

Nuevas evidencias sobre la utilidad diagnóstica de una fórmula no comercial para la detección de la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas

New Evidences About the Diagnostic Usefulness of a Non-Commercial Test for Detection of Helicobacter pylori Urease Activity in Gastric Biopsies

Fuenmayor B., Alisbeth¹; Hernández R., Ileana²; Paz M., América³; Cavazza, María E.⁴ y Lizarzábal G., Maribel⁵

¹ Cátedra de Bacteriología Clínica, Escuela de Bioanálisis, LUZ.

² Laboratorio de Investigaciones Gastrointestinales, Instituto de Investigaciones Biológicas, LUZ. ³ Práctica Profesional de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis, LUZ. ⁴ Laboratorio de Histoquímica, Instituto de Biomedicina, MSDS-UCV. ⁵ Servicio de Gastroenterología, Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.
E-mail: afuenmabos@hotmail.com.

Resumen

La asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de enfermedades gastro-duodenales y cáncer gástrico, exige disponer de pruebas confiables para diagnosticar esta infección. La prueba rápida de ureasa, ampliamente difundida, es una herramienta valiosa para este fin, pero su elevado costo limita su aplicabilidad en nuestro medio. En el presente trabajo se evaluó la validez diagnóstica de una prueba de ureasa no comercial y de bajo costo, preparada con agar urea de Christensen, aplicada a biopsias gástricas antrales de 75 adultos sintomáticos, sometidos a endoscopia gastrointestinal. Como criterio de infección, se empleó la positividad a cualquiera de las siguientes metodologías: cultivo bacteriológico, coloración histológica de Giemsa y reacción en cadena de la polimerasa. De 37 pacientes en quienes se detectó la infección, 35 fueron correctamente diagnosticados mediante esta prueba (94.6%). 29 de ellos (82.8%) fueron detectados a las dos horas de incubación. Al realizar la lectura a las 24 horas de incubación, se redujo significativamente la tasa de falsos negativos, y se incrementaron la sensibilidad y la exactitud diagnóstica. En conclusión, el comportamiento de la prueba de ureasa ensayada sugiere que ésta es una herramienta altamente confiable y de bajo costo para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en individuos sometidos a endoscopia gastrointestinal.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, diagnóstico, prueba de ureasa, biopsia gástrica, endoscopia gastrointestinal.

Abstract

The role of *Helicobacter pylori* on the development of gastro-duodenal diseases and gastric cancer, demands the availability of reliable tests to diagnose that infectious disease. The rapid urease test, widely used, is a valuable tool for this purpose, but its expense limits the applicability of this test in our country. In this research, the diagnostic validity of a non-commercial inexpensive urease test was evaluated. It was prepared with Christensen's urea agar, applied to antral gastric biopsies from 75 symptomatic adults who were submitted to digestive endoscopy. The positive result to any of the following methods was used as infection criteria: bacteriologic culture, Giemsa histological stain and polymerase chain reaction 35 out of 37 patients, in whom the infection was detected, were correctly diagnosed by this test (94.6%), and 29 of them (82.8%) were detected after two-hour incubation. The rate of false negatives was significantly reduced, and both sensitivity and diagnostic accuracy were increased in the readings practiced after 24-hour incubation. In conclusion, the performance of the urease test evaluated suggests that this is a highly reliable and low cost tool for the diagnosis of *H. pylori* infection in individuals submitted to digestive endoscopy.

Key words: *Helicobacter pylori*, diagnosis, urease test, gastric biopsies, gastrointestinal endoscopy.

Introducción

Desde la primera descripción realizada por Warren y Marshall en 1983 (1), sobre la relación existente entre la presencia de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y el desarrollo de inflamación crónica en el estómago humano, se han acumulado evidencias clínicas y epidemiológicas suficientes para atribuirle a esta bacteria un papel crucial como agente causal de varias enfermedades gastrointestinales severas, entre las que se incluyen: la enfermedad ulcero-péptica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma gástrico tipo MALT.

