

La combinación de SOH y Calprotectina podría reducir colonoscopias innecesarias en pacientes sintomáticos

Combination of FOBT and Faecal Calprotectin
may be useful for reducing unnecessary
colonoscopies in symptomatic patients

Autor: Alba Perales Enguita

Correo: 650285@celes.unizar.es

Director: Dr. Carlos Sostres

Codirector: Dr. Alberto Lué

Trabajo fin de grado

Grado en Medicina – Universidad de Zaragoza

12º Cuatrimestre Curso 2016/17



Universidad
de Zaragoza

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. Situación actual	4
3.2. Marcadores indirectos de patología colónica.....	5
3.2.1. Sangre Oculta en Heces (SOH).....	5
3.2.2. La Calprotectina.....	6
3.2.3. Combinación SOH y Calprotectina.....	7
3.3. Objetivos.....	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
4.1. Diseño y población del estudio.....	9
4.2. Metodología de recogida de datos.....	9
4.3. Análisis estadístico de los datos	12
4.4. Aspectos éticos	13
5. RESULTADOS	14
5.1. Características de la muestra.....	14
5.2. Comparación Grupo No Patología Vs. Grupo Patología	15
5.3. Análisis detallado del Grupo con Patología	17
5.4. Rendimiento diagnóstico SOH	20
5.5. Rendimiento diagnóstico Calprotectina	20
5.6. Rendimiento diagnóstico SOH + Calprotectina.....	21
5.7. Comparación curvas ROC	21
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	25
8. AGRADECIMIENTOS.....	26
9. BIBLIOGRAFÍA	27
10. ANEXO 1 : Tabla comparación resultados en grupo No Patologia.....	29

1. RESUMEN

El test de Sangre Oculta en heces (SOH) es una prueba no invasiva que ha demostrado ser útil para el cribado de cáncer colorrectal (CCR). La Calprotectina Fecal posee evidencia para detectar Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) pero su valor para CCR y adenomas en sintomáticos está menos estudiado. Muchos pacientes sintomáticos sometidos a colonoscopia presentan patología benigna. La combinación de los resultados de SOH+Calprotectina podría evitar estas colonoscopias innecesarias.

Métodos. Para evaluar la precisión diagnóstica de SOH+Calprotectina en comparación con cada uno por separado en sintomáticos se tomó como referencia el diagnóstico por colonoscopia. La SOH fue analizada por el test SENTi FIT 270 y la Calprotectina por EliA Calprotectin inmunoanálisis. El cut-off para una SOH patológica fue de 117 ng/ml y de 50 µg/g para Calprotectina. La precisión diagnóstica de la SOH y la Calprotectina fue evaluada mediante un modelo de regresión logística donde CCR, adenoma avanzado, EII y angiodisplasia fueron considerados como patología relevante. La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) fueron calculados con SPSS y el análisis y comparación de la curva ROC con MedCalc. **Resultados.** 171 pacientes [42.7% mujeres; 62 (51-68) años] fueron incluidos en el análisis final. 37 (21.6%) tenían patología relevante. El test de SOH presentó S del 59%, E del 89%, VPP del 55% y VPN del 89% para patología relevante. El test de Calprotectina S del 73%, E del 53%, VPP del 30% y VPN del 88%. La combinación de ambos una S del 86%, E del 81%, VPP del 56% y VPN del 96%. El área bajo la curva ROC (AuROC) para patología relevante fue de 0.777 para SOH, de 0.692 para la Calprotectina y de 0.848 para la combinación. La AuROC de la combinación de los test fue significativamente mayor respecto a los test por separado ($p=0,043$ vs SOH, $p=0.002$). No se observaron diferencias significativas entre SOH y Calprotectina ($P=0.221$). **Conclusiones.** La combinación de SOH y Calprotectina tiene una mayor precisión diagnóstica en comparación con cada uno de los test por separado para la detección de patología colónica relevante. Por su alto VPN, la realización de SOH y Calprotectina en pacientes sintomáticos antes de la colonoscopia podría ser una estrategia factible para evitar procedimientos innecesarios.

Palabras clave. Sangre oculta en heces (SOH). Calprotectina. Pacientes sintomáticos. Cáncer colorrectal (CCR).

2. ABSTRACT

Objectives. Faecal occult blood test (FOBT) is a non-invasive and easily performed test which has demonstrated to reduce CRC incidence and mortality. Faecal calprotectin (FCP) has good evidence for detecting inflammatory bowel disease but its value in CRC and adenoma detection in the symptomatic population is less well studied. Most patients with symptoms have benign pathology but in an effort to detect most cancer or pre-cancerous lesions, almost all patients undergo colonoscopy. The FOBT + FCP pretend to avoid unnecessary colonoscopies. **Patients and methods.** To evaluate and compare the diagnostic accuracy of the combination of FOBT plus FCP versus each test alone in symptomatic patients referred for diagnostic colonoscopy. A total of 171 patients who completed investigations, were prospectively recruited and included in the final analysis. FOBT was performed by SENTi FIT 270 test and FCP by the EliA Calprotectin immunoassay. Reference cut-off levels for abnormal test were 117 ng/ml for FOBT and 50 µg/g for FCP. The diagnostic accuracy of FOBT and FCP were evaluated by a logistic regression model. CRC, advanced adenoma, IBD and angiodysplasia were considered as relevant pathology. Sensitivity (Se), specificity (Sp), PPV and NPV were calculated using SPSS. MedCalc was used for the ROC curve analysis and comparison. **Results.** 171 patients (42.7% female; median age 62 51-68 years) were included. 37 (21.6%) had relevant colonic pathology. Diagnostic accuracy of FOBT Se:59%, Sp:89%, PPV:55% and NPV:89%. For FCP Se:73%, Sp:53%, PPV:30% and NPV:88%. And and combination of both Se:86%, Sp:81%, PPV:56% y NPV:96%. **Conclusions.** Our model based on combination of FOBT and FCP have a better diagnostic accuracy performance compared to each test alone for the detection of relevant colonic pathology. No significant difference was observed between FOBT and FCP (P=0.221). Because of high NPV, performing FOBT and FCP in symptomatic patients before colonoscopy could be a feasible strategy in order to avoid unnecessary procedures.

Key Words. Faecal Occult Blood Test (FOBT). Faecal calprotectin.. Symptomatic patients Colorectal cáncer.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Situación actual

La patología del tracto digestivo podemos dividirla en orgánica y funcional. Dentro de la orgánica encontramos la enfermedad inflamatoria intestinal (Colitis Ulcerosa, enfermedad de Crohn), los pólipos, el cáncer colorrectal (CCR), la enteropatía por AINEs, enfermedad celíaca, fibrosis quística, enteritis infecciosa, enteritis por quimioterapia o inmunosupresión. Este grupo se corresponde con patología inflamatoria. Entre las funcionales se encuentra el Síndrome de Colon Irritable, que en contra oposición de las anteriores es no-inflamatoria.

