
TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un método turbidimétrico para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* (CerTest Turbilatex®)

Validation of a turbidimetric method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* (CerTest Turbilatex®)



Universidad Zaragoza

AUTORA: Sheila González Padilla

DIRECTORES: Carlos Sostres Homedes

Enrique Alfaro Almajano

FACULTAD DE MEDICINA ZARAGOZA 2020

ÍNDICE

1. Resumen	3-5
2. Introducción.....	6-12
3. Turbidimetría.....	12-13
4. Objetivos.....	14
5. Material y métodos.....	14-16
6. Resultados.....	17-22
7. Discusión.....	23-25
8. Conclusiones.....	26
9. Bibliografía.....	27-28
10. Anexo I: Consentimiento informado.....	29-30
11. Anexo II: Documento de información sobre el estudio para el paciente.....	31-32
12. Anexo III: Aprobación del CEICA.....	33-35

1.RESUMEN

Introducción: La infección por *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) es una de las infecciones más prevalentes a nivel mundial con una prevalencia en España entre el 48.6 % y el 61.1% de la población. Existen diferentes técnicas invasivas y no invasivas para su diagnóstico.

La detección de antígenos de *H.pylori* en heces permite el diagnóstico no invasivo de la infección por *H. pylori*, así como la evaluación posterior al tratamiento. Recientemente, un nuevo método turbidimétrico *H.pylori* CerTest Turbilatex® (Certest, Zaragoza, España) (CTT) ha sido desarrollado para la detección cuantitativa de antígenos para *H.pylori* en muestras de heces humanas basado en reacciones de aglutinación(antígeno-anticuerpo) in vitro.

Objetivos: Calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del kit diagnóstico CerTest Turbilatex® frente al Test del aliento con urea marcada con C¹³ (TA), técnica de referencia en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Material y Métodos: Se trata de un estudio observacional, unicéntrico, prospectivo en el que se incluyó 100 pacientes mayores de 18 años susceptibles de presentar una infección por *H. pylori*, a los que se les había realizado un test del aliento en el Área III de Zaragoza entre el 13 de enero del 2020 y el 21 de febrero del 2020, que aportaron una muestra de heces para la realización del test CerTest Turbilatex® y que no hubieran consumido inhibidores de la bomba de protones (IBPs) en los 15 días previos o antibióticos en el mes anterior.

Resultados: Un 30% de los pacientes eran hombres y un 70% mujeres con una edad media de 49.96 ±14.40 años. La sensibilidad(S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) del CerTest Turbilatex® fueron 63.04%, 55.55%, 54.71% y 63.82% respectivamente, unos valores subóptimos en comparación con el test del aliento siendo similares en el análisis por subgrupos.

Conclusiones: El test de antígeno en heces evaluado presenta valores bajos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo por lo que no se podría recomendar su uso a gran escala tanto para el diagnóstico como erradicación de *H. pylori* en nuestra población.

Palabras clave: *Helicobacter Pylori*, Test de antígeno en heces, Test del aliento, CerTest Turbilatex®, Validación

2. ABSTRACT

Introduction : *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection is one of the most prevalent infections worldwide with a prevalence in Spain between 48.6% and 61.1% of the population. There are different invasive and non-invasive techniques for diagnosis.

Detection of *H.pylori* antigens in stools allows non-invasive diagnosis of *H. pylori* infection, as well as post-treatment evaluation. Recently, a new turbidimetric method *Helicobacter pylori* CerTest Turbilatex® (Certest, Zaragoza, Spain) (CTT) has been developed for the quantitative detection of antigens for *H.pylori* in human stool samples based on in vitro agglutination (antigen-antibody) reactions.

Objectives: Calculate the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the CerTest Turbilatex diagnostic kit® compared to the urea Breath test marked with C¹³ (UBT), reference technique at the Lozano Blesa University Clinical Hospital.

Material and Methods: This is an observational, prospective study that included 100 patients over 18 years old susceptible to develop an *H.Pylori* infection, who had had a breath test at Zaragoza Area III at between January 2020 and February 2020, who provided a stool sample for the testing for *H. pylori* CerTest Turbilatex® and who had not consumed inhibitors of the proton pump (PPIs) in the previous 15 days or antibiotics in the previous month.

Results: 30% of patients were male and 70% female with an average 49.96 ±14.40 years. The sensitivity (S), specificity(E), positive predictive value (VPP), negative predictive value (VPN) of CerTest Turbilatex® were 63.04%, 55.55% ,54.71% and 63.82% respectively, suboptimal values compared to the urea breath test being similar in subgroup analysis.

Conclusions: The evaluated stool antigen test has low sensitivity, specificity, positive predictive value so large-scale use for both *H.pylori* diagnosis and eradication could not be recommended in our population.

Key words: *Helicobacter Pylori*, Stool Antigen Test, Breath Test, CerTest Turbilatex®, Validation.

2. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H.pylori*) es un bacilo Gram negativo, con forma espirilada y flagelar, microaerófilo exigente que crece en medios de agar sangre enriquecidos y selectivos. Fue descubierto en 1983 y ha supuesto una revolución en el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades gastrointestinales como la úlcera péptica ⁽¹⁾.

2.1. Epidemiología

H.pylori es responsable de la infección crónica bacteriana más frecuente en el mundo afectando a más del 50 % de la población. La prevalencia varía según el área geográfica, nivel socioeconómico y raza ⁽²⁾.

En España, se estima una prevalencia de entre el 48.6 % y el 61.1% de la población, lo que correspondería a un país con una elevada prevalencia ⁽³⁾.

2.2. Mecanismo de transmisión

El mecanismo de transmisión es controvertido, pero se acepta que se produce de persona a persona. Existiendo una transmisión “feco-oral”, en la que *H.pylori* es eliminado a la luz gástrica como consecuencia del rápido recambio celular de la mucosa gástrica y es expulsado con las heces al medio ambiente de forma que contamina aguas y alimentos y la transmisión “oral-oral”, en la que la bacteria a través del reflujo gastroesofágico alcanzaría la cavidad oral contaminando la saliva ⁽²⁾.

2.3. Etiopatogenia

H. pylori es capaz de reconocer y unirse a múltiples receptores de la superficie de células del epitelio gástrico y duodenal, colonizando la mucosa, y dando lugar a inflamación local y respuesta inmune, así como a alteración del pH.