Debido a la importancia que puede llegar a representar la infección crónica por *H. pylori* en la evolución de las lesiones gástricas hacia la malignidad, particularmente en individuos en quienes confluyan determinadas características genéticas, inmunológicas y epidemiológicas (2), resulta imperativo disponer de herramientas confiables y accesibles para la detección de esta bacteria en la mucosa gástrica. Aunque en la actualidad existe una gran variedad de metodologías

diagnósticas invasivas y no invasivas, directas e indirectas, aún no ha sido definido un "estándar de oro" entre las pruebas para diagnosticar la infección por *H. pylori* debido a que todas poseen ventajas, desventajas y limitaciones. En la práctica clínica, predominante en nuestro medio, en contraste con los protocolos recomendados por los científicos clínicos en los países desarrollados, no resulta económicamente factible ensayar varias pruebas diagnósticas para cada caso, de modo que se continúa en la búsqueda de aquella que reúna el mayor número de ventajas y que permita detectar la infección de manera confiable (3).

En este sentido, la prueba rápida de ureasa en biopsias gástricas permite la detección indirecta de *H. pylori* a través de su potente actividad de ureasa, y ha sido considerada desde sus primeras descripciones como una herramienta valiosa para el diagnóstico inicial de la infección en individuos sintomáticos a nivel de las salas de endoscopia, debido a que ésta conjuga una técnica de ejecución, lectura e interpretación sencillas, rapi-

dez en la obtención de resultados, elevada sensibilidad y especificidad, además de la posibilidad de detectar al microorganismo en su forma cocoide, viable pero no cultivable (4).

Hasta ahora, se ha desarrollado, validado y comercializado una variedad de formatos de pruebas de ureasa, que incluyen pruebas en gel o agar (CLO Test[®], HUT test[®], Hpfast[®]), pruebas en membrana o tiras (Pyloriteck[®], Pronto Dry[®]) y pruebas en solución o caldo (Helicocheck[®]), entre otras (5), con variaciones en el tiempo de reacción previo a la lectura y en las condiciones de almacenamiento. También han sido objeto de validación, ciertas fórmulas no comerciales (preparadas localmente) para la detección de la actividad de ureasa de *H. pylori*, algunas de las cuales han exhibido excelentes características de sensibilidad y especificidad diagnóstica, lo que las convierte en alternativas accesibles y de menor costo para los servicios de salud y para los pacientes, en comparación con las fórmulas comerciales más conocidas. Por ejemplo, en Venezuela, Urrestarazu y Cols. evaluaron una prueba rápida de ureasa preparada con el agar urea de Christensen empleado rutinariamente para la identificación de enterobacterias. Al compararla con el cultivo bacteriológico y la coloración de Gram, esta prueba demostró una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica en pacientes sintomáticos (6).

El consenso mundial promueve la validación local de las metodologías diagnósticas, para controlar la influencia que pueden ejercer sobre el valor predictivo de las mismas, no sólo sus características intrínsecas, sino también los factores inherentes a la población estudiada, entre los que se incluye: la prevalencia local de la infección, y las características genéticas e inmunes de sus miembros, entre otros (3). Adicionalmente, las limitaciones económicas en los países en vía

de desarrollo, obligan a ensayar alternativas más accesibles, que puedan sustituir a las metodologías diagnósticas comerciales precedentes de otros países.

Por todo lo anterior, esta investigación fue realizada con el objeto de evaluar la utilidad diagnóstica de una prueba de ureasa (no comercial) preparada con agar urea de Christensen, empleando como referencia una combinación de tres metodologías invasivas, diferentes a las utilizadas previamente por otros autores, con el fin de optimizar el patrón de referencia para la validación de esta prueba, y obtener así los valores más cercanos a la realidad en lo relativo a sensibilidad y especificidad.

Material y Método

Muestreo Poblacional

En un período de 6 meses, se seleccionaron los pacientes adultos sintomáticos que acudieron a la Consulta de Gastroenterología del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, en el Estado Zulia - Venezuela. Los criterios de inclusión, fueron: requerimiento de endoscopia gastrointestinal, previa evaluación por el médico Gastroenterólogo, y consentimiento libre de los individuos participantes, informado por escrito. Se consideraron criterios de exclusión: el tratamiento con terapia antimicrobiana, sales de bismuto o inhibidores de la bomba de protones, durante el mes previo a la endoscopia; la presencia de hemorragia digestiva superior activa o la coexistencia de enfermedades sistémicas que contraindicaran el procedimiento diagnóstico. El estudio fue realizado siguiendo los lineamientos científicos y éticos aceptados universalmente para la investigación en humanos, previa aprobación por las autoridades académicas y de salud involucradas.

