primaria de salud.

Agradecimientos

A la casa comercial SD representada en Cuba por Mindmax SA, por suministrar los sistemas comerciales ELISA SD y SD BIOLINE.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hosseini E, Poursina F, de Wiele TV, Safaei HG, Adibi P. *Helicobacter pylori* in Iran: a systematic review on the association of genotypes and gastroduodenal diseases. *J Res Med Sci*. 2012; 17(3): 280-92.
2. Khalilpour A, Santhanam A, Wei LC, Saadatnia G, Velusamy N, Osman S, et al. Antigenic proteins of *Helicobacter pylori* of potential diagnostic value. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(3): 1635-42.
3. Patel S, Pratap C, Jain A, Gulati A, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014; 20(36): 12847-59
4. Alonso J, Rodríguez BL, Moreno A, Chao L. Evaluación de la utilidad de diferentes métodos para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2013; 32(1): 102-10.
5. Rodríguez A, Llanes R, Bello M, Langaney J, Verdasquera D, Argüez R, et al. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital General Docente "Iván Portuondo". *Panorama Cuba y Salud*. 2013; 8(3): 26-32.
6. Llanes R, Millán LM, Escobar MP, Gala A, Capó V, Feliciano O, et al. Low Prevalence of *Helicobacter pylori* Among Symptomatic Children from a Hospital in Havana, Cuba. *J Trop Pediatr*. 2011; 58(3): 231-4.
7. Fonseca FM, Etchebehere RM, Queiroz DM, Rocha AM, Junqueira IS, Fonseca DN, et al. Histological and endoscopic features of the stomachs of patients with Chagas disease in the era of *Helicobacter pylori*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 46(6): 739-46.
8. Zhou X, Su J, Xu G, Zhang G. Accuracy of stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: A meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014; 38(5): 629-38.
9. Calik Z, Karamesea M, Acara O, Karamese SA, Dicle Y, Albayrakd F, et al. Investigation of *Helicobacter pylori* antigen in stool samples of patients with upper gastrointestinal complaints. *Braz J Microbiol*. 2016; 47(1): 167-71.
10. Pourakbari B, Ghazi M, Mahmoudi S, Mamishi S, Azhdarkosh H, Najafi M, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. *Braz J Microbiol*. 2013; 44(3): 795-8.

11. Leal Y, Cedillo-Rivera R, Simon A, Velázquez J, Flores L, Torres J. Utility of stool sample-based tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52(6):718-28.
12. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (CADTH). Stool Antigen Tests for *Helicobacter pylori* Infection: A Review of Clinical and Cost-Effectiveness and Guidelines. 2015 [citado 3 mar 2017]. Disponible en: <http://www.cadth.ca/stool-antigen-tests-helicobacter-pylori-infection-review-clinical-and-cost-effectiveness>
13. Falsafi T, Lavasani P, Basardeh I, Massarrat S, Landarani Z. Evaluation of an Iranian home-made *Helicobacter pylori* stool antigen ELISA Kit. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(6):1-7.
14. Silva JM, Villares CA, Monteiro MS, Colaúto C, dos Santos AF, Mattar R. Validation of a rapid stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(3):125-8.
15. Weingart V, Russmann H, Koletzko S, Weingart J, Ho W, Sackmann M. Sensitivity of a novel stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* in adult outpatients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol. 2004;42(3):1319-21.
16. Sarem M, Corti R. Rol de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en la infección y la recrudescencia. Gastroenterol Hepatol. 2016;39(1):28-35.
17. Kazemi S, Tavakkoli H, Habizadeh MR, Emami MH. Diagnostic values of *Helicobacter pylori* diagnostic tests: stool antigen test, urea breath test, rapid urease test, serology and histology. J Res Med Sci. 2011;16(9):1097-104.
18. Pilotto A, Franceschi M. *Helicobacter pylori* infection in older people. World J Gastroenterol. 2014;20(21):6364-73.
19. Castillo K, Ferreira D, Regus J, Contreras F, Then E. Características diagnósticas de una prueba que detecta antígenos específicos de *Helicobacter pylori* en heces fecales. Rev Med Dom. 2002;63(2):84-8.
20. Miftahussurur M, Yamaoka, Y. Diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection for epidemiological studies: critical importance of indirect test validation. Biomed Res Int. 2016;2016:4819423.

Recibido: 6 de marzo de 2017.

Aceptado: 20 de marzo de 2017.

Rosabel Falcón Márquez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6½, Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: rcmtropical@infomed.sld.cu
