

Trabajo de Especialización

Comparación de métodos diagnósticos para la detección de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas en pacientes con trastornos gastrointestinales

Por Laino Silvana Paola¹, Boggio Elisa², Martín Mauricio³, Cáceres Eliana⁴, Ruiz Susana Eugenia².

1. Alumna de la Especialización en Bioquímica Clínica, área Bacteriología, FCQ, UNC. Servicio de Microbiología, Laboratorio LACE SA, Córdoba, Argentina.

2. Servicio de Microbiología, Laboratorio LACE SA, Córdoba, Argentina.

3. Servicio de Biología molecular, Laboratorio LACE SA, Córdoba, Argentina.

4. Servicio de gastroenterología, Instituto Oulton, Córdoba, Argentina.

Correspondencia: Laino Silvana Paola. Servicio de Microbiología. Laboratorio LACE SA. Avenida Vélez Sarsfield 528, CP 5000 Córdoba, Argentina. sil.laino7@gmail.com. Cel.: 3516694050

Resumen:

El diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es importante debido a que su detección y erradicación temprana es crucial para evitar la evolución a largo plazo de las enfermedades gastroduodenales relacionadas a dicho microorganismo. Existen diferentes métodos diagnósticos, invasivos y no invasivos, con ventajas y limitaciones.

En este estudio, se compararon distintos métodos (Cultivo, Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), Test de ureasa rápido, Anatomía patológica y Tinción de Giemsa) en muestras de biopsias gástricas obtenidas de 78 pacientes con sintomatología compatible con gastritis. Se evaluó su sensibilidad y especificidad a fin de proponer una estrategia diagnóstica útil. Se identificaron 29 casos positivos para al menos 2 de las 5 pruebas realizadas, lo que representa un 37 % de la población estudiada. Los resultados de este estudio sugieren que, en la práctica clínica de rutina, el uso de 2 o más técnicas es necesario para lograr un diagnóstico confiable, siendo la mejor combinación RT-PCR y cultivo.

Abstract:

The diagnosis of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is important due to the relevance of the detection and early eradication is crucial to avoid the long-term evolution of gastroduodenal diseases related to this microorganism. There are different diagnostic methods, invasive and non-invasive, each with advantages and limitations.

In this study, different methods such as microbiological culture, Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), rapid urease test, histopathology and Giemsa stain, were compared, in gastric biopsy samples obtained from 78 patients with gastritis symptoms. The sensitivity and specificity were evaluated in order to propose a useful diagnostic strategy. 29 cases were positive for at least 2 out of 5 tests, representing 37% of the studied population. However, the positive pair varied. The results of this study suggest that in routine clinical practice, the use of 2 or more test is necessary to achieve a reliable diagnosis, being the best combination RT-PCR and culture.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, diagnóstico, endoscopia, métodos invasivos.

Introducción:

H. pylori es una bacteria Gram negativa de forma espiralada o helicoidal, microaerófila, que presenta de dos a seis flagelos que le otorgan gran movilidad; es considerada una bacteria exigente ya que requiere medios suplementados para su crecimiento (1). Coloniza el tracto gastrointestinal y causa inflamación local en el estómago y duodeno (2-3).

Se estima que la infección por *H. pylori* afecta al 50 % de la población mundial (4-5). En los países subdesarrollados y en desarrollo el 80% de los adultos y el 50% de los niños están colonizados (6). La prevalencia varía ampliamente según el área geográfica, la edad, la raza y el nivel socioeconómico (7). La agresividad de la infección y el daño a la mucosa gástrica están determinados por diversos factores, entre ellos: la virulencia de la cepa, el gen citotóxico asociado A (cag A), la respuesta inflamatoria, las características bacterianas, la condición del hospedador y los factores ambientales (8).

La adquisición natural del microorganismo ocurre con frecuencia en la infancia y una vez que se establece, la infección persiste durante toda la vida, aunque también se ha descrito su eliminación natural. Se considera que su contagio es por contacto interpersonal, aunque el contacto con animales o con agua contaminada también se han considerado ocasionalmente como fuentes potenciales de infección (9). *H. pylori* está relacionado con muchas enfermedades gastroduodenales incluyendo gastritis activa crónica, úlcera péptica, gastritis atrófica, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) y cáncer gástrico (10-11-12).