Recolección de Biopsias Gástricas

El procedimiento endoscópico fue realizado, previa anestesia tópica de la región faríngea, siguiendo el protocolo empleado de rutina en la Consulta de Gastroenterología antes mencionada (7). De cada individuo fueron obtenidas cuatro biopsias, próximas entre sí, procedentes de la cara anterior de la mucosa gástrica antral, a una distancia aproximada de 2 cm. del píloro, siendo retiradas de la pinza de recolección, empleando una aguja estéril.

Pruebas Diagnósticas

Cada biopsia gástrica obtenida de los pacientes, fue analizada mediante uno de los siguientes métodos: prueba rápida de ureasa, coloración histológica con Giemsa, cultivo bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con blanco en el gen *ureA* de *H. pylori*. Las tres últimas metodologías fueron utilizadas como referentes.

La prueba rápida de ureasa se preparó con agar urea de Christensen, siguiendo las instrucciones del fabricante (concentración final: urea 2%; agar 1.5%). Seguidamente, alícuotas de 1ml de esta preparación fueron colocadas en tubos eppendorf estériles, y conservadas a 5°C durante un máximo de 15 días, hasta el momento de su uso. Una biopsia gástrica de aproximadamente 3mm³ fue depositada en el agar contenido en los tubos, incubada a temperatura ambiente y observada a las 2 y 24 horas, para registrar las posibles variaciones en la coloración del agar. La prueba fue considerada positiva cuando se evidenció el viraje del indicador rojo de fenol incorporado al agar, del amarillo al rosado intenso o fucsia.

Las biopsias destinadas al estudio histológico fueron fijadas en formalina al 10%. Los cortes de tejidos incluidos en parafina fueron coloreados Giemsa. Un patólogo experto,

quien no tuvo acceso a la historia clínica de los pacientes ni a los resultados del resto de las pruebas, analizó los cortes y emitió un diagnóstico positivo, al observar la presencia de bacterias con morfología de bacilos en espiral en la capa mucosa o en la superficie de las células epiteliales gástricas.

Para realizar el cultivo bacteriológico, una biopsia de cada paciente se colocó en 0.5ml de solución salina fisiológica estéril, y fue procesada en un lapso no mayor de 4 horas después de su obtención. Ésta fue cortada con un bisturí estéril y sembrada en dos medios enriquecidos, uno selectivo y uno no selectivo, teniendo como base agar Brucella suplementado con sangre humana al 5%. El medio selectivo fue preparado con los siguientes antimicrobianos: vancomicina (10 µg/mL), trimetoprim (5 µg/mL), cefsulodín (5 µg/mL) y anfotericina B (10 µg/mL). Los medios se incubaron en atmósfera microaerofílica húmeda, a 35°C. Los cultivos fueron inspeccionados a los 3, 5 y 7 días de incubación. La identificación de los aislamientos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Versalovic y Fox (8), basado en la morfología colonial y celular característica de *H. pylori*, así como en las reacciones de catalasa, oxidasa y ureasa.

Para aplicar la prueba de PCR, una cuarta biopsia fue colocada en 0.5 mL de solución salina estéril y congelada a -20°C hasta el día de su procesamiento. El tejido descongelado fue digerido empleando proteinasa K (100 µg/mL) y buffer de lisis (Tris-HCl 10mM, pH 8.1 y sarcosina al 0.1%), incubados a 65°C en baño de agua por dos horas. Mediante tratamiento con cloroformo se extrajo el ADN bacteriano, empleándose acetato de amonio y etanol frío para su posterior precipitación. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores: Oligo A1: 5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3' y Oligo A2: 5'-CTC CTT AAT