Algunas cepas, presentan factores de virulencia específica: Proteína del gen asociado a citotoxina (Cag A) y citotoxina vacuolizante (Vac A).

Está directamente relacionado con la aparición de gastritis atrófica y metaplasia intestinal, úlceras pépticas gastroduodenales, dispepsia no ulcerosa, adenocarcinoma gástrico (siendo la tercera causa muerte en el mundo relacionada con cáncer) y linfoma

no Hodgkin primario gástrico de bajo grado tipo MALT, aunque la mayor parte de los pacientes infectados permanecerán asintomáticos y libres de complicaciones ^(4,5).

2.4. Indicaciones de diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*

Se han llevado a cabo diversas Conferencias de Consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la infección por este microorganismo, tanto a nivel nacional como internacional.

En España se han llevado a cabo cuatro reuniones, en las dos más recientes ^(6,7) (III y IV Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *H.pylori* en las que se plantearon una serie de objetivos entre los que se encontraban establecer las indicaciones precisas de diagnóstico y tratamiento y clarificar los métodos diagnósticos. El diagnóstico de la infección por *H. pylori* se debería indicar en los siguientes supuestos usando métodos precisos y siguiendo las recomendaciones establecidas por el Consenso ⁽⁶⁾:

- Úlcera péptica.
- Dispepsia no investigada en pacientes menores de 55 años y sin síntomas/signos de alarma. Debido a elevada prevalencia de la infección por *H. pylori* en España, se puede aplicar una estrategia de **test and treat**, consistente en investigar la presencia de *H. pylori* mediante una prueba no invasiva y si se confirma su presencia pautar tratamiento antibiótico sin necesidad de realizar una gastroscopia inicialmente. Si, por el contrario, el paciente tiene más de 55 años o presenta síntomas de alarma (hemorragia digestiva, pérdida de peso, anemia ferropénica, masa abdominal, disfagia o vómitos) sería necesario hacer una endoscopia para descartar una causa orgánica ⁽⁵⁾.
- Dispepsia con endoscopia normal y sin toma de biopsias.
- Pacientes con antecedentes de úlcera que van a requerir tratamiento con AINE o AAS de manera continuada.
- A los familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico.
- Linfoma MALT gástrico de bajo grado. Este puede curarse tras la erradicación de *H.pylori*.
- Resección quirúrgica o endoscópica de un cáncer gástrico.

- Atrofia mucosa gástrica o metaplasia intestinal, ya que se tratan de lesiones preneoplásicas asociadas a la infección por *H.pylori*. Existiendo dudas sobre si la atrofia gástrica puede mejorar con la erradicación y un consenso general sobre que la metaplasia intestinal, es salvo excepciones, irreversible.
- Anemia ferropénica de causa no aclarada.
- Púrpura trombocitopénica idiopática.
- Déficit de vitamina B₁₂ no explicable por otras causas.
- A todo paciente diagnosticado de infección por *H.pylori* se recomienda ofrecer un tratamiento erradicador.

2.5. Métodos diagnósticos

Tradicionalmente, se han clasificado en invasivos y no invasivos. La elección del método a utilizar depende de las circunstancias clínicas del paciente a evaluar, la disponibilidad de la prueba, el cociente de probabilidad de resultados positivos y negativos y su costo-efectividad.

2.5.1 Pruebas invasivas

Se basan en la demostración directa del microorganismo mediante el estudio de muestras obtenidas por biopsia gástrica. Son, por lo tanto, técnicas que precisan de una endoscopia. Se reservan para cuando existe una clara indicación para realizarla y no hay contraindicación para la toma de biopsias ⁽⁵⁾.

Test Rápido de la Ureasa. Por su sencillez, rapidez (nos permite conocer si existe infección en una hora) y bajo coste se considera de primera línea presentando una sensibilidad entre 90-95 % y especificidad 97-100 % ⁽⁵⁾.

Para realizarla, se toma una biopsia del cuerpo y antro gástrico (este último principal lugar de colonización *H.pylori*) y se pone en contacto con un medio líquido que contiene urea y un indicador de pH. Si existe actividad ureasa, el amonio resultante de la descomposición de la urea, alcalinizará el medio y cambiará el color del indicador de pH. Se debe mencionar que su sensibilidad es menor si la densidad bacteriana esta disminuida (inferior a 1 000 - 100 000 bacterias) ^(4,8).

Pueden producirse falsos positivos, aunque es poco frecuente, por la presencia de otras bacterias productoras de ureasa en la muestra mientras que los falsos negativos son más frecuentes y una prueba negativa no excluye el diagnóstico ⁽⁵⁾.

Examen histológico: Fue el primer método diagnóstico, basado en la detección directa de la bacteria y los cambios morfológicos de la mucosa gástrica ⁽⁴⁾. La sensibilidad y especificidad se estiman en torno al 94 y 99%, respectivamente, aunque varían según la zona del estómago de la que se obtienen las muestras en función de la distribución y densidad del patógeno, de la tinción empleada (Giemsa, tinción plata de Warthim-Starry, naranja de acridina, inmunohistoquímica y hematoxilina-eosina son las más usadas) siendo de elección la técnica Giemsa ⁽⁸⁾. En el caso de que la histología sea normal, no se debe realizar tinción inmunohistoquímica ⁽⁵⁾. Reservado cuando la prueba de la ureasa sea negativa. De modo que, aunque en el momento de la endoscopia se tomaran biopsias para ambas técnicas, únicamente se remitirían a estudio histológico las que dieran negativa.

Cultivo: es un método altamente específico de casi el 100 % pero la sensibilidad tiene una variación significativa, entre 85 % y 95 %. Se asocia a un elevado coste, consumo de tiempo, requiere personal con experiencia y la necesidad de condiciones y requerimientos especiales para el transporte, procesamiento y cultivo ^(2,5). Siendo alguna de estas condiciones, atmósferas microaerófilas, alta humedad y temperatura de 37°C. Permite tipificar al microorganismo y determinar el antibiograma identificando las resistencias a los antibióticos ^(4, 5).