En muchas ocasiones el paciente que acude a consultas de atención primaria por clínica digestiva va a presentar patología funcional y solo una pequeña parte presentará patología orgánica (7%).¹

Cuando en Atención Primaria se presenta un paciente con sintomatología digestiva el médico se enfrenta a un desafío, puesto que los síntomas suelen ser inespecíficos y no referidos a una patología concreta.

Así, la guía NICE recomienda que cuando se presenta dolor abdominal, distensión o cambios en el hábito intestinal debemos realizar una anamnesis completa y comenzar a excluir patologías mediante la realización de hemograma, VSG, proteína C reactiva y marcadores de celiaquía.

Además recomienda estar alerta frente a signos de alarma indicativos de una patología grave subyacente, como la pérdida de peso inexplicable, masas abdominales, anemia o elevación de marcadores inflamatorios. En este caso deberíamos realizar directamente un estudio más exhaustivo. Por ejemplo, los síntomas de alarma de un CCR son sangrado rectal, pérdida de peso o cambios en el hábito intestinal. Estos síntomas siguen siendo inespecíficos, de hecho, un metanálisis determinó que la pérdida de peso es el único signo con una especificidad alta (89%), lo que se traduce a que si no lo presenta es muy probable que no tengan un CCR, aunque su sensibilidad es muy baja (20%) que quiere decir que entre los enfermos de CCR pocos presentaban la pérdida de peso.²

En caso de no presentar síntomas de alarma se prosigue con el proceso diagnóstico habitual, si durante éste presenta aumento de los marcadores inflamatorios (VSG y/o PCR) se sospecharía una patología orgánica. El problema es que no son

específicos de patología inflamatoria intestinal encontrándose aumentados en patologías extra-digestivas, de manera que en caso de ser positivos no podemos discernir si se trata de una inflamación digestiva o a otro nivel.

De tal forma, tendríamos que considerar el posible origen digestivo y deberíamos descartar esa posibilidad mediante la realización de pruebas invasivas como la colonoscopia, no exenta de riesgos además del coste económico que supone.³

Tras la realización de colonoscopia ambulatoria las principales complicaciones que aparecen son la hemorragia, el dolor abdominal y la perforación⁴. Además el uso de sedación en la colonoscopia incrementa un 13% el riesgo de complicaciones generales en 30 días posteriores, específicamente con perforación, hemorragia, dolor abdominal, complicaciones secundarias a la anestesia y accidente cerebrovascular.⁵

En un estudio realizado en Reino Unido se estimó que de la población a la que prestaban servicio, unos 400.000 pacientes, unos 4.000 eran remitidos por síntomas digestivos desde su Médico de Atención Primaria al especialista. De estos, un 35-45% eran considerados urgentes por sospecha de CCR, sin embargo, tras realizar la colonoscopia solo un 2% presentaban cáncer y un 5% enfermedad inflamatoria intestinal.⁶

Todas estas premisas sugieren la necesidad de estrategias no invasivas para detectar a los pacientes con baja probabilidad de patología orgánica de cara a evitar la realización de exploraciones endoscópicas innecesarias evitando así los riesgos, el coste económico y el estrés psicológico que conllevan.

3.2. Marcadores indirectos de patología colónica

Actualmente, en el proceso diagnóstico de patología intestinal en la práctica clínica habitual, contamos con dos pruebas. Una de ellas, la sangre oculta en heces, ha demostrado gran poder para detectar patología orgánica. Otra de ellas es la determinación de la Calprotectina Fecal que tiene aplicaciones aceptadas en detección de patología inflamatoria intestinal.

3.2.1. Sanrge Oculta en Heces (SOH)

Muchas patologías pueden dar sangrado del tracto digestivo bajo, entre ellas, la más temida y de especial importancia es el CCR.

La determinación de sangre en heces se realiza por técnicas inmunológica (SOH) para la detección de Hemoglobina o mediante la técnica de oxidación del guayaco (SHOg). Actualmente, en nuestro medio, se utiliza la SOH puesto que ha demostrado más sensibilidad para el CCR y el adenoma de alto grado aunque su especificidad sea menor.⁷

Además, la SOH proporciona resultados de manera cuantitativa y al ser específica de la hemoglobina humana no necesita restricciones dietéticas los días previos como la SOHg, que puede dar falsos positivos por consumo de carne.⁸

Actualmente, la principal aplicación de SOH es en programas de cribado para CCR en población asintomática, sin embargo, también se realiza fuera del programa de screening a pacientes mayores de 50 años con dolor abdominal o pérdida de peso, menores de 60 años con cambios en el hábito intestinal o anemia con déficit de hierro y en mayores de 60 años con anemia incluso sin déficit de hierro como dato adicional en el proceso diagnóstico.⁹

La SOH puede dar un falso negativo en una etapa temprana, sobretodo en adenomas menores de 15 mm y adenomas no polipoides con carcinoma in situ.¹⁰ A pesar de ello, la concentración de Hb fecal se encuentra relacionada con el tamaño del adenoma, la presencia de displasia grave y con el componente vellosos.¹¹

3.2.2. La Calprotectina

La Calprotectina, descubierta en 1980, es una proteína de unión al Calcio de pequeño tamaño de la familia S100 de proteínas de unión al Zinc. Tiene funciones bactericidas y además de en monocitos y macrófagos¹² se encuentra principalmente en el citoplasma de los neutrófilos, en los que constituye el 60% de las proteínas.¹³

La Calprotectina aparece en heces por la migración a la luz intestinal de los neutrófilos que la contienen a través de la mucosa intestinal en situaciones de inflamación local.¹⁴

La capacidad de la Calprotectina de unirse al calcio le confiere resistencia a la degradación por proteasas intestinales siendo posible su expulsión junto a las heces de manera intacta. Además se mantiene estable a temperatura ambiente durante 6-7 días.¹⁵

Su determinación ha demostrado una buena correlación con la prueba gold-estándar de la que se disponía: la gammagrafía con leucocitos marcados con Indio 111. Además también se correlaciona con la gravedad de la inflamación.¹⁶

3.2.3. Combinación SOH y Calprotectina

La guía NICE ya contempla la utilización de la Calprotectina para el diagnóstico diferencial entre patología intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa como representantes) y la no inflamatoria (Síndrome de Colon Irritable). Sin embargo la utilización de este parámetro para el despistaje de adenomas y cáncer colorrectal en población sintomática no está estudiada.

Por su parte, la SOH se utiliza para el cribado del CCR en población asintomática siguiendo los programas de cribado poblacional que en general van dirigidos a una población diana entre 50 y 69 años.