TGT TTT TAC-3', ambos para amplificar un pequeño segmento de 411pb, correspondiente al gen *ureA* de *H. pylori*. La amplificación se efectuó en un volumen de reacción de 50 μ L, utilizando 10 μ L del ADN bacteriano extraído de las muestras. El anillamiento de los oligonucleótidos tuvo lugar a 45°C. Se realizaron 30 ciclos de amplificación, empleando un termociclador Mini Cycler PTC 150 (MJ Research, Watertown MA.). Los productos amplificados se obtuvieron en el lapso de 1 hora. El segmento genómico amplificado por PCR (específico de *H. pylori*) fue detectado mediante inmunoensayo enzimático del ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Materiales

La base de agar urea de Christensen fue obtenida de Difco (Detroit, Michigan). La base de agar Brucella fue adquirida de HiMedia Laboratories PVT LTD (Mumbai, India). Para los ensayos de PCR, tanto el kit comercial de nucleótidos iniciadores, como el inmunoensayo enzimático del ADN GEN-ETI-K DEIA®, fueron obtenidos de DiaSorin SRL (Saluggia, Italia). Los antimicrobianos utilizados en los cultivos bacteriológicos, así como la mayoría de los reactivos, fueron de alto grado analítico, y obtenidos de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, Missouri).

Análisis de Datos

Para determinar el estado de infección de cada individuo, se aplicaron los siguientes criterios: 1. Positividad para la infección por *H. pylori*: individuos con resultado positivo para, al menos, una de las metodologías referenciales. 2. Negatividad para la infección por *H. pylori*: individuos en quienes no se detectó el microorganismo por ninguna de las tres metodologías referenciales.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, tasa de resultados falsos positivos y negativos, así como la exactitud diagnóstica de la prueba de ureasa, fueron calculados a partir de los resultados obtenidos, en comparación con el resto de las metodologías diagnósticas invasivas aplicadas en esta investigación. La significancia estadística de las diferencias fue determinada mediante la comparación de proporciones, con una significancia del 95%.

Resultados

Se estudiaron 75 pacientes, 28 del sexo masculino (37.3%) y 47 del sexo femenino (62.7%), con un rango de edad comprendido entre 16 y 85 años (media: 43.6 años, DE: 16.5). De acuerdo al diagnóstico endoscópico de la región esófago-gastroduodenal, en 33 pacientes (44%) se detectó una sola patología, mientras que en el resto de los individuos se detectaron 2 o más. La prevalencia de las patologías detectadas por este método fue la siguiente: gastritis (86.7%); duodenitis (40%); esofagitis (24%); úlcera gástrica (16%); úlcera duodenal (6.7%); otros (9.3%).

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para las diferentes metodologías diagnósticas utilizadas, agrupados a conveniencia con fines de comparación. En 84% de los pacientes (63/75) el resultado de la prueba de ureasa coincidió con el cultivo bacteriológico (grupos A, C y J); en un 92% de los casos (69/75), éste coincidió con el diagnóstico histológico obtenido mediante la coloración de Giemsa (A, B, D, G y J) y en una proporción similar (68/75), con los resultados de la PCR (A, B, E, F, H y J). Los resultados obtenidos mediante las cuatro metodologías diagnósticas coincidieron en 62 individuos (82.7%), siendo todos negativos (J) en 49.3%

Tabla 1. Comparación de los Resultados Obtenidos al Aplicar la Prueba de Ureasa y las tres Metodologías de Referencia para el Diagnóstico de *H. pylori* en Adultos Sintomáticos.

| Grupo | Nº de Individuos | Prueba de Ureasa | Cultivo Bacteriológico | Coloración de Giemsa | PCR (<i>ureA</i>) |
|-------|------------------|------------------|------------------------|----------------------|---------------------|
| A | 25 | + ³ | + | + | + |
| B | 2 | + | c | + | + |
| C | 1 | + | + | - | - |
| D | 4 | + ² | - | + | - |
| E | 2 | + ¹ | - | - | + |
| F | 1 | + | c | - | + |
| G | 1 | - | + | - | + |
| H | 1 | - | + | + | - |
| I | 1 | + ¹ | - | - | - |
| J | 37 | - | - | - | - |

Los superíndices en la prueba de ureasa indican el número de reacciones lentas, positivas a las 24 horas de incubación. n = 77. c: contaminado con bacilos Gram negativo.

(37/75) y todos positivos (A) en el 33.3% de los casos (25/75).