La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos que requieren endoscopia con toma de biopsia gástrica [prueba rápida de la ureasa, tinciones histológicas, cultivo y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o PCR en tiempo real (RT-PCR)] o no invasivos, que no requieren endoscopia previa (prueba del aliento, serología

y detección de antígeno en materia fecal) (13). Por el potencial patogénico de esta bacteria resulta necesario contar con métodos eficaces para su detección y erradicación temprana (14).

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional descriptivo y prospectivo, donde se estudiaron muestras de biopsias gástricas tomadas por video endoscopia digestiva alta (VEDA) provenientes de pacientes con gastropatías, que concurren al Servicio de Gastroenterología del Instituto Oulton en la ciudad de Córdoba, Argentina, durante el período comprendido entre julio de 2017 y enero de 2018. Se analizaron 78 muestras de pacientes cuyas edades estaban comprendidas entre 23 y 78 años. Se excluyeron pacientes con tratamiento antibiótico previo en los últimos tres meses a la realización de la biopsia.

Como este microorganismo presenta una forma de colonización denominada distribución en parches, para tomar muestras representativas, se obtuvieron 2 muestras de biopsias gástricas por VEDA en cada paciente, una del antro y otra del cuerpo. Las muestras fueron conservadas a 4° C en medio de transporte Cary Blair y remitidas al Laboratorio Lace S.A. en un plazo no superior a 24hs. Las biopsias fueron fragmentadas y divididas en alícuotas para ser estudiadas mediante los diferentes métodos diagnósticos: Análisis histológicos, Cultivo, Prueba de ureasa rápida, RT-PCR y Tinción de Giemsa.

Cultivo:

Las biopsias fueron sembradas en medios selectivos (Agar sangre Columbia, suplementado con sangre de carnero 10 %, carbón al 2 %, hemina al 0.2 % y suplemento V.C.N.T con solvente Britania). Se incubaron en ambiente micro aerófilo [(80% -90%) N₂, (5% -10%) CO₂, (5% -10%) O₂] en jarra con sobres generadores de atmósfera (GEN-box microaer Bio Mérieux) a 35° C durante 7 días (15). Los cultivos se examinaron cada 48 hs y las colonias sospechosas (pequeñas de 1-2 mm de

diámetro, puntiformes, no hemolíticas y translúcidas) fueron identificadas a través de la tinción de Gram y la positividad de las pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa.

Prueba de ureasa rápida (RUT):

Se colocó una alícuota de biopsia en un tubo de Khancon caldo urea al 2 % (preparado en el laboratorio), y fue incubado a 35° C durante 48 hs. Un cambio de color en el medio de amarillo a rosa-fucsia se consideró una reacción positiva. Se utilizó como control positivo cepa ATCC 700603 de *Klebsiella pneumoniae* y como control negativo cepa ATCC 25922 de *Escherichiacoli*.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR):

Se procedió a la extracción de ADN de las muestras de biopsias homogenizadas y se realizó RT-PCR con el equipo Light Cyler Fast Start DNA Master Hyprobe de Roche, para detectar el genARNr 23s.Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización 10 min a 95°C, amplificación (50 ciclos), Melting (0s a 95°C, 10s a 45°C), aumento de la temperatura a 85°C y medición de la fluorescencia de la sonda(16).

Identificación histológica:

Una alícuota de las biopsias de cuerpo y antro fueron analizadas por el servicio de anatomía patológica del Instituto Oulton.

Tinción de Giemsa:

Una parte de los fragmentos de biopsia fueron colocados sobre un portaobjeto, el cual fue teñido por la coloración de May-Grünwald-Giemsa. La tinción se observó por microscopia óptica a 100x con aceite de inmersión en al menos 50 campos. Se consideró positivo cuando se visualizó la presencia de microorganismos con morfología de bacilos curvos, espiralados y con un patrón característico en cardumen sobre los acúmulos de las células gástricas y polimorfonucleares.