Recientemente, algunos autores han postulado la utilidad del empleo combinado de ambos marcadores. Esto se basaría en que se podrían detectar tanto patologías que van acompañadas de sangrado que sería detectado por la SOH y de inflamación que sería detectado por la determinación de la Calprotectina.

Hasta la fecha, existen dos estudios con resultados dispares. Un primer estudio publicado en Gut¹⁷, realizado en 1043 pacientes sobre la combinación de SOH y Calprotectina para la detección de patología orgánica en general concluyó que el VPN de la SOH era del 100% para el CCR, de 97,8% para el adenoma de alto riesgo y de 98,4% para la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Así, con esta prueba, obtuvieron patología orgánica en 103 pacientes, y este número se incrementó (2 más de EII, 1 más de adenoma de alto riesgo) al añadir la determinación de la Calprotectina.

Determina que ante un paciente asintomático una SOH negativa haría descartar patología grave. Con solo la Calprotectina negativa (punto de corte 50 microgramos) se podría descartar EII, sin embargo no hubiera detectado un quinto de los CCR. Con la combinación de la SOH+Calprotectina solo se hubiera perdido un caso de EII.

Por tanto, con la combinación de SOH+calprotectina en pacientes sintomáticos en Atención Primaria se podría prescindir en un tercio de pruebas invasivas de manera inmediata como la colonoscopia.

Otro estudio publicado en AP&T¹⁸ sobre la combinación de la SOH y la Calprotectina para la detección de CCR sobre 430 pacientes sintomáticos determinaron que el VPN de solo SOH frente a SOH+calprotectina era similar (99%). Concluyen que no se observa un beneficio adicional en el uso combinado de ambas pruebas frente a solo la SOH.

Además plantean la posibilidad de que el nivel de SOH se correlacione no tanto con el estadio del CCR sino con su localización, puesto que observan valores mayores en los de colon descendente respecto a las de colon ascendente. Plantean como hipótesis que los sangrados de colon ascendente se encuentran más tiempo en intestino siendo posible la degradación de la Hb.

Por otra parte, apoya el valor de la SOH como herramienta para descartar el CCR por su alto VPN (99%), considerándose valores de SOH más altos para las lesiones de colon descendente.

En esta línea, se señala que si se hubieran basado en el alto VPN de la SOH para decidir la realización de una colonoscopia hubieran evitado su realización en el 74% de los pacientes sin patología. Atendiendo sólo a la SOH se hubieran considerado no patológicos 3 pacientes con CCR, uno de los cuales además con una Calprotectina normal. Concluyen que, a día de hoy, los test no pueden sustituir por entero al juicio clínico.

3.3. Objetivos

El objetivo principal es:

- Determinar si la combinación de Calprotectina fecal y SOH es una prueba más sensible y específica para la detección de patología colónica relevante en pacientes sintomáticos que los dos test individualmente.

Los objetivos secundarios son:

- Determinar los valores de especificidad y sensibilidad de la Calprotectina fecal en pacientes sintomáticos para la detección de patología colónica relevante.
- Determinar los valores de especificidad y sensibilidad de la SOH en pacientes sintomáticos para la detección de patología colónica relevante.
- Determinar la prevalencia de patología colónica relevante en los pacientes sintomáticos remitidos desde Atención Primaria en nuestro medio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño y población del estudio

Se trata de un estudio observacional descriptivo, transversal y prospectivo. que pretende conocer los valores de SOH y Calprotectina en pacientes sintomáticos que acuden a la realización de una colonoscopia y establecer una relación con el diagnóstico. Para ello, se ha realizado un muestreo consecutivo con la recogida de datos de todos los pacientes que cumplían criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión de la muestra fueron:

- Edad: 18-80 años.
- Pacientes a los que se les vaya a realizar una colonoscopia diagnóstica en el centro (hospitalizados o ambulatorios).
- Disposición a firmar el consentimiento informado.
- Se deberá tener acceso a la historia clínica.
- Las muestras deben disponer de la siguiente información:
 - Fecha de recogida.
 - Fecha de nacimiento del paciente.
 - Forma de identificación.

No existirán restricciones de género o medicación.

Y los criterios de exclusión:

- Negación a firmar el consentimiento informado.
- Antecedentes familiares o personales de patología intestinal.

4.2. Metodología de recogida de datos

Todos los datos obtenidos fueron recopilados en una base tipo Excel y tras ello se procesaron a través del paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 22.0 para sistema operativo Windows (Licencia Universidad de Zaragoza, Zaragoza).

a) Contacto con el paciente

Todo paciente que iba a ser sometido a colonoscopia que cumplía los criterios de inclusión era contactado previamente vía telefónica para ser informado sobre la existencia del estudio y si quería participar en él, en caso de respuesta afirmativa se le comentaba cómo tenía que realizar la recogida de heces.

El día de la colonoscopia se proporcionaba el Consentimiento Informado para ser firmado y el paciente entregaba la muestra de heces. Sobre esa muestra se realizaba el test Sentinel para la detección de sangre oculta y se remitía al laboratorio del centro. El resto del bote de muestra era remitido al Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital Clínico de Zaragoza, siguiendo el procedimiento habitual de remisión de muestras biológicas, donde se almacenaba hasta su procesamiento.

El diagnóstico se establecía de acuerdo con los datos de la colonoscopia y, si se daba el caso, el análisis histológico correspondiente.

El consentimiento informado, que contiene toda la información específica sobre el estudio, se proporcionaba a los pacientes y ningún paciente era incluido sin tener su consentimiento por escrito. Toda la información recopilada de los pacientes incluidos en el estudio se mantendrá de forma estrictamente confidencial, siendo sometida a la normativa legal vigente en España (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 41/2002, de información para el paciente, así como el Real Decreto 223/2004).

b) Preparación y procesamiento de las muestras para la determinación de Calprotectina

Las heces eran recogidas por el paciente el día de antes de que iniciase la preparación para la colonoscopia y posteriormente las entregaba el día de la colonoscopia. Se realizaban las extracciones dos veces a la semana y los extractos se congelaban.

Para preparar el extracto se comenzaba identificando el tubo (Faecal sample preparation kit de Roche) en el que se iba a realizar la suspensión de la muestra. En dicho tubo se depositaba una pequeña cantidad de heces (100 mg) en la cavidad hueca de tapón de cierre, después se pipeteaban 5 mL del buffer de extracción, agitando en el vórtex. Tras dejar en reposo durante 10 minutos, se transferían entre 1 y 2 ml del homogeneizado a un tubo Eppendorf que se centrifugaba durante 5 minutos a 3000 g.