De acuerdo con el criterio de positividad aplicado en esta investigación, 37 de los 75 pacientes estudiados (A – H) presentaron infección por *H. pylori* (49.3%). La prueba rápida de ureasa leída en el transcurso de las primeras dos horas de incubación, permitió detectar 29 de estos casos (78.3%). Al prolongarse el tiempo de lectura hasta 24 horas, otras 7 pruebas de ureasa resultaron positivas (ver superíndices en la Tabla 1); en 6 de ellas se cumplieron los criterios de positividad (16.2% adicional). La prueba restante (I) fue catalogada como probable falso positivo (1.3%). En resumen, el total de individuos ureasa-positiva verdaderamente infectados fue de 35: 46.7% del total general, y 97.2% del total de los casos ureasa-positiva; de éstos, un 82.8% fue detectado a las dos horas, y el único resultado falso positivo se obtuvo a las 24 horas de incubación. Por otra

parte, de un total de 39 casos en los cuales la prueba de ureasa resultó negativa (52%), dos fueron catalogados como falsos negativos (5.1%).

En la Tabla 2 se presentan los cambios observados en la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, así como en la tasa de resultados falsos negativos y falsos positivos derivados de la aplicación de esta prueba rápida de ureasa, según el tiempo de incubación previo a la lectura del resultado. Puede observarse un aumento de la sensibilidad, el valor predictivo negativo y la exactitud diagnóstica de la prueba, así como una reducción significativa en la tasa de falsos negativos, cuando el tiempo de lectura se prolonga hasta 24 horas. En tal condición, aumentó ligeramente la tasa de falsos positivos, y en consecuencia, la especificidad y el valor predictivo positivo de la prueba experimentaron un ligero descenso, el cual no fue estadísticamente significativo.

Tabla 2. Parámetros de Validación para la Prueba Rápida de Ureasa para *H. pylori*, de acuerdo al Tiempo de Incubación Previo a la Lectura del Resultado.

| Parámetros | Ureasa (2 horas) | Ureasa (24 horas) |
|--------------------|------------------|-------------------|
| Sensibilidad | 78.3 | 94.6* |
| Especificidad | 100.0 | 97.4 |
| Valor Predictivo + | 100.0 | 97.2 |
| Valor Predictivo - | 82.6 | 94.9 |
| Tasa de Falsos + | 0.0 | 2.6 |
| Tasa de Falsos - | 21.6 | 5.4* |
| Exactitud | 89.3 | 96.0 |

Los resultados son expresados como porcentajes. n = 77. *P < 0.05 vs. el mismo parámetro determinado a las 2 horas de incubación (Prueba de Diferencia de Proporciones).

Discusión

Desde que fue reconocido científicamente el papel que cumple *H. pylori* en el desarrollo de ciertas enfermedades gastroduodenales y, muy particularmente, del cáncer gástrico, se ha colocado a disposición del médico clínico una gran cantidad de información sobre cómo diagnosticar y tratar esta patología infecciosa. A partir de la introducción de la prueba de ureasa en biopsias gástricas por McNulty y Wise en 1985 (9), ésta ha sido considerada como la metodología de elección para el diagnóstico en pacientes que requieren ser sometidos a endoscopia gastrointestinal, por su sencillez, precisión y rapidez en la obtención de resultados (10-13). A estas ventajas se adiciona la particularidad de constituir el único método que no es afectado significativamente por la exactitud del laboratorio o la experiencia del personal (14-16). Sin embargo, en los servicios públicos de salud de nuestro país aún es irregular el acceso a las pruebas de ureasa cuyas formas comerciales gozan de mayor aceptación a nivel internacional. Esto se debe tanto a su elevado costo como a su limitada disponibilidad, por tratarse de productos importados. Por tales ra-

zones, este trabajo fue diseñado con la finalidad de evaluar en nuestro medio, la utilidad de una prueba rápida de ureasa de bajo costo (no comercial), preparada en el laboratorio con agar urea de Christensen.