Métodos moleculares: Proporcionan una detección más rápida, precisa y sensible de la bacteria que los métodos convencionales, con la posibilidad de extensión a otros fines, como la detección de la resistencia a los antibióticos y los determinantes de la virulencia (gen CagA y VacA) y la cuantificación bacteriana ⁽⁴⁾. Además, se pueden utilizar muestras biológicas distintas de las biopsias gástricas, obtenidas utilizando métodos menos invasivos, como las heces o las muestras de cavidad oral. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección de secuencias específicas de DNA bacteriano, logrando la secuenciación de importantes genes bacterianos responsables de la colonización y patogenicidad por *H. pylori*. Como inconvenientes, presentan una limitada disponibilidad y un mayor coste ⁽⁸⁾.

2.5.2 Pruebas no invasivas

Se basan en el estudio y la detección de ciertas características de la bacteria o de la respuesta del sistema inmunitario frente a la infección (medición de anticuerpos específicos). Su ventaja principal es que no precisan endoscopia.

Prueba del aliento con urea marcada con C¹³ (TA)

Se basa en la capacidad de la bacteria de producir ureasa, una enzima capaz de hidrolizar una solución de urea previamente marcada con C¹³ (isotopo no radioactivo). Si la bacteria está presente, lo desdobla en NH₃ y CO₂ marcado, el cual difunde a la sangre y alrededor de 10 a 15 minutos después, es detectado en el aire espirado que podrá ser colectado y cuantificado por un método de espectrometría de masas o infrarrojos, con el fin de identificar y expresar de modo cuantitativo la infección activa por *H. pylori*.

Es una técnica sencilla, inocua y es la prueba no invasiva más sensible y específica (94% y 96 % respectivamente). Se trata de una prueba útil tanto para el diagnóstico como para el control de la erradicación tras tratamiento antibiótico ^(6,5).

Como inconvenientes, puede presentar falsos positivos debido a la presencia de otras bacterias en el estómago, que también podrían hidrolizar la urea como *Proteus mirabilis* y falsos negativos si el paciente ha consumido recientemente inhibidores de la bomba de protones (IBP), antibióticos o con antecedentes de gastrectomía ⁽⁴⁾.

En el Hospital clínico Universitario se utiliza el test del aliento UBTest[®] (OTSUKA Pharmaceutical Company, Japón) con una alta sensibilidad (95.5%) y especificidad (96 %). Se consideran positivos valores de Δ CO₂¹³ superiores o iguales a 2.5 o/00.

Prueba de detección de antígeno en heces es una alternativa a la prueba del aliento en métodos no invasivos siempre que se utilice el método de ELISA monoclonal, un anticuerpo purificado monoclonal. En el Consenso de Maastricht IV, se recomienda al mismo nivel que la prueba de la prueba del aliento, pero con previa validación local ⁽⁶⁾.

Es útil tanto en el diagnóstico como en el control de la erradicación. Es una técnica sencilla, no agresiva para el paciente presentando una sensibilidad y especificidad similar, aunque ligeramente inferior a la prueba del aliento (94,1 % y 91,8 % respectivamente), posiblemente atribuible a detección de otras Helicobacterias, como las bacterias enterohepáticas.

Además, no requiere personal cualificado para su realización, pudiendo ser recogidas las muestras fecales por el propio paciente en su domicilio, para posteriormente ser llevadas al hospital ⁽⁴⁾.

Se ve influenciada por varios factores, como toma previa de IBP, antibióticos, hemorragia digestiva alta, N-acetilcisteína y no detecta las formas metabólicamente inactivas ^(4,9). Hay dos tipos, el inmunoensayo enzimático (EIA) y los métodos basados en el ensayo de inmunocromatografía (ICA) utilizando anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales siendo más específicas estas últimas ⁽⁴⁾. La prueba utiliza anticuerpos anti-*H. pylori* adsorbidos a través de los poros de una microplaca con el fin de capturar los antígenos de *H. pylori* presentes en una muestra de materia fecal diluida, luego otro anticuerpo marcado con peroxidasa y un sustrato son utilizados, formándose inmunocomplejos, que posteriormente migran por acción capilar y finalmente efectuar la lectura del resultado por espectrofotometría a 450 nm ⁽⁹⁾.

Serología. No se recomienda el uso rutinario para el diagnóstico de la infección ⁽⁶⁾. Detecta anticuerpos Inmunoglobulina G frente a *H.pylori* en el suero del paciente pero no es capaz de discriminar entre personas con infección activa y personas sanas previamente expuestas a la infección. Sus dos inconvenientes son la dificultad de establecer el punto de corte (la sensibilidad y especificidad está muy influenciada por ello) y su validación local, considerándose inferior a las anteriores técnicas descritas. Además, no es útil para evaluar la erradicación ya que los títulos de anticuerpos pueden persistir en sangre durante largos periodos de tiempo incluso después de una erradicación exitosa ^(5,6).

Puede ser de utilidad en estudios epidemiológicos a gran escala y en pacientes con tratamiento reciente con antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, sangrado gastrointestinal que inducen un resultado negativo en otros métodos diagnósticos ⁽⁴⁾.

Tanto si se realiza una prueba invasiva como no invasiva se deben suspender los IBP, al menos dos semanas antes y cualquier tratamiento antibiótico (especialmente aquellos más eficaces frente a *H.pylori*) cuatro semanas antes de la evaluación para evitar falsos negativos en el test de antígenos fecales, test del aliento y prueba de ureasa ^(5,6).

Se recomienda comprobar la erradicación de la infección tras el tratamiento en todos los casos empleando una prueba no invasiva al menos 4 semanas después de finalizar el tratamiento. En el caso de que sea preciso realizar una gastroscopia de control se puede recurrir a la utilización de a métodos directos para confirmar su erradicación ^(5,6).

3. TURBIDIMETRÍA

3.1. Definición de turbidez

Según la Organización Internacional de Normalización (ISO), la turbidez se define como la reducción de transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido. Se basa en la relación entre la intensidad de la luz que incide en la muestra y la que se dispersa por el medio de manera proporcional a la concentración de partículas disueltas, en las cuales influye el tamaño, la forma, la distribución y el estado de la superficie además del índice de refracción y la longitud de onda empleada. Mientras que la correlación entre esa concentración de partículas y la turbidez se llama calibración, influenciada por el tipo de especie bacteriana analizada ⁽¹⁰⁾.