Se identificaba otro tubo al que se le transfería el sobrenadante del Eppendorf y que sería el utilizado para realizar la determinación o congelado si esta no se realiza inmediatamente.

c) Método de determinación de Calprotectina fecal: EliA Calprotectin

Para detectar la Calprotectina fecal solo es necesaria una pequeña cantidad de heces (100 mg). El procedimiento de determinación está basado en técnicas inmunoquímicas en las que se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen como diana epítomos de la molécula de Calprotectina.

Para la extracción de la Calprotectina es necesario la utilización de un buffer, además la cantidad obtenida se ve alterada por la consistencia de las heces, siendo más escasa en las heces de consistencia acuosa.

El cut-off establecido para considerar un valor de Calprotectina como positivo es a partir de 50 microgramos/gramo (no útil en niños menores de 4 años que suelen tener niveles elevados). A este valor le corresponde una sensibilidad del 93% y una especificidad del 94% en el diagnóstico diferencial de enfermedad inflamatoria intestinal (inflamatoria) y síndrome de colon irritable (no inflamatoria).

En diversos meta-análisis se comprobó que aumentar este valor a 60 microgramos/gramo aumentaba la especificidad al 100%, pero la sensibilidad caía hasta 61%. De la misma manera disminuyendo el punto de corte a 15 microgramos/gramo la sensibilidad nos aumentaba al 100% y la especificidad era del 95%. Por lo que el punto de corte óptimo se estableció en 50 microgramos/gramo.

En el estudio se utilizó un test de fluoroenzimoanálisis cuantitativo que combina enzimoanálisis con fluorimetría para aumentar la sensibilidad en la detección. Las muestras fecales se analizaron mediante el autoanizador Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Todos los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones de uso del fabricante y los lotes de producto utilizados quedaron registrados.

Se congelaron a -20°C una muestra fecal de 0.5 g para análisis de resultados discrepantes o investigaciones posteriores.

d) Preparación y procesamiento de las muestras para la determinación de sangre oculta

De la muestra de heces, entregada por el paciente el día de realización de la colonoscopia, se recogió una alícuota con el contenedor apropiado (SENTiFIT® pierce Tube, Sentinel Diagnostics) que contiene el tampón de extracción y que se conservaba refrigerado hasta su procesamiento.

e) Método de determinación de sangre oculta

La determinación de hemoglobina se realizaba en un analizador SENTIFIT® 270 (Sentinel Diagnostics) mediante un método inmunológico cuantitativo.

4.3. Análisis estadístico de los datos

Las variables cualitativas se reportan en número absoluto, frecuencia o porcentaje. Las variables continuas se expresan en media (\pm desviación estándar) o mediana (rango intercuartílico) según su distribución. Para evaluar si las variables continuas seguían una distribución normal se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para identificar las variables asociadas con patología se han utilizado el test χ^2 cuadrado, o el test exacto de Fisher cuando indicado, para las variables cualitativas. Para las variables continuas se han utilizado el test t-de Student o el test U de Mann-Whitney según su distribución.

Se ha considerado como “Patología colónica relevante” los siguientes hallazgos en la colonoscopia: CCR, EII, adenoma avanzado (componente vellosos o displasia de alto grado) y angiodisplasia.

Se han calculado los resultados de SOH y Calprotectina tanto como variables continuas (resultados cuantitativos de los test) que como variable cualitativa dicotómica (positivo/negativo).

Para calcular la variable “Combinación SOH y Calprotectina” se han incluido las dos variables continuas Resultado SOH y Resultado Calprotectina en un modelo de regresión logística binaria con “Patología colónica relevante” como variable dependiente. De esta forma se ha calculado una variable continua donde por cada paciente se asignaba una probabilidad de presentar patología en la colonoscopia. Se ha calculado un valor de corte específico de esta variable calculando las coordenadas de la curva ROC y utilizando el índice de Youden (sensibilidad + especificidad -1) considerando como variable de contraste “Patología colónica relevante”.

Para calcular los áreas bajo la curva ROC (AuROC), los respectivos IC 95% y para posteriormente comparar las diferentes AuROC de SOH, Calprotectina y combinación de ambos test se ha utilizado el programa estadístico MedCalc (versión 15.2.2, versión de prueba gratuita) utilizando el método de De Long et al¹⁹.



Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo para SOH, calprotectina y combinación de los dos test se han calculado a partir de las tablas de contingencia con “Patología colónica relevante” como variable de contraste.

4.4. Aspectos éticos

En el desarrollo del estudio se ha respetado la autonomía del paciente mediante la firma del consentimiento informado así como su confidencialidad, prescindiendo de datos personales y llevando a cabo la identificación mediante un código disociado.

5. RESULTADOS

Se contactó con un total de 397 pacientes en el momento de la realización de este trabajo, en el análisis final disponemos de datos completos de 171 participantes.

5.1. Características de la muestra

En el estudio se han incluido un total de 171 pacientes, de los cuales 73 (42,7%) eran varones. La edad media es de 59 años con una mediana de 62, desviación estándar de ± 13 y un rango de 12 a 80 años.

Un análisis en general de esta muestra determina que la mayoría de los participantes no tomaban ni AINEs (81,3 %), ni Sintrom (97,7%), ni AAS (90,1%), ni otros anticoagulantes (96,5%) ni antiagregantes (97,1%).

La principal indicación de la colonoscopia fue el sangrado rectal 71 (42%) pacientes, seguido del cambio del hábito intestinal con 28 (16%) y anemia con 22 (13%).

La colonoscopia venía indicada en la mayoría de pacientes por el servicio de Atención Primaria (66,3 %) y la preparación para la misma fue buena (60 %).

Utilizando la colonoscopia como gold-estándar se determinó la presencia de patología relevante en 37 individuos (21,6 %). Resultados en Tabla 2.

Tabla 2. Características de la muestra (n=171).