En primer término, fue analizado el diagnóstico endoscópico resultante para cada paciente, siendo notoria la alta prevalencia de individuos con patologías digestivas coexistentes, de diversa localización y naturaleza. Este gran número de variables y sus combinaciones hizo difícil el establecimiento de asociaciones entre el diagnóstico endoscópico y el resultado obtenido mediante la prueba de ureasa.

En lo relativo a la selección de las tres metodologías referenciales utilizadas para la óptima validación de esta prueba, se tomó en consideración que aún no existe un criterio universalmente aceptado para catalogar a un paciente como verdaderamente infectado. El examen histológico y el cultivo bacteriológico han ocupado un rol preferencial como pruebas referenciales (5, 15, 17-20). No obstante, estudios previos han demostrado que la sensibilidad diagnóstica de estas dos pruebas no es óptima (14), hecho que ha sido atribuido a variaciones en la viabilidad del microorga-

nismo o en la intensidad de la infección, así como a la distribución irregular (parcheada) propia de la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* (21-22).

Por las razones expuestas, algunos investigadores han recurrido al empleo de un “estándar ampliado”, el cual toma como criterio diagnóstico la positividad simultánea a dos, tres o más pruebas, invasivas o no invasivas (14, 23-26). Esta estrategia, que asegura una elevada especificidad diagnóstica, podría conllevar a la incongruencia de considerar como “no infectado” a un individuo, aun cuando el cultivo bacteriológico sea positivo o se haya visualizado el microorganismo en secciones coloreadas de tejido gástrico. Dado que tanto la observación microscópica de la bacteria espiralada en cortes histológicos, como su aislamiento a partir de material de biopsia cultivado, constituyen evidencias directas e irrefutables de la presencia del microorganismo (16, 27), la positividad para cualquiera de estas dos pruebas fue considerada en este trabajo como criterio de infección. Adicionalmente, la PCR se utilizó como tercer método referencial, con el fin de aumentar la exactitud diagnóstica. Esta prueba ha sido considerada por algunos autores como altamente específica (28-29) y sensible (29-32) para la detección del microorganismo, en especial, cuando la carga bacteriana infectante es muy escasa (16).

En el presente estudio, de los 37 pacientes infectados por *H. pylori*, fueron detectados 32 casos mediante las coloraciones histológicas (86.5%), 31 casos utilizando la PCR (83.8%) y 28 de ellos mediante el cultivo bacteriológico (75.7%), ratificando que ninguna de estas metodologías goza de absoluta exactitud diagnóstica (Tabla 1). En tal sentido, Misra y Cols. sugirieron que, cuando se aplican varias metodologías diagnósticas a diferentes biopsias del mismo individuo, pueden

obtenerse resultados disímiles debido a la distribución parcheada del microorganismo en la mucosa gástrica, de modo que una comparación ideal entre metodologías sólo podría lograrse cuando la misma muestra de biopsia es estudiada mediante las diferentes pruebas (21). Es conveniente acotar que, con la inclusión de la PCR como metodología referencial, fue posible detectar 3 del total de casos positivos (8.1%), ninguno de los cuales fue detectado mediante el cultivo ni las coloraciones histológicas, lo que corrobora el acierto en la inclusión complementaria de esta prueba como metodología referencial.

En lo concerniente al tiempo de incubación de la prueba de ureasa, este factor ha sido objeto de amplio estudio, en la búsqueda de lograr los resultados más confiables en el menor tiempo posible (5, 16, 21, 24, 33). En este trabajo, la prueba de ureasa fue leída luego de 2 y 24 horas de incubación, a modo de establecer, con fines de comparación, intervalos parecidos a los utilizados por otros autores. Así, a las dos horas, se obtuvo una sensibilidad del 78.3% y especificidad del 100% (Tabla 2). De los tres reportes casi simultáneos que han sido publicados en relación al empleo del agar urea de Christensen como medio de prueba para la detección de la actividad de ureasa de *H. pylori* en biopsias gástricas, el trabajo realizado en Venezuela por Urrestarazu y Cols. es el que guarda mayor similitud con el presente estudio. Estos autores aplicaron una prueba de ureasa en caldo, a biopsias de antro gástrico procedentes de 50 pacientes, obteniendo una sensibilidad del 82% entre la segunda y la cuarta hora de lectura, con especificidad del 100%, al comparar los resultados con los obtenidos mediante la coloración de Gram y el cultivo bacteriológico en medios selectivos y no selectivos (6).