3.2. Técnicas turbidimétricas de medición

La dispersión del haz por las partículas suspendidas se va a detectar como una reducción de la intensidad del haz de luz que recibe el detector, especialmente útil si hay baja cantidad de sólido en la muestra. Hay dos tipos de medidores de turbidez ⁽¹⁰⁾:

- Nefelómetro: cuantifica la intensidad de luz que se dispersa por la muestra de manera que a medida que aumenta la turbidez, aumenta la luz dispersa.
- Turbidímetro: mide la absorbancia de la muestra en estudio empleando un medio líquido de cultivo de microorganismos. Así la luz que se absorbe es proporcional a la concentración de microorganismos presente.

3.3. Sistema para la medición de turbidez

Un sistema para la medición de turbidez consta de fuente de luz (bombilla, LED) que emite a una determinada longitud de onda, la muestra en análisis que se coloca en un recipiente y el fotodetector que se comporta como un sensor óptico recibiendo el haz de luz resultante de la interacción entre la luz incidente y la muestra ⁽¹⁰⁾.

Ese fotodetector envía la señal a un bloque de acondicionamiento que amplifica las señales y las transforma en impulsos eléctricos que llegan a una unidad de procesamiento que lo convierte en una señal analógica-digital y también el valor de turbidez resultante tras el procesamiento ⁽¹⁰⁾.

3.4 Test diagnóstico para *Helicobacter pylori* (CerTest Turbilatex®)

Helicobacter pylori CerTest Turbilatex® (Certest, Zaragoza, España) (CTT) es una prueba diagnóstica turbidimétrica que sirve para la detección cuantitativa de antígenos para *H.pylori* en muestras de heces humanas. Se basa en reacciones de aglutinación in vitro entre las partículas de polietileno microscópicas recubiertas con anticuerpos anti-antígeno y el antígeno. Si el antígeno está presente en la muestra, se unirá a los anticuerpos formando un agregado que se detectará como una pérdida de la luz transmitida que es proporcional a la concentración de antígeno presente.

Es una técnica económica, sencilla de realizar e interpretar, y en la cual el procesado de la muestra es muy rápido y permite el procesado de un gran número de muestras de forma simultánea.

El test diagnóstico es cuantitativo y el fabricante establece unos puntos de corte, siendo el test negativo, con unas concentraciones menores de 0.5 ng/mL y positivo concentraciones iguales o superiores a dicho valor.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del kit diagnóstico en heces de *H. pylori* (CerTest Turbilatex®) frente a la técnica habitual de detección y cuantificación de *H. pylori* en el HCU Lozano Blesa (Test de aliento con urea marcada con C13) que se considera el estándar en nuestro medio. En el HCU Lozano Blesa se utiliza el kit UBTest® (OTSUKA Pharmaceutical Company, Japón)

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Tipo de diseño

Se trata de un estudio observacional, unicéntrico, prospectivo de comparación de pruebas diagnósticas.

5.2. Población de estudio

En el estudio se han incluido de forma consecutiva a pacientes a los que se haya solicitado un test de aliento (TA) desde atención primaria o especializada para la detección de *H. pylori* por considerar que la presencia de la infección puede estar relacionada con la patología o sintomatología del paciente o para comprobar su erradicación tras la administración de una pauta antibiótica.

5.3. Método

Se identificaron los pacientes a los que se les había solicitado o se habían realizado recientemente un TA por ser susceptibles de presentar una infección por *H. pylori*, se valoró si cumplían los criterios de inclusión y exclusión y les invitó a participar en el estudio tras ser informados del carácter del mismo. Tras la obtención del consentimiento informado, se les solicitó que trajeran una muestra de heces el día que se realizaban el TA o en los días inmediatamente posteriores.

Los pacientes tuvieron que seguir las mismas instrucciones que se siguen de forma habitual para la realización de un TA (no haber consumido antibióticos al menos 4 semanas antes ni Inhibidores de la Bomba de protones en las 2 semanas anteriores)

Las muestras de heces fueron almacenadas en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), hasta su procesamiento. Si el análisis se realizó en un plazo inferior a dos días tras la entrada de la muestra en el servicio, la muestra se guardó a 2-8°C. Si el tiempo fue superior, se almacenó a -20°C, para su posterior descongelación y análisis.

Para la técnica de turbidimetría la toma de muestra se realizó en el vial de extracción de muestra del kit de diagnóstico *H. pylori* CerTest Turbilatex®. El procesamiento de la muestra se realizó siguiendo las instrucciones de uso del kit diagnóstico por personal técnico del grupo de Investigación traslacional en Patología Digestiva (GIIS027).

Tras su procesamiento las muestras de heces obtenidas están almacenadas en el Centro de Investigación Biomedica de Aragón (CIBA) donde serán almacenadas hasta la publicación de los resultados por si es necesario repetir algún análisis y posteriormente destruidas al finalizar el estudio

5.4. Criterios de inclusión

- Pacientes a los que se les vaya a realizar un TA por cualquier indicación por ser susceptible de presentar una infección por *H. pylori*.
- Firma del consentimiento informado.
- Pacientes ≥ 18 años.

5.5. Criterios de exclusión

- Negación a firmar el consentimiento.
- Utilización de IBP en los 15 días previos o antibióticos en el mes anterior.