Edad	62 (51 - 68)	
Sexo	Hombres	73 (42,7 %)
	Mujeres	98 (57,3 %)
Hemoglobina	14,2 \pm 1,5 g/dL	
Hematocrito	43,1 \pm 4,4 %	
Consumo de AINEs	No	139 (81,3 %)
	AINEs	24 (14 %)
	Inhibidores de la COX-2	8 (4,7 %)
Consumo de AAS	No	154 (90,1 %)
	Sí	17 (9,9 %)
Consumo Sintrom	No	167 (97,7 %)
	Sí	4 (2,3 %)
Otros antiagregantes	No	165 (97,1 %)
	Sí	5 (2,9 %)

Otros anticoagulantes	No	112 (96,5 %)
	Sí	6 (3,5 %)
Indicación colonoscopia	Sangrado rectal	71 (42%)
	Cambio hábito intestinal	28 (16%)
	Anemia	22 (13%)
	Otros	50 (29%)
Origen colonoscopia	Primaria	166 (66,3 %)
	Cirugía	11 (6,5 %)
	Digestivo Consultas	37 (21,9 %)
	Otros	9 (5,3 %)
Preparación colonoscopia	Excelente	46 (27,1 %)
	Buena	102 (60 %)
	Regular	13 (7,6 %)
	Mala/Deficiente	9 (5,3 %)
SOH	Negativa	131 (76,6 %)
	Positiva	40 (23,4 %)
Calprotectina	Negativa	81 (47,4 %)
	Positiva	90 (52,6 %)
SOH + Calprotectina	Negativa	68 (39,8 %)
	Positiva	103 (60,2 %)
Resultado colonoscopia	Sin patología	134 (78,4 %)
	Patológicos	37 (21,6 %)

5.2. Comparación Grupo No Patología Vs. Grupo Patología

El grupo de No Patológico se compone de 134 (78,4%) individuos frente a los 37 (21,6%) del Patológico. La edad media en el grupo no patológico es ligeramente menor, con 58 años, frente a los 61 del grupo patológico.

En cuanto al sexo, mientras que en el grupo no patología se observa un predominio más claro de mujeres (60,4%) en el grupo patología el predominio es más sutil, siendo de varones (54,1%). Esto apoya estudios que proponen una mayor prevalencia de patología de colon en el varón. Respecto a las variables del hematocrito y la hemoglobina presentan valores muy próximos en ambos grupos, siendo el hematocrito y

la hemoglobina del grupo No Patológico de 43% y 14,2 g/dL respectivamente y en el grupo Patológico de 43,7% y 14,3 g/dl.

En general el consumo de AINEs, de Sintrom, de AAS y de otros anti-agregantes es mayor en el grupo Patológico, siendo solo el consumo de otros anti-coagulantes discretamente mayor en el grupo No Patológico. En ambos grupos la indicación de la colonoscopia se realizó por parte de Atención Primaria y la preparación en la mayoría fue buena.

Finalmente, respecto a los test realizados: la SOH fue positiva sólo en un 13,4% del grupo No Patología frente al 59,5% del grupo Patológico. La Calprotectina fue positiva en un 47% del grupo No Patológico en contraste con el 73% del grupo Patología. Por último, la combinación de ambas fue positiva en el 18,7% del grupo No Patológico en comparación con el 86,5% del grupo Patológico. Datos en tabla 2.

Tabla 2. Resultados comparación grupo No patología Vs. Grupo Patología (n=171).

		No patología 134 (78,4%)	Patología 37 (21,6%)	Nivel de significación de p
Edad		61 (49 – 67)	64 (60 – 68)	0,141
Sexo	Varones	53 (39,6%)	20 (54,1%)	0,114
	Mujeres	81 (60,4%)	17 (45,9%)	
Hemoglobina		14,2 ± 1,4 g/dL	14,3 ± 1,7 g/dL	0,561
Hematocrito		43 ± 4,2 %	43,7 ± 4,8 %	0,418
Consumo AINEs	0	79,9%	86,5%	0,637
	1	14,9%	10,8%	
	2	5,2%	2,7%	
Consumo AAS	No	92,5%	81,1%	0,039
	Sí	7,5%	18,9%	
Consumo Sintrom	No	98,5%	94,6%	0,163
	Sí	1,5%	5,4%	
Otros antiagregantes	No	97,8%	91,9%	0,928
	Sí	2,2%	8,1%	
Otros anticoagulantes	No	97,0%	97,3%	0,086
	Sí	3,0%	2,7%	

Origen colonoscopia	Primaria	62,4%	80,6%	0,072
	Cirugía	7,5%	2,8%	
	Digestivo	25,6%	8,3%	
	Otros	4,5%	8,3%	
Preparación colonoscopia	Excelente	26,3%	29,7%	0,784
	Buena	59,4%	62,2%	
	Regular	8,3%	5,4%	
	Mala	6,0%	2,7%	
SOH	Negativa	116 (86,6%)	15 (40,5%)	<0,001
	Positiva	18 (13,4%)	22 (59,5%)	
Calprotectina	Negativa	71 (53%)	10 (27%)	0,005
	Positiva	63 (47%)	27 (73%)	
SOH + Calprotectina	Negativa	109 (81,3%)	5 (13,5%)	<0,001
	Positiva	25 (18,7%)	32 (86,5%)	

5.3. Análisis detallado del Grupo con Patología

En el grupo Patología, compuesto por 37 pacientes, la patología colónica considerada como relevante se divide en 24 (65%) pacientes con adenomas, 7 (19%) con CCR, 4 (11%) con EII y 2 (5%) con angiodisplasia. En la tabla 3 se presentan estas patologías en relación con el test de SOH y de Calprotectina. Destacar que en CCR el 100% de los individuos tuvieron un resultado positivo para SOH y en EII el 100% de los pacientes tuvieron un resultado positivo para Calprotectina, lo que apoya sus principales usos en la actividad clínica.

Tabla 3. Resultados de Test por patologías.

PATOLOGÍA	Nº pacientes	SOH		CALPROTECTINA		SOH + CALPROTECTINA	
		NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVA
Adenoma	24 (65%)	12 (50%)	12 (50%)	8 (33%)	16 (67%)	5 (20,8%)	19 (79,2%)
CCR	7 (19%)	0 (0%)	7 (100%)	2 (29%)	5 (71%)	0 (0%)	7 (100%)
EII	4 (11%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)
Angiodisplasia	2 (5%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)

Para ahondar más en los resultados por patología, observamos en la Tabla 4 que tan solo 4 individuos (ID: 70, 72, 113, 135 y 157) hubieran obtenido un resultado negativo en ambas pruebas y en el caso hipotético de que la indicación de colonoscopia se hubiera hecho con la combinación de SOH+Calprotectina no hubieran sido diagnosticados de sus patologías. Estos individuos con tests negativos corresponden al 11% del grupo Patología En los 5 coinciden en patología de adenoma, más concretamente con la siguiente histología:

70: Adenoma túbulo-veloso con displasia de bajo grado.

72: Adenoma túbulo-veloso con displasia de bajo grado.

113: Adenoma túbulo-veloso con displasia de bajo grado.

135: Adenoma veloso con displasia de bajo grado.

157: Adenoma túbulo-veloso con displasia moderada.