Método estadístico:

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Excel versión 2016.Mediante tablas de contingencias se calculó sensibilidad,

especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para cada método realizado.

Definición de caso:

Se consideró como definición de caso positivo para infección por *H. pylori* cuando éste fue identificado al menos por 2 pruebas diagnósticas de las 5 realizadas. De esta manera se constituyeron dos grupos: pacientes con infección por *H. pylori* (*H. pylori* +) y sin infección (*H. pylori*-).

Resultados

De las 78 muestras de biopsias analizadas por los distintos métodos diagnósticos se obtuvieron resultados positivos en 25 (32%) biopsias analizadas por cultivo, 34 (43.6%) por RT-PCR, 21 (26.9%) por RUT,9 (11.5%) por Anatomía patológica y 15 (19.2%) por Giemsa. Se detalla en la **Tabla 1** el número de casos por método y en la **Figura 1** el porcentaje de resultados por método realizado.

<u>Métodos</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
<u>Cultivo</u>	<u>25</u>	<u>53</u>
<u>RT-PCR</u>	<u>34</u>	<u>44</u>
<u>Test de ureasa rápido</u>	<u>21</u>	<u>57</u>
<u>Anatomía patológica</u>	<u>9</u>	<u>69</u>
<u>Giemsa</u>	<u>15</u>	<u>63</u>

Tabla 1: Número de casos por método realizado.

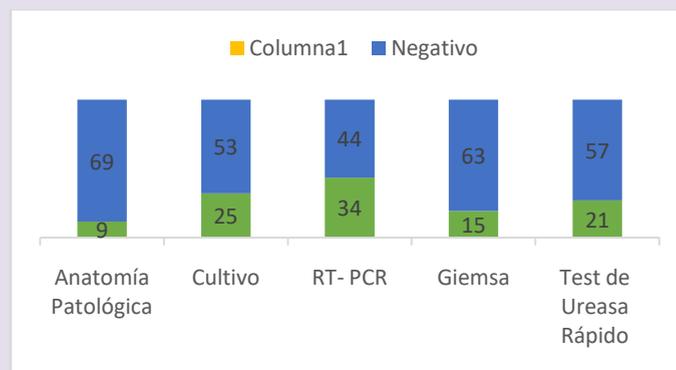


Figura1: Porcentaje de resultados por método realizado.

El método individual que detectó el mayor número de casos positivos fue la RT-PCR,

mientras que la anatomía patológica fue el más bajo.

De acuerdo a la **definición de caso**, de los 78 pacientes estudiados 29 (37.2 %) presentaron infección por *H. pylori*, mientras que 49 (62.8 %) no se asociaron a la misma. La prevalencia estimada fue del 37%.

Dentro de los 29 pacientes pertenecientes al grupo (*H. pylori*+), sólo 6 fueron positivos por todos los métodos diagnósticos, 11 por todos menos por anatomía patológica, 1 por todos salvo la prueba de la ureasa, y los 11 restantes por combinación de sólo 2 pruebas diagnósticas. La combinación de técnicas positivas que mejores resultados demostraron fueron el cultivo y la RT-PCR (23 pacientes).

En la **Tabla 2** se expresan los valores obtenidos por los distintos métodos diagnósticos para sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VP P (%)	VP N (%)
Cultivo	86	100	100	93
RT-PCR	94	86	83	96
Test de ureasa rápido	68	98	95	85
Giemsa	75	100	100	92
Anatomía Patológica	31	100	100	78

Tabla 2: Porcentajes de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Negativo, de cada Método.

Discusión

Hasta ahora los métodos endoscópicos con toma de biopsia constituyen la prueba de elección para establecer el diagnóstico de infección por *H.pylori*, aunque la prueba gold standard puede no existir, la elección del test para detectar la presencia de dicha bacteria, depende de la accesibilidad, experiencia del personal, medios o recursos disponibles,

ventajas y desventajas de cada método como así las diferentes circunstancias clínicas de cada paciente (edad, nivel socioeconómico, antecedentes familiares, medicación previa, etc.)(9).