5.6. **Análisis estadístico**

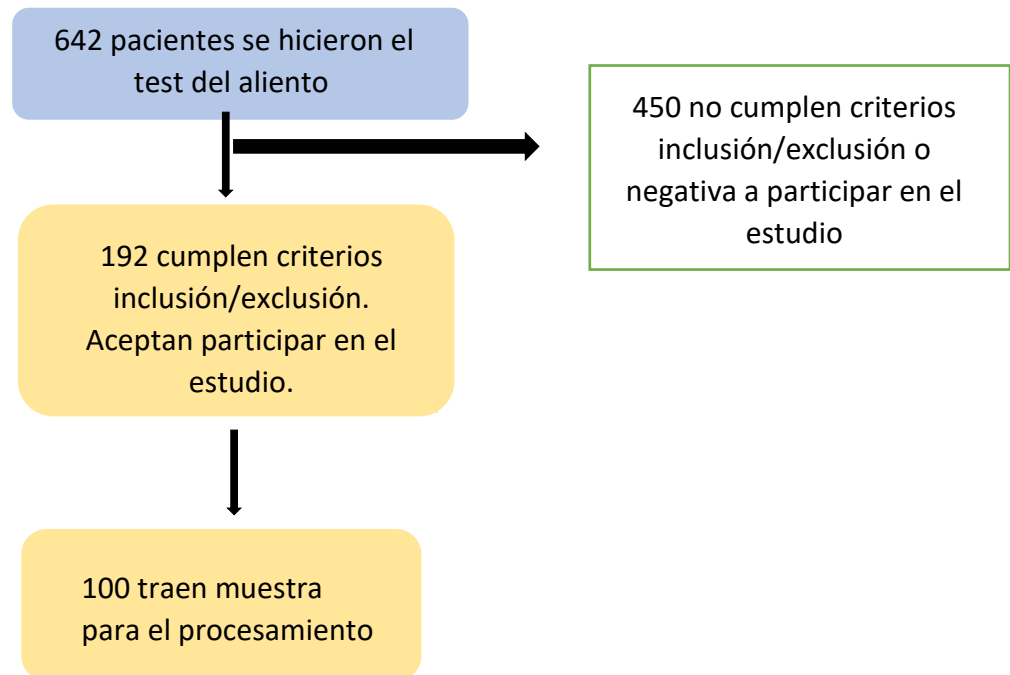
Se realizará un estudio en que se calcularán los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo expresados como porcentajes y con sus respectivos intervalos de confianza del 95% respecto del TA considerado como el “Gold estándar”.

5.7. **Aspectos éticos**

- El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica antes de la inclusión de los pacientes.
- El método empleado para la obtención del consentimiento consistirá en la firma del participante en el estudio. Para ello se ha creado un modelo de consentimiento informado (ANEXO I), que se administrarán a todos los representantes de los participantes, y que deben ser comprendidos, por lo que tendremos que estar a disposición de los mismos para resolver las dudas que puedan plantearse en su lectura.
- El consentimiento informado, que contiene toda la información específica sobre el estudio, se proporcionará a los pacientes y ningún paciente será 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 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (LO 3/2018) y la Ley 41/2002, de información para el paciente, así como el Real Decreto 223/2004). El acceso a los datos del paciente se restringe a los componentes del equipo de investigación, manteniéndose en todo momento la confidencialidad sobre su identidad.

6. RESULTADOS

Se incluyeron 100 pacientes a los que se les había realizado un TA en el área III de Zaragoza entre el 13 de enero de 2020 y el 21 de febrero de 2020, cumpliendo los criterios de inclusión y exclusión del estudio y que aportaron una muestra de heces para la realización del test para *H. pylori* CerTest Turbilatex® en heces. **(Figura 1)**. Diagrama de flujo.



Un 30% de los pacientes eran hombres (30/100) y un 70% mujeres (70/100) con una edad media de 49.96 ± 14.40 .

En cuanto a los motivos de solicitud del TA (**Tabla 1**), el más frecuente fue el control de erradicación 28% (28/100) seguido de la epigastralgia 21% (21/100). Por otra parte, en relación a la procedencia del TA un 89% (89/100) provenían de Atención Primaria y un 11% (11/100) de las consultas de Aparato Digestivo.

El resultado del TA fue de un 54% (54/100) pacientes positivos y un 46% (46/100) negativos.

Tabla 1. Motivo de solicitud del test del aliento

	Frecuencia	Porcentaje
Control de erradicación	28	28,0
Epigastralgia	21	21,0
Dispepsia	20	20,0
Pirosis	8	8,0
Desconocido	6	6,0
Gastritis	6	6,0
Dolor abdominal	4	4,0
Úlcera gástrica	2	2,0
Déficit B12	1	1,0
Disconfort abdominal	1	1,0
Meteorismo	1	1,0
Vómitos	1	1,0
Otros	1	1,0
Total	100	100,0

Se ha calculado globalmente la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del test *H. pylori* CerTest Turbilatex® (CTT) respecto al TA (**Tabla 2**)

Tabla 2. Resultados globales de la comparación entre el test del aliento (TA) y *H. pylori* CerTest Turbilatex® (CTT)

		TA		Total
		Negativo	positivo	
CTT	Negativo	30	17	47
	Positivo	24	29	53
Total		54	46	100

S: 63.04% E: 55.55% VPP: 54.71% VPN: 63.82%.

Índice de Youden (0,6304+0,5555-1): 0,18

Posteriormente se realiza un análisis por subgrupos valorando también S, E, VPP y VPN.

Se han analizado según su proveniencia, según sean realizados en Atención primaria (AP) **(Tabla 3)** en la consulta de Aparato Digestivo (CD) **(Tabla 4)** calculando S, E, VPP y VPN **(Tabla 5)**.

Por otro lado, se han analizado aquellos pacientes que trajeron la muestra para análisis en los primeros 7 días tras la realización del TA **(Tabla 6)**

Las muestras de heces fueron procesadas en cuatro días (23/01/2020 - 30/01/2020 - 21/02/2020 y 10/03/2020) por lo que se ha realizado también el subanálisis en función de dichos días. **(Tablas 7)**

Por otro lado, se analizaron dos subgrupos en relación al procesado de la muestra. Muestras procesadas “en fresco”, en las que se realizó el test en heces sin congelar las heces y otras en las que se congelaron y posteriormente descongelaron para su procesamiento **(Tabla 8)**.

Así mismo, se han analizado por subgrupos, dividiendo la muestra por el motivo de petición en aquellos pacientes a los que se les solicitó el TA para control de erradicación tras tratamiento ATB y aquellos a los que se les pidió por cualquier otra indicación. **(Tabla 9)**.

Por último, se determina la curva ROC **(Figura 2)** y el AUC (0.686) para el test diagnóstico en heces.

Tabla 3. Resultados de la comparación entre el test del aliento (TA) y *H. pylori* CerTest Turbilatex® en pacientes que provienen de Atención Primaria (n=89)

		TA		Total
		negativo	Positivo	
CTT	Negativo	24	16	40
	Positivo	23	26	49
Total		47	42	89

Tabla 4. Resultados de la comparación entre el test del aliento (TA) y *H. pylori* CerTest Turbilatex® en pacientes que provienen de consultas de digestivo (n=11)

		TA		Total
		negativo	positivo	
CTT	Negativo	6	1	7
	Positivo	1	3	4
Total		7	4	11

Tabla 5. Resultados de S, E, VPP y VPN de pacientes que provienen de Atención Primaria (AP) y consultas de digestivo (CD), expresados en porcentajes.