Tabla 4. Resultados en las pruebas desglosados por paciente en relación a la patología (n=37)

PATOLOGÍA	ID	SOH	CALPROTECTINA
Adenoma 24 (65%)	17	434 Positvo	316 Positvo
	26	263 Positvo	28 Negativo
	42	7271 Positvo	300 Positvo
	44	6 Negativo	416 Positvo
	45	0 Negativo	836 Positvo
	51	8092 Positvo	27 Negativo
	62	115 Negativo	655 Positivo
	63	15427 Positvo	8,1 Negativo
	70	0 Negativo	31 Negativo
	72	0 Negativo	14 Negativo
	77	4283 Positvo	69 Positvo
	81	125 Positvo	261 Positvo
	83	12231 Positvo	71 Positvo
	92	109 Negativo	247 Positvo
	104	554 Positvo	63 Positvo
	106	109 Negativo	271 Positvo
	107	1808 Positvo	36 Negativo
	113	0 Negativo	9,8 Negativo
	121	0 Negativo	591 Positvo
	135	0 Negativo	94 Positivo
	139	0 Negativo	449 Positvo
	157	18 Negativo	6,6 Negativo
	174	149 Positvo	140 Positvo
	187	2280 Positvo	77 Positvo
Adenocarcinoma (CCR) 7 (19%)	78	20426 Positvo	2250 Positvo
	85	5955 Positvo	1196 Positvo
	93	2949 Positvo	624 Positvo
	94	743 Positvo	17 Negativo
	100	605600 Positvo	316 Positvo
	116	156 Positvo	143 Positvo
	120	314 Positvo	9,2 Negativo
EII 4 (11%)	34	0 Negativo	336 Positvo
	124	679 Positvo	755 Positvo
	142	211 Positvo	4412 Positvo
	150	0 Negativo	396 Positvo

Angiodisplasia 2 (5%)	48	4395 Positivo	394 Positivo
	147	0 Negativo	439 Positivo

5.4. Rendimiento diagnóstico SOH

El test de SOH en comparación con la colonoscopia como gold-estándar para la detección de patología dio 22 verdaderos positivos, 15 falsos negativos, 18 falsos positivos y 116 verdaderos negativos. Los datos se pueden observar en la tabla 5.

Tabla 5. Rendimiento diagnóstico SOH

	Enfermos	Sanos	Total
SOH Positiva	22	18	40
SOH Negativa	15	116	131
Total	37	134	171

A partir de la misma, mediante la utilización de las fórmulas pertinentes se puede obtener una Sensibilidad del 59%, una Especificidad del 89%, un Valor Predictivo Positivo (VPP) de 55% y un Valor Predictivo Negativo (VPN) de 89%.

5.5. Rendimiento diagnóstico Calprotectina

El test de Calprotectina en comparación con la colonoscopia como gold-estándar para la detección de patología dio 27 verdaderos positivos, 10 falsos negativos, 63 falsos positivos y 71 verdaderos negativos. Los datos se pueden observar en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento diagnóstico Calprotectina

	Enfermos	Sanos	Total
Calprotectina Positiva	27	63	90
Calprotectina Negativa	10	71	81
Total	37	134	171

A partir de la misma, mediante la utilización de las fórmulas pertinentes se puede obtener una Sensibilidad del 73%, una Especificidad del 53%, un VPP de 30% y un VPN de 88%.

5.6. Rendimiento diagnóstico SOH + Calprotectina

Por último, la combinación de ambos test en comparación con la colonoscopia como gold-estándar para la detección de patología dio 32 verdaderos positivos, 5 falsos negativos, 25 falsos positivos y 109 verdaderos negativos. Los datos se pueden observar en la tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento diagnóstico combinación SOH+Calprotectina

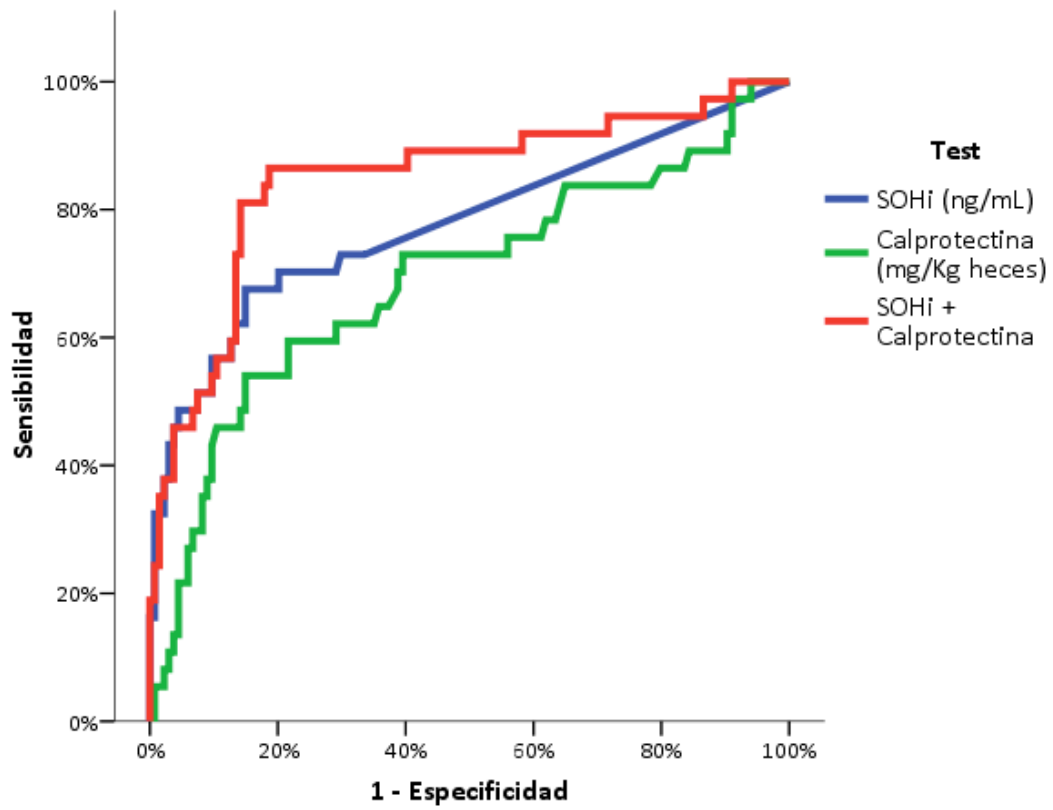
	Enfermos	Sanos	Total
SOH + Calpro Positiva	32	25	57
SOH + Calpro Negativa	5	109	114
Total	37	134	171

A partir de la misma, mediante la utilización de las fórmulas pertinentes se puede obtener una Sensibilidad del 86%, una Especificidad del 81%, un VPP de 56% y un VPN de 96%.