Las pruebas de diagnóstico se fundamentan cada vez más en métodos moleculares que proponen una prueba más rápida, sensible y específica, con posibilidad de detección de resistencia a antibióticos y determinantes de virulencia. Además, puede realizarse a partir de diferentes matrices biológicas: saliva, heces, biopsias, jugo gástrico entre otros (17).

El mayor porcentaje de resultados positivos se obtuvo a partir de la RT-PCR, la cual proporciona una excelente sensibilidad (S) 94% y especificidad (E) 86%. El comportamiento que mostraron nuestros resultados fue similar al del estudio realizado por Syahniar y col. en enero del 2019, Indonesia (18), en el cual reportaron valores de (S) 88.9 % y (E) 85.5% para este método. En concordancia, otros autores, Harris. P y col., en Chile, encontraron valores semejantes (S) 85-96% y (E) 90-100% (19). Por otra parte, los resultados obtenidos fueron mayores a lo reportado por Cosgun y col., Turquía, en el año 2016, (S) 88.7 % y (E) 70 % (20). Estas diferencias se pueden atribuir a las condiciones de ensayo, zona geográfica, recursos disponibles, prevalencia de infección, entre otras variables.

De todas las pruebas diagnósticas que se estudiaron, el cultivo es considerado el método de referencia. En nuestro análisis este método arrojó una (S) 86 % y (E) 100 %, lo cual concuerda con diversas citas internacionales que determinan que la sensibilidad del cultivo es inferior a la de otras técnicas diagnósticas y la especificidad es cercana al 100 % (21-22). La desventaja de esta técnica es que puede presentar falsos negativos que se asocian a diversos factores tales como toma previa de antibióticos, uso de anestésicos como simeticona o sustancias de limpieza del endoscópico como glutaraldehído, desecación de la biopsia, condiciones atmosféricas, tiempo

de procesamiento, medios de transporte, entre otros (23-24).

Con respecto a los datos reportados por métodos de cultivo en América del Sur no se observan diferencias significativas a las de nuestro estudio ya que mostraron cifras de (S) 77-93 % y (E) 100 % (19-25).

Por otro lado, un estudio realizado por Cosgun y col (2016) muestra datos de (S) 68.1% y (E) 100 % (20). En comparación, nuestros resultados fueron mayores en sensibilidad e iguales en especificidad.

El cultivo mostró un excelente valor predictivo positivo (VPP) 100 %, lo cual nos permite asegurar que los pacientes con resultados positivos presentan la bacteria de forma viable en sus biopsias. En cuanto a la RT-PCR el (VPP) 83 % fue menor, probablemente debido a que la técnica detecta ADN, pudiendo no encontrarse el microorganismo en forma activa.

El test rápido de la ureasa es un método simple, rápido, económico y útil en el entorno clínico (22). En nuestro caso los valores obtenidos fueron (S) 68 % y (E) 98 %. En un estudio realizado por Harris. P y col se mostraron datos de (E) 93-98 % semejantes, sin embargo, la (S) 89-98 % fue mayor a lo reportado en nuestro trabajo (19). En cambio, Pourakbari y col. en un trabajo similar, obtuvieron (S) 95.9 % y (E) 85 %, mostrando una diferencia significativa en cuanto a sensibilidad (26). Si bien es una técnica práctica, la seguridad diagnóstica de la prueba depende de la localización de la biopsia utilizada, de la carga bacteriana y del tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones (9), por lo tanto, su interpretación debería confirmarse con otro método diagnóstico.

El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*. La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además, permite detectar zonas de metaplasia intestinal (9). En nuestro estudio encontramos una (S) 31 % y (E)

100 %. Estos datos muestran valores inferiores de sensibilidad en comparación con lo reportado por la literatura, mientras que no se observan diferencias en cuanto a especificidad (22). Cosgun y col obtuvieron (S) 94.8 % y (E) 100 % mientras Pourakbari y col reportaron (S) 100 % y (E) 90 % (20-26).