Una especificidad similar a la obtenida en esta investigación fue descrita también

por McNulty y Cols. (34), utilizando caldo urea de Christensen para ensayar biopsias provenientes de 596 pacientes y comparar los resultados con los obtenidos mediante estudio histológico, además de la coloración de Gram y el cultivo bacteriológico. La sensibilidad descrita por estos autores (61%) fue inferior a las señaladas anteriormente, al igual que la reportada por Coudroun y Cols. (46%), quienes emplearon biopsias gástricas de 132 pacientes y realizaron la lectura luego de 3 horas de incubación (35). Esta diferencia en la sensibilidad podría ser atribuida al número y variedad de métodos referenciales utilizados, o a variaciones en la naturaleza física de la prueba, tales como el uso de caldo en vez de agar, lo que pudiera influir en la eficiencia del método para detectar la actividad de ureasa en pacientes con escasa colonización bacteriana.

Al completar la evaluación de la prueba de ureasa con agar urea de Christensen mediante la lectura de los resultados a las 24 horas de incubación, pudo observarse un aumento de la sensibilidad (94.6%), mientras que la especificidad disminuyó ligeramente (97.4%), aunque esta última diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 2). Una vez más, esto coincide con lo reportado por Urrestarazu y Cols., en cuyos estudios la sensibilidad de la prueba osciló entre 96.5 y 97.4% a las 24 horas y la especificidad se mantuvo entre el 98.6 y el 100% (6,36). Estas cifras también coinciden con las atribuidas hasta ahora al CLO-test® por diferentes autores (14,18,37-38). CLO-test®, una prueba en gel de pH amortiguado, fue el primer kit de ureasa en ser comercializado y, pese a presentar un tiempo óptimo de lectura de 24 horas (39), es ampliamente utilizada en la práctica clínica y continúa empleándose como metodología de referencia en numerosas investigaciones, siendo su elevado costo la

principal limitante para su aplicación rutinaria, especialmente en los países no industrializados (21).

En contraste con lo anteriormente referido, los resultados obtenidos por Coudroun y Cols. a las 24 horas de incubación revelaron, una vez más, un pobre desempeño de la prueba: 54% de sensibilidad y 91% de especificidad (35). No obstante, estos autores también le atribuyen al CLO-test® una de las cifras más bajas de sensibilidad reportadas para esta prueba en la literatura mundial (78% de detección a las 24 horas de incubación). Cabe señalar que, en la mayoría de las investigaciones que se han dirigido a evaluar la utilidad de las pruebas invasivas para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, se reflejan diferencias, algunas veces acentuadas, entre los porcentajes de detección logrados por las diversas técnicas (40), diferencias éstas posiblemente atribuibles a las razones anteriormente expuestas.

En resumen, los datos obtenidos en el presente estudio coinciden con los presentados por McNulty y Urrestarazu. El comportamiento del agar urea de Christensen se corresponde también con lo reportado para otros formatos de prueba de ureasa, a la mayoría de las cuales se atribuye una sensibilidad diagnóstica superior al 90% y una especificidad cercana al 100% en pacientes con variedad de trastornos gastroduodenales, no tratados previamente (15, 21, 23-24, 41-44).

En relación al tiempo de incubación de la prueba, algunos clínicos e investigadores argumentan que una prueba de 24 horas no puede considerarse realmente rápida, especialmente cuando se pretende iniciar el tratamiento de los pacientes infectados antes de que abandonen la sala de endoscopia (27). Esto ha dado lugar al diseño de pruebas de ureasa ultra-rápidas, que reducen al mínimo el tiempo de lectura. No obstante, estudios

publicados previamente sugieren que, aún con este tipo de prueba, la mayor exactitud diagnóstica suele alcanzarse siempre prolongando el tiempo de incubación (40, 45).