	AP	CD
Sensibilidad	61.90%	75%
Especificidad	51.06%	85.71%
VPP	53.06%	75%
VPN	60%	85.71%

Tabla 6. Resultados de la comparación entre el test del aliento (TA) y *H. pylori* CerTest Turbilatex® (CTT) en pacientes que aportaron la muestra de heces en los primeros 7 días tras la realización del TA (n=76)

		TA		Total
		Negativo	Positivo	
CTT	Negativo	23	14	37
	Positivo	17	22	39
Total		40	36	76

Sensibilidad: 61.11% Especificidad: 57.5% VPP:56.41% VPN: 62.16%

Tabla 7. Resultados de S, E, VPP y VPN en relación al día de procesamiento de las muestras, expresados en porcentajes y número absoluto.

	23/01/2020 n= 9	30/01/2020 n= 22	21/02/2020 n=60	10/03/2020 n=9
Sensibilidad	25%	50%	74.07%	60%
Especificidad	40%	75%	54.54%	25%
VPP	25%	62.5%	57.14%	50%
VPN	40%	64.28%	72%	33.3%

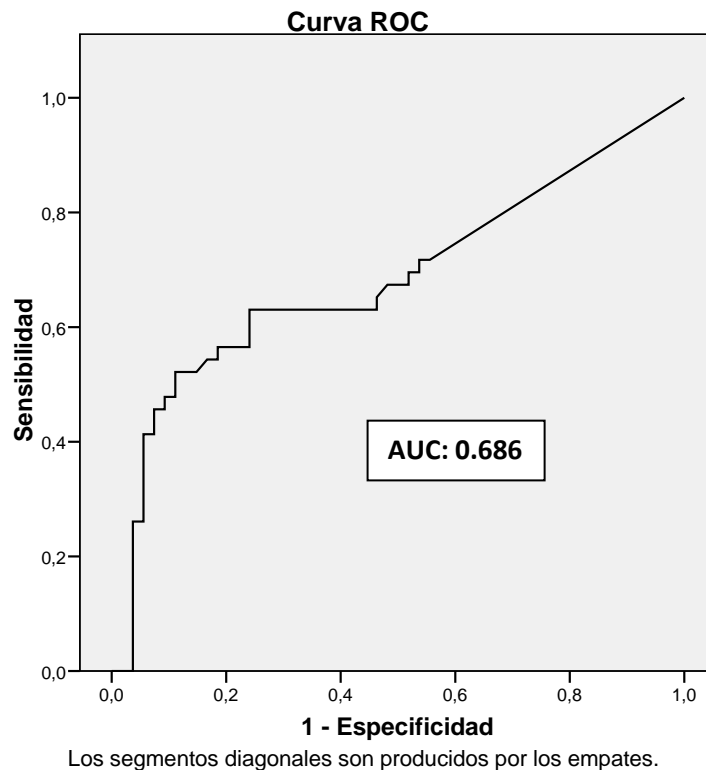
Tabla 8. Resultados de S, E, VPP y VPN en relación con el día procesado de las muestras, heces procesadas “en fresco” con n= 32/100 o congeladas con n= 68/100, expresados en porcentajes.

	Heces “en fresco” n=32	Heces congeladas n=68
Sensibilidad:	41.17%	75.86%
Especificidad:	60%	53.84%
VPP:	53.84%	55%
VPN:	47.36%	75%

Tabla 9. Resultados de S, E, VPP y VPN en relación al motivo de petición, control de erradicación con n= 28 /100 frente a otro motivo de petición n= 72/100 expresado en porcentajes.

	Control de erradicación n=28	Otro motivo de petición n=72
Sensibilidad:	12.5%	73.68%
Especificidad:	80%	41.17%
VPP:	20%	58.33%
VPN:	69.56%	58.33%

Figura 2: Curva ROC para el test *H. pylori* CerTest Turbilatex® (CTT), basado en el resultado del test del aliento (TA). AUC, área bajo la curva Roc



7. DISCUSIÓN

Dada la alta prevalencia de *H.pylori* en nuestro medio es importante la identificación y el diagnóstico correcto de la infección que conlleva un diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado.

En el Servicio de Aparato de Digestivo del Hospital Clínico Universitario, el Gold estándar es el método no invasivo del el Test del aliento cuyos valores de sensibilidad y especificidad son 95,5 % y 96 % respectivamente.

En nuestro estudio, estimamos la precisión del test de antígeno en heces (CerTest Turbilatex) al ser un objetivo perseguido en la actividad clínica rutinaria por tratarse un test más manejable, menos laborioso y que requiere menos recursos humanos. En comparación con el test del aliento descrito, observamos unos resultados subóptimos presentando una sensibilidad de 63,04 % y una especificidad de 55,5 % en el total de la población estudiada que tampoco se asemejan con otros trabajos publicados en la bibliografía internacional ^(12,13) sobre detección de antígeno de *H. Pylori* en heces basados en otras técnicas de inmunoensayo enzimático cuantitativo (ELISA) con anticuerpos monoclonales con valores de sensibilidad entre 82-95 % y especificidad entre 91-100%⁽¹⁴⁾.

En el Certest Turbilatex, del 100 % de los pacientes infectados por *H. pylori* (que dieron positivo en el test del aliento) se obtiene un resultado positivo con el test del antígeno en heces en el 63.04 %, por ende, presenta poca capacidad para detectar infección mientras que del 100 % de la población sana(que dieron negativo en el test del aliento), la prueba es negativa en el 55 %, lo cual indica que este porcentaje de individuos sanos darán negativa en la prueba.

En cuanto a los valores predictivos tampoco fueron altos, el VPP indica que 54.7 %de las veces el test será positivo para pacientes que se encuentren colonizados por *H.pylori* que va unido a la baja especificidad que presenta. Con respecto al VPN, solo el 63.82 % de las veces el test será negativo para pacientes que no estén colonizados, por ello no serviría para descartar.

Presenta un índice de Youden (S+E-1) de 0,18 que también apoya el hecho de que tengan menor calidad los resultados y menor seguridad como prueba diagnóstica al no ser un valor próximo a 1.

En lo referente a la muestra, nuestra población estuvo compuesta por pacientes varones en un 30 % frente a un 70 % de mujeres, con una edad media 49.96 ± 14.40 , que fueron similares en comparación con otros estudios ⁽¹¹⁾. La muestra es representativa presentando una similar prevalencia de infección por *H.pylori* a la de la población general (aproximadamente un 50% de la población).

En cuanto a los motivos de solicitud del test del aliento, también son similares a otros estudios ⁽¹¹⁾ siendo el más frecuente fue el control de erradicación (28%) seguido de la epigastralgia (21%).

Al analizar la probabilidad de verosimilitud entre el resultado del test del aliento y el test de antígeno en heces, encontramos que la verosimilitud positiva es 1.41, lo que indica que es casi 1,5 veces más probable que la prueba resulte positiva en pacientes con test del aliento positivo que en los que tienen una prueba de aliento negativa mientras que es 0,66 veces menos probable que el test de antígeno resulte positivo siendo el test del aliento negativo.

Dado que los resultados globales no han sido los adecuados para poder recomendar este test en heces para el diagnóstico de la infección por *H.pylori* de forma generalizada , hemos realizado un subanálisis en profundidad teniendo en cuenta diferentes variables para evaluar la validez interna y detectar si pudiera haber algún factor que influya en la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo del test.

Primero, evaluamos la procedencia de la petición: atención primaria o consultas de digestivo ya que teóricamente el personal de enfermería de digestivo (que es quien hace habitualmente la prueba) puede estar más familiarizado que el de los centros de salud en la realización del TA. Se vio que la sensibilidad (75 %), la especificidad (85.71%), el valor predictivo positivo (75 %) y el valor predictivo negativo (85.71%) eran un poco mejores en el caso de que procedieran de las consultas de digestivo, pero aun así los resultados no son óptimos (lo ideal sería valores por encima del 90%). Por otra parte, no se puede hacer un análisis comparativo adecuado por la diferencia de tamaño de las

muestras (hay 11 de Digestivo y 89 de primaria). Sería interesante aumentar el tamaño muestral del grupo de Consultas de Digestivo para comprobar si la manera de obtención del test de aliento pudiera influir realmente en los resultados dado que éstos son claramente más concordantes con el test de antígeno en heces que los obtenidos en Atención Primaria.

Otro aspecto que analizamos fue ver si en los pacientes que traen la muestra de heces los primeros 7 días tras la realización del test de aliento mejoran los valores, ya que, aunque se les insiste a los pacientes en las indicaciones acerca de no tomar IBP y antibiótico, a mayor tiempo es más fácil que los pacientes olviden estas recomendaciones y esto pueda influir, pero tampoco mejoraron los valores en éste subgrupo de pacientes.

Otro análisis consistió en establecer si existía relación entre el diferente procesamiento de las muestras y los resultados obtenidos, si se realizó en fresco o congeladas previamente (por si el proceso de congelado y descongelado pudiera haber alterado la muestra de heces o destruido los antígenos de *H.pylori*) sin embargo, se vio que las muestras que se congelaron presentaron mayor sensibilidad (75.86 %) respecto a las muestras en fresco (41.17 %).

También se analizaron los resultados según los días de procesamiento de las muestras congeladas, por si hubiera podido haber algún día que se produjera un error en el laboratorio, aunque previamente se produce un calibrado del sistema y tampoco se observó ninguna tendencia clara.

Y, por último, se comparó en función del motivo de solicitud ya que el test de antígeno en heces por sus características podría diferenciar entre diagnóstico inicial y control post erradicación, pero los resultados no son óptimos y en el control de la erradicación son muy bajos a expensas de falsos positivos, aunque el global no es bueno.

Finalmente, el AUC de la curva ROC es de 0.686, lo cual indica que el test tiene una baja exactitud para el diagnóstico de la enfermedad de manera que no se puede establecer un punto de corte en el que sea mejor la especificidad y sensibilidad al presentar una tasa alta de falsos positivos y negativos.

8. CONCLUSIÓN

- El test de antígeno en heces, **CerTest Turbilatex® (CTT)** estudiado en nuestra población ha presentado valores bajos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo en comparación con el Test del aliento **UBTest®** (OTSUKA Pharmaceutical Company, Japón).
- No se podría recomendar como test no invasivo para su uso a gran escala para la infección por *Helicobacter pylori*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall, B.J. and Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; 1: 1311–1315.
2. Otero R, W., Trespalacios R, A., Otero P, L., Vallejo O, M., Torres Amaya, M., Pardo, R. and Sabbagh, L. *Clinical Practice Guideline For The Diagnosis And Management Of Adult Patients With Helicobacter Pylori Infection*. Vol 30, Colombian Journal of Gastroenterology ; 2015.
3. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017 Aug 1;153(2):420–9.
4. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SSW, et al. Diagnosis of helicobacter pylori infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*. 2015;21(40):11221–11235.
5. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon A, et al. Management of *helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*. 2017;66(1):6–30.
6. Gisbert JP, Calvet X, Bermejo F, Boixeda D, Bory F, Bujanda L, et al. III Conferencia Española de Consenso sobre la infección por Helicobacter pylori. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;36(5):340–374.
7. Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, Bermejo F, Bujanda L, Calvet X, et al. IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol*. 2016;39 (10):697–721.
8. Sebastián J, Ordoñez F, Regino WO. Practical issues in diagnostic tests for Helicobacter pylori infection: a narrative review. *Rev Gastroenterol Peru*. 2017;37(3):246-253
9. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of Helicobacter pylori: ¿What should be the gold standard? *World J Gastroenterol* 2014;20(36):12847–59.
10. Acebo-González D, Hernández-García AT. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2013.44 (1):3-5.

11. Laredo V, Sostres C, Alfaro E, Arroyo MT, Lanás Á. Management of *Helicobacter pylori* infection at the primary care level. The implementation of specific counseling improves eradication rates. *Helicobacter*. 2019;24(3):1–6.
12. Poulak T, Shokouhi B, Vahedi A. Role of *Helicobacter Pylori* stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter Pylori* infection. *J Anal Res Clin Med*. 2017 Aug 31;5(3):86–90.
13. Muñoz MS, Valle Rossi ML, Ferrer L, Medeot R, Herrera Najum P, López L, et al. Utilidad del antígeno de *Helicobacter pylori* en heces como método diagnóstico no invasivo. *Acta Gastroenterológica Latinoam*. 2019;49(1):22–31.
14. Thi HN, Márquez IRF, Ramudo ISV, Rodríguez TA, Brito ICT, Corrales IR. Evaluación del desempeño de dos pruebas para la detección de antígeno de *Helicobacter pylori* en heces. *Rev cubana Med Trop*. 2017;69(1):1–7.
15. Makristathis A, Hirschl AM, Mégraud F, Bessède E. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019 ;24(1):1–7.

ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, (nombre y apellidos)..... con DNI
.....

- Afirmo que he entendido toda la información que se me ha indicado.
- Aseguro que he podido hacer preguntas sobre el estudio.
- Que he recibido suficiente información sobre el estudio.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley orgánica de protección de datos (LO 3/2018).

Y que he hablado con los miembros del equipo investigador (Ángel Lanas, Carlos Sostres o Enrique Alfaro).

Dichos doctores pueden ser contactados llamando al teléfono 976 765700 Extensión 162454, en caso de querer solicitar información la información complementaria del estudio que desee.

Una vez que he comprendido todos estos conceptos, acepto participar y considero que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos posteriores

Declaro haber sido informado de:

- Las medidas que serán adoptadas, a fin de garantizar la confidencialidad y disociación de toda la información sobre mi persona que pueda ser recogida durante el desarrollo del estudio, así como la posibilidad de ejercer mis derechos de privacidad a través de una petición formal al responsable del estudio en el centro de salud.

- La posibilidad de que los resultados globales del estudio pueden ser utilizados por la empresa Certest para la elaboración de material promocional.
- Las muestras de heces obtenidas serán almacenadas en el Centro de Investigación Biomedica de Aragón (CIBA) donde serán almacenadas hasta la publicación de los resultados por si es necesario repetir algún análisis y posteriormente destruidas al finalizar el estudio.

Por todo ello, OTORGO de forma totalmente voluntaria mi CONSENTIMIENTO para:

- Participar en el estudio titulado: **Validación de un método turbidimétrico para el diagnóstico de *Helicobacter Pylori* (CerTest Turbilatex®)**
- El análisis de mis heces
- Recogida de datos sociodemográficos, antropométricos y de salud de mi historia clínica
- Recibir una copia de este consentimiento informado

Al finalizar el estudio deseo ser informado de los resultados obtenidos: SÍ NO

Fecha:/...../.....

Firma del participante

Firma del investigador

DNI del participante

DNI del investigador

ANEXO II. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO PARA EL PACIENTE

INFORMACION SOBRE EL ESTUDIO (PACIENTE)

Objetivo:

- Este documento tiene por objeto pedirle su consentimiento para ser incluido como paciente en un Proyecto de Investigación que el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza está llevando a cabo y que lleva por título: **Validación de un método turbidimétrico para el diagnóstico de *Helicobacter Pylori* (CerTest Turbilatex®)**

Descripción de los procedimientos del estudio:

Se le está solicitando participar en este estudio porque a usted se le ha solicitado un test de aliento desde atención primaria o especializada para la detección de *H. Pylori* porque el médico que ha valorado su caso considera que la presencia de la infección por dicha bacteria puede estar relacionada con la patología o sintomatología que usted presenta.

Si usted decide participar, deberá aportar una muestra fecal en el día, o en los días posteriores a los que se realice el test del aliento. Dichas heces se utilizarán para analizar la precisión de un nuevo método diagnóstico para la detección de *H. Pylori* en heces y compararlo con el test que se usa de forma habitual en el Hospital Clínico (Test del Aliento). Este análisis será llevado a cabo por personal por personal técnico del grupo de Investigación traslacional en Patología Digestiva (GIIS 027) del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, donde se almacenarán sus heces hasta finalizar el estudio. Esta información será recogida en una base de datos.

Con el consentimiento para participar en este estudio, usted autoriza el uso de sus datos clínicos para investigación. Sus datos se almacenarán en el Hospital Clínico y al finalizar los estudios, éstos serán destruidos.

Riesgos:

Su participación en este estudio no supondrá ningún riesgo adicional y no implica ningún cambio en las medidas de diagnóstico y tratamiento que se le van a aplicar.

Participación voluntaria:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, las conclusiones derivadas del estudio posiblemente ayuden a un manejo más eficiente de la infección por *H. pylori* ya que se aumentarán las opciones diagnósticas. No está prevista ninguna compensación económica por este motivo.

Confidencialidad:

Los datos recogidos sobre su enfermedad serán tratados de forma confidencial. Una vez obtenida, **su nombre en ningún momento aparecerá asociado a los datos ya que éstos serán identificados únicamente por un número o conjunto de dígitos.** A la relación de estos datos con su persona sólo tendrán acceso los investigadores del estudio.

Información:

Los doctores E. Alfaro, C. Sostres, A. Lanas del Servicio de Aparato Digestivo de este Hospital, le darán toda la información complementaria del estudio que usted desee. Dicho doctor puede ser contactado llamando al teléfono 976 765700 Extensión 162454



Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 03/07/2019, Acta Nº 13/2019 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: VALIDACIÓN DE UN METODO TURBIDIMÉTRICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE Helicobacter pylori (CerTest Turbilatex®)

Promotor: CerTest Biotec, S.L.

Investigadores Principales: Angel Lanas Arbeloa y Carlos Sostres Homedes, HCU Lozano Blesa

Versión protocolo: V.1.3

Versión documento de información y

consentimiento: V.1.3 2º. Considera

que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuada la utilización de los datos y los documentos para recabar el

consentimiento informado.

- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del estudio.**

Lo que firmo en Zaragoza

Firmado digitalmente por

MARIA GONZALEZ HINJOS

DNI 03857456B

03857456B Fecha: 2019.07.04 13:08:51

María González Hinjos Secretaria del CEIC Aragón
(CEICA)

Página 1 de 1

Tel. 976 71 5836 Fax. 976 71 55 54 Correo electrónico mgonzalezh.ceic@aragon.es