La sensibilidad de esta técnica depende de la experiencia y dedicación del patólogo, de la tinción empleada y de la cantidad, calidad y lugar de obtención de las biopsias. Son raros los falsos positivos, debidos a la presencia de otras especies de *Helicobacter*, siendo más frecuente los falsos negativos, que puede deberse a la ausencia o al escaso número de bacterias (por ser la colonización focal), a la toma de muestras de áreas de metaplasia o atrofia, a la presencia de formas atípicas o a una falta de atención del observador (27). Si bien este método es el más utilizado actualmente en el diagnóstico de la enfermedad, debería complementarse con algún método que presente mayor sensibilidad.

La presencia de bacterias móviles espirales típicas acompañadas de una reacción inflamatoria en las secciones histopatológicas del estómago fue el primer método descrito para el diagnóstico de *H. pylori*, junto con las tinciones aplicadas rutinariamente como Giemsa. En nuestro estudio, por el método de tinción de Giemsa obtuvimos (S) 75 % y (E) 100%. La exactitud depende del número, del sitio y el tamaño de la muestra (28). Si bien *H. pylori* puede detectarse incluso en una sola biopsia tomada del sitio correcto, para lograr una mayor sensibilidad, se recomiendan múltiples biopsias (29).

Conclusión

Combinar los resultados de dos o más pruebas podría ser una estrategia razonable en la práctica clínica de rutina para lograr el resultado más confiable. Hoy en día además de las pruebas invasivas, que siguen siendo los métodos de referencia, los métodos no invasivos están logrando resultados muy buenos y seguros, sobre todo en la población infantil. Es

así que existen equipos comerciales para la detección del antígeno en materia fecal con un rendimiento alto y resultados fiables en el tratamiento y erradicación. Tanto los métodos invasivos como no invasivos contribuyen a mejorar el enfoque clínico actual y el manejo de las enfermedades asociadas a *H. pylori*.

Debido a la alta incidencia de esta bacteria a nivel mundial, es recomendable seguir analizando y estudiando los métodos para llegar de manera más rápida y segura a su detección.

Agradecimientos

Al laboratorio LACE S.A. por la provisión de recursos y reactivos para la realización del proyecto.

A los integrantes del Servicio de Gastroenterología del Instituto Oulton.