Otro aspecto a considerar al escoger una prueba de 24 horas, es la posibilidad de que, el desarrollo de otras bacterias productoras de ureasa, o inclusive de otra especie gástrica de *Helicobacter*, como *H. heilmannii* (46) en las muestras incubadas, aumente el número de resultados falsos positivos. A pesar de ello, la mayoría de los investigadores coinciden en considerar confiables los resultados derivados de esta prueba, y recomiendan corroborar mediante estudio histológico, únicamente los casos ureasa negativa, cuando exista una fuerte sospecha clínica de infección (13, 40). En el presente ensayo, la obtención de 2 resultados falsos positivos a las 24 horas no presentó significancia estadística y la prolongación del tiempo de lectura no afectó el valor predictivo positivo de la prueba. Es necesario acotar que, según algunos autores, los resultados falsos positivos obtenidos al determinar actividad de ureasa en biopsias, también podrían derivarse de resultados falsos negativos obtenidos en las pruebas referenciales, como consecuencia de una baja densidad de colonización por *H. pylori*, especialmente cuando se emplean la histología y el cultivo (18, 47). En todo caso, los resultados aparentemente falsos positivos obtenidos mediante la prueba de ureasa, deberían interpretarse con precaución, considerando cuidadosamente los hallazgos endoscópicos y/o histológicos de los individuos.

En conclusión, el comportamiento de la prueba de ureasa ensayada en el presente estudio, sugiere que ésta es una herramienta confiable para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, ya que los parámetros de validación exhibieron resultados muy semejan-

tes a los reportados por la mayoría de los autores para pruebas de ureasa validadas y ampliamente utilizadas internacionalmente. No obstante, la prolongación del tiempo de incubación hasta 24 horas, mejora significativamente el perfil de la prueba, especialmente en lo relativo a su sensibilidad y exactitud, estrategia que sería especialmente útil en individuos que presenten una baja densidad de colonización bacteriana. Todo esto, unido a su bajo costo (< 10% del promedio para las pruebas disponibles comercialmente) y a su fácil disponibilidad local, permite recomendar su uso en los servicios de salud públicos y privados regionales y nacionales, en especial en aquellos en los cuales la prueba aún no ha sido implementada como procedimiento rutinario debido a limitaciones económicas y logísticas. La implementación rutinaria de esta prueba podría contribuir al logro de una más amplia cobertura y exactitud diagnóstica para la infección por *H. pylori* en individuos sintomáticos sometidos a endoscopia del tracto digestivo superior.

Referencias Bibliográficas

- (1) Warren, J.; Marshall, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-1275.
- (2) Passaro, D.; Chosy, E.; Parsonnet, J. *Helicobacter pylori*: Consensus and Controversy. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 298-304.
- (3) Rautelin, H.; Lehours, P.; Mégraud, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003; 8(suppl. 1): 13-20.
- (4) Hua, J.; Ho, B. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? *Microbios* 1996; 87: 103-112.
- (5) Morio, O.; Rioux-Leclercq, N.; Pagenault, M.; Corbinais, S.; Ramee, MP.; Gosselin, M. et al. Prospective evaluation of a new rapid urease test (Pronto Dry®) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28:569-573.

- and after eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 976-980.
- (25) Ho, C.; Chen, T.; Chang, F.; Lee, S. Rapid urease test from non-ulcer part of stomach is superior to histology from ulcer in detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric ulcer. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1877-1880.
- (26) Gomes, C.; Catapani, W.; Mader, A.; Locatelli, A.; Silva, C.; Waisberg, J. Antral exfoliative cytology for the detection of *Helicobacter pylori* in the stomach. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2784-2788.
- (27) Bickston, S.; Peura, D. The new urea membrane test: BUT, RUT or what? *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 626-627.
- (28) Lu, J.; Perno, Ch.; Shyu, R.; Chen, Ch.; Lou, Q.; Chong, S. et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 772 - 774.
- (29) Vinette, K.; Gibney, K.; Proujansky, R.; Fawcett P. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. *BMC Microbiology* 2004; 4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/4/5>.
- (30) Clayton, C.; Kleanthous, H.; Coates, P.; Morgan, D.; Tabaqchali, S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 192-200.
- (31) Westbloom, T.; Phadnis, S.; Yang, P.; Czinn, S. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 367-371.
- (32) Muñoz, C.; Jané, M.; González, A.; Juncosa, T.; Gené, A.; Varea, V. et al. Evaluación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) rápida y sencilla