5.7. Comparación curvas ROC

El área bajo la curva ROC para patología de colon relevante con un resultado de 0.777 (95% CI: 0.708 - 0.837; $P < 0.0001$) para SOH, de 0.692 (95% CI: 0.617 - 0.760; $P = 0.0005$) para la Calprotectina y de 0.848 (95% CI: 0.785 - 0.898; $P < 0.0001$) para la combinación de ambas. Así, la combinación de ambos test tiene una precisión diagnóstica significativamente mayor en comparación con cada una de ellas por separado ($P = 0.043$ vs SOH y $P = 0.002$ vs Calprotectina) con un VPN muy aceptable de 96%. No se observaron diferencias significativas entre el uso de SOH y Calprotectina por separado ($P = 0.221$). La curva ROC superpuesta de SOH, Calprotectina y su combinación se muestra en el gráfico 1.

Gráfico 1. Superposición curvas ROC.



6. DISCUSIÓN

A partir del análisis de los datos de la muestra se obtiene que el paciente sintomático que acude a la realización de una colonoscopia en nuestro medio es más frecuentemente una mujer (57,3%) de unos 59 años remitida desde Atención Primaria (66,3%) con indicación por Sangrado Rectal (42%). Lo más probable es que se trate de una colonoscopia normal (78,4%), que descarta patología orgánica aumentando en este caso la prevalencia de sexo femenino (60,4%). En caso de arrojar una colonoscopia alterada (21,6%) hay un predominio del sexo masculino (54,1%) y un aumento de la edad media a 61 años. Esta prevalencia de patología orgánica intestinal en el sexo masculino acompañado de una mayor edad apoya la epidemiología de esta patología ya ampliamente estudiada y aceptada. Además la existencia de patología muestra una correlación positiva con la positividad para SOH y Calprotectina.

Los valores de hemoglobina y del hematocrito no muestran diferencias clínicamente significativas entre el grupo Patología y el No Patología.

En el grupo patología, solo 5 (13,5%) pacientes no hubieran sido detectados con la combinación de ambos test. En relación a estos, coinciden en la histología de adenomas y cabe decir que se trata de patología localizada que quizá hubiera sido detectada en posteriores determinaciones o que, puesto que al tratarse de un sangrado intermitente, probablemente si se hubieran realizado tres muestras de heces a días alternos sí que hubieran arrojado un resultado positivo.

Extrapolando los resultados de la muestra, podríamos establecer que la patología colónica más frecuente en pacientes sintomáticos en nuestro medio es el adenoma (14%), seguido del CCR (4%), la EII (2,3%) y la angiodisplasia (1,2%).

En este estudio, ningún paciente con CCR, hubiera escapado a la detección de la combinación de ambas pruebas, en contraste con el estudio del AP&T¹⁸, en el cual pasaron desapercibidos 3 CCR.

Además se apoya el rendimiento diagnóstico de la SOH para el CCR siendo positiva en el 100% de los individuos con esta patología y el de la Calprotectina para la EII siendo también positiva en el 100%, ambas ya aceptadas en la práctica clínica para estas indicaciones por la guía NICE³.

Por su parte, en el Grupo no Patológico la combinación de ambas pruebas habría arrojado un resultado negativo en el 81,34% de los individuos, evitándose todas esas

colonoscopias sin comportar ningún riesgo de infravalorar la patología. Tomando el grupo en su conjunto, la prueba combinada hubiera aumentado el número de colonoscopias evitadas hasta el 66,6%. Este resultado es comparable a la estimación que realiza el AP&T¹⁸ que lo establecía en torno al 70% de las colonoscopias, y supera la del GUT¹⁷ que proponía que las colonoscopias evitables rondaban un tercio.

Respecto a la comparación del rendimiento diagnóstico, recogido en la tabla 8, se observa que el VPN de la combinación de ambas pruebas aumenta de manera importante (96%), siendo muy superior al de cada una de las pruebas por separado. En cuanto al VPP solo se observa un leve incremento respecto al uso de la SOH aislado, no siendo relevante.

En cuanto a la sensibilidad y especificidad de la combinación de ambas pruebas también son superiores a la utilización de cada uno de los test por separado a excepción de la especificidad de la SOH que es mayor como prueba aislada.

Tabla 8. Comparación del rendimiento diagnóstico.

Test	Normal	Patológico	VPP	VPN	Sensibilidad	Especificidad
SOH	131	40	55%	89%	59%	89%
Calprotectina	81	90	30%	88%	73%	53%
SOH + Calprotectina	114	57	56%	96%	86%	81%

Con este VPN, ante un paciente sintomático con un resultado negativo en la combinación de ambos test podríamos asegurar casi con total seguridad la ausencia de patología orgánica relevante y evitar una colonoscopia innecesaria.

En cuanto a la patología que escaparía a la combinación de ambos test, se ha observado en este estudio que se trata de patología localizada y que probablemente sería detectado en posteriores determinaciones.

Del análisis de la curva ROC se deriva que la detección de patología es superior en la combinación de ambos test (0,848) que la de la SOH (0,777) y la Calprotectina (0,692) por separado, pudiéndose recomendar la combinación de ambas por su superioridad.

En conclusión, la combinación de ambos test muestra resultados muy prometedores a la hora de evitar colonoscopias innecesarias por el alto VPN, con la reducción del coste económico y riesgos que conlleva. Por todo ello es un campo en el que se debería continuar investigando hasta conseguir su aplicación en la práctica clínica diaria sin que se produzcan riesgos de infradiagnosticar patología colónica relevante.



7. CONCLUSIONES

- Se demuestra la mayor precisión diagnóstica para descartar patología colónica relevante en paciente sintomático con la combinación de SOH + Calprotectina que la de cada una de las pruebas por separado.
- El alto VPN de la combinación SOH+Calprotectina permite descartar con alta probabilidad la existencia de patología orgánica y prescindir de pruebas invasivas en paciente sintomático.
- El resultado combinado de ambos test permitiría evitar más de dos tercios de las colonoscopias en paciente sintomático. Más concretamente del 66,6% en este estudio.
- La prevalencia de patología colónica relevante en los pacientes sintomáticos remitidos desde Atención Primaria en nuestro medio es del 21,6%, con predominio de adenomas.



8. AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Carlos, por su poder de hacer las tareas simples y sencillas, y sobre todo por ponerle alegría a los momentos de despacho que tocaba abrir los botes de tape rojo.

A mi otro tutor , Alberto, por ser guía y ayuda en este trabajo, además de su eficacia y tremenda disponibilidad en cualquier momento.

A Pilar, Pilar y Erika, por prestarme los ordenadores y el uso del teléfono, además de la paciencia para aguantar las interminables horas de llamadas a los pacientes.

A Ana, Mercedes y Gonzalo, inestimable ayuda con la tarea de consentimientos, llamadas y base de datos, que de otra forma hubiera sido inabarcable para mi.

A Mavi, pieza imprescindible, puesto que sin el análisis de las muestras el trabajo no hubiera sido posible.

Por último, a la colaboración de los pacientes, que han aportado un poquito de ellos para hacer posible este proyecto.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Janssen HA, Borghouts JA, Muris JW, Metsemakers JF, Koes BW, Knottnerus JA. Health status and management of chronic non-specific abdominal complaints in general practice. *Br J Gen Pract* 2000; 50:375–9.
2. Jellema P, van der Windt DA, Bruinvels DJ, et al. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; 340: c1269.
3. NICE Diagnostics guidance (DG11). Faecal calprotectin diagnostic test for inflammatory diseases of the bowel. <http://www.nice.org.uk/guidance/dg11>
4. Ranasinghe I, Parzynski CS, Searfoss R. Differences in colonoscopy quality among facilities: development of a post-colonoscopy risk-standardized rate of unplanned hospital visits. *Gastroenterology* 2016; 150:103–113
5. Wernli KJ, Brenner AT, Rutter CM, Inadomi JM. Risks Associated With Anesthesia Services During Colonoscopy. *Gastroenterology*. 2016;150:888–894; quiz e18.
6. Mowat C, Digby J, Strachan JA, et al. Faecal haemoglobin and faecal calprotectin as indicators of bowel disease in patients presenting to primary care with bowel symptoms. *Gut*. 2016; 65(9): 1463–9.
7. Van Rossum LG, van Rijn AF, Laheij RJ, van Oijen MG, Fockens P, van Krieken HH, et al. Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterology*. 2008; 135(1):82-90.
8. Parra-Blanco A, Gimeno-Garcia AZ, Quintero E, Nicolas D, Moreno SG, Jimenez A, et al. Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac faecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *J Gastroenterol*. 2010;45(7):703-12.
9. NICE Quality standard (QS 124) Suspected cancer. <http://www.nice.org.uk/guidance/qs124>
10. Chiu, H.M., Lee, Y.C., Tu, C.H. et al. Association between early stage colon neoplasms and false-negative results from the fecal immunochemical test. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11: 832–838.

11. Ciatto, S., Martinelli, F., Castiglione, G. et al. Association of FOBT-assessed faecal Hb content with colonic lesions detected in the Florence screening programme. *Br J Cancer*. 2007; 96: 218–221.
12. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, et al. Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2009; 8: 290–305.
13. Fagerhol M, Dale I, Andersson T. A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1980; 16(Suppl): 273–282.
14. Roseth A, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by fecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion*. 1997; 58:276–180.
15. Roseth A, Fagerhol M, Aadland E, Schjønby H. Assessment of the neutrophil dominating protein in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol*. 1992; 27:793–798.
16. Roseth A, Schmidt P, Fagerhol M. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1999; 34:50–54.
17. Mowat C, Digby J, Strachan JA, et al. Faecal haemoglobin and faecal calprotectin as indicators of bowel disease in patients presenting to primary care with bowel symptoms. *Gut*. 2016; 65(9): 1463–9.
18. Mowat C, Digby J, Strachan JA, et al. Faecal haemoglobin and faecal calprotectin as indicators of bowel disease in patients presenting to primary care with bowel symptoms. *Gut*. 2016; 65(9):1463–9.
19. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1998; 44:837-845.

10. ANEXO 1 : Tabla comparación resultados en grupo No Patología.

ID	SOH	CALPROTECTINA
11	Negativo	Negativo
12	Negativo	Positivo
13	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo
18	Positivo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo
23	Negativo	Positivo
24	Positivo	Negativo
25	Negativo	Negativo
27	Negativo	Positivo
28	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo
30	Negativo	Positivo
31	Negativo	Positivo
32	Negativo	Positivo
33	Negativo	Negativo
35	Negativo	Positivo
36	Negativo	Positivo



37	Negativo	Positivo
38	Negativo	Positivo
39	Negativo	Negativo
41	Negativo	Positivo
43	Negativo	Negativo
46	Positivo	Positivo
47	Positivo	Positivo
49	Negativo	Positivo
50	Negativo	Positivo
52	Negativo	Positivo
53	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo
56	Negativo	Positivo
57	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo
60	Negativo	Positivo
61	Negativo	Negativo
64	Negativo	Positivo
65	Negativo	Positivo
66	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo



68	Negativo	Positivo
69	Negativo	Positivo
71	Negativo	Negativo
73	Positivo	Positivo
74	Positivo	Negativo
75	Positivo	Positivo
76	Negativo	Positivo
80	Positivo	Negativo
82	Negativo	Negativo
84	Negativo	Positivo
86	Negativo	Negativo
87	Positivo	Negativo
88	Positivo	Positivo
89	Positivo	Positivo
90	Positivo	Positivo
91	Negativo	Negativo
95	Negativo	Negativo
96	Negativo	Negativo
97	Negativo	Negativo
98	Positivo	Negativo
99	Negativo	Positivo
101	Negativo	Negativo
102	Negativo	Negativo



105	Negativo	Positivo
108	Negativo	Negativo
109	Negativo	Negativo
110	Positivo	Positivo
111	Negativo	Negativo
112	Negativo	Negativo
114	Negativo	Negativo
115	Negativo	Negativo
117	Negativo	Positivo
118	Negativo	Negativo
119	Negativo	Positivo
122	Negativo	Negativo
123	Negativo	Negativo
125	Negativo	Negativo
126	Negativo	Negativo
127	Negativo	Positivo
128	Negativo	Negativo
129	Negativo	Positivo
132	Negativo	Positivo
133	Negativo	Positivo
134	Negativo	Positivo
136	Negativo	Positivo
137	Positivo	Positivo



138	Negativo	Negativo
141	Negativo	Positivo
143	Negativo	Negativo
144	Negativo	Positivo
145	Negativo	Negativo
146	Negativo	Negativo
148	Negativo	Positivo
149	Negativo	Positivo
151	Negativo	Negativo
152	Negativo	Positivo
153	Negativo	Positivo
154	Negativo	Negativo
155	Negativo	Positivo
156	Negativo	Negativo
158	Negativo	Negativo
159	Negativo	Negativo
160	Negativo	Negativo
161	Negativo	Negativo
162	Negativo	Positivo
163	Negativo	Positivo
164	Negativo	Negativo
165	Negativo	Positivo
166	Negativo	Negativo



167	Negativo	Positivo
168	Negativo	Positivo
169	Negativo	Positivo
170	Positivo	Positivo
171	Positivo	Negativo
172	Negativo	Negativo
173	Negativo	Negativo
175	Negativo	Positivo
176	Negativo	Positivo
177	Negativo	Negativo
178	Negativo	Negativo
179	Positivo	Positivo
180	Negativo	Negativo
181	Negativo	Negativo
182	Negativo	Positivo
183	Negativo	Negativo
184	Negativo	Positivo
185	Negativo	Positivo
186	Negativo	Negativo
188	Negativo	Positivo
189	Negativo	Positivo