Referencias Bibliográficas

1. Cervantes-García E. Helicobacter pylori e infecciones asociadas. Rev Fac Med.2006; 49 163-168.
2. Ozden.A. Helicobacter pylori 2006” WGO-OMGE practice guideline and Maastricht III Florence Consensus Report 2005”.Guncel Gastroenterol.10,287-91.
3. Marshall B., Warren J. Unidentified bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.1984. Lancet, 16,1311–1315.
4. Axon A. Helicobacter and public health. Review Article 2014,19(Suppl.1):68-73. DOI:10.1111/hel.12155
5. Windhan I., Servetas S., Whitmire J.,Pletzer D, Hancock R., Merrel D. Helicobacter pylori Biofilm Formation Is Differentially Affected by Common Culture Conditions, and Proteins Play a Central Role in the Biofilm Matrix. Appl Environ Microbiol. 2018; 84(14): 391-18. Doi: 10.1128/AEM.00391-18.
6. Castillo-Montoya V., Ruiz-Bustos E., Valencia-Juillerat M., Alvarez-Hernandez G., Sotello-Cruz N. Detección de Helicobacter pylori en niños y adolescentes mediante coproantígeno y su asociación con gastropatías. Cir y Cir 2017. 85(1): 27-33.
7. Wang Y., Liu C., Kuo F., Wu M. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: Current options and developments. World J Gastroenterol 2015 October 28;21(40): 11221-11235.
8. De Bernard M., Josenhans C. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection Review Article.Vol 19, Special Issue: The Year in Helicobacter 2014, (Suppl.1)11-8.DOI: 10.1111/hel.12160.
9. López-Brea M., Alarcón T., Baquero M., Domingo D., Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori. Procedimientos en Microbiología Clínica, 2004.SEIMC.
10. Peleteiro B., Bastos A., Ferro A., Lunet N. Prevalence of Helicobacter pylori infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. Dig Dis Sci 2014; 59: 1698-1709 DOI:10.1007/s10620-014-3063-0.
11. Yamamoto Y., Fujisaki J., Omae M., Hirasawa T., Igarashi M. Helicobacter pylori: características y hallazgos endoscópicos. Dig Endosc 2015. 27: 551–561. doi: 10.1111 / den.12471
12. Yang K., ChuA.,Liao C., Lin Y., Wang G. Evaluation of the role of H.pylori infection in pathogenesis of gastric cancer by immunoblot assay. World J Gastroenterol, 12, 7029-32.
13. Bermudez Diaz.L, Torres Dominguez.L, Rodriguez Gonzalez.B. Techniques used for the Helicobacter pylori infection detection. RevMed 17 noviembre 2008. Habana Cuba. Vol. 48 01-09. Http: www.bvs.sld.cu
14. Mégraud F, Lehours P. “Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing,” Clinical Microbiology Reviews, vol. 20, no. 2, pp. 280–322, 2007.
15. Park SA, Ko A, Lee NG. Stimulation of growth of the human gastric pathogen Helicobacter pylori by atmospheric level of oxygen under high carbon dioxide tension. BMC Microbiol 2011; 11: 96 DOI: 10.1186/1471-2180-11-96.
16. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P. “Real-Time PCR Assay for Rapid and Accurate Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Claritromycin in Helicobacter pylori.”Journal of Clinical Microbiology, Jan 2003, pag 397-402. DOI: 10.1128/JCM.41.1.397-402.
- 17.Simala-Grant JL, Taylor DE. Molecular biology methods for the characterization of Helicobacter pylori infections and their diagnosis. APMIS 2004; 112:886–97.
- 18.SyahniarR, Mardiasuti H, Wahid, Ari F. Syam, Andi Y. Detecting the Helicobacter

pylori 16S rRNA Gene, Indones J Intern Med, vol. 51, no. 1,2019.

19. Harris P, Serrano C, González F. Utilidad del diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. Rev Chil Pediatr 76 (3); 241-251, 2005

20. Cosgun.Y, Yildirim. A, Yucel.M, Karakoc.A, Koca.G, Gonultas. A y col. Evaluation of Invasive and non invasive Methods for the diagnosis of *Helicobacter Pylori* Infection.Asian Pac J Cancer Prev 2016. 17 (12),5265-5272. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5265.

21. Gisbert, J.P. Revisión crítica de los métodos diagnósticos de infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol. 2000; 23: 135-143.

22. Talebi A, Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and noninvasive approaches. Journal of Pathogens, 2018. doi.org/10.1155/2018/9064952,13 pages.

23. Borody TJ, Andrews P, Shortis NP, Huskamp K, Leube C. Failure to use combined tests may miss *Helicobacter pylori* diagnosis. The Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori* Houston, TX, September 1994.

24. Brown KE, Peura DA. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22: 105-115.

25. Ogata S, Kawakami E, Patricio. F, Evaluation of Invasive and non-invasive methods for the diagnosis pf *Helicobacter Pylori* infection in symptomatic children and adolescents. Rev Paul 2011;119(2):67-71

26.Pourakbari B., Ghazi M., Mahmoudi S., Mamishi S. Azhdarkosh H, Kazemi B. y col. Diagnosis of *Helicobacter Pylori* infection by invasive and noninvasive tests. Brazil J of Microbiol.44;3, 795-798(2013).

27. Pajares, J.M. Infección por *Helicobacter pylori*. Rev Clin Esp. 2002; 202 (2): 99-110.

28. Lee, J.Y.; Kim, N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: Histology. Ann. Transl. Med. 16. 29. 2015, 3, 10.

29.Sudraba A, Daugule I, Rudzite D, Funka K, Tolmanis I, England L y col. Performance of

Routine *Helicobacter pylori* tests in Patients with Atrophic gastritis.J Gastrointest Liver Dis. December 2011. Vol.20 No 4,349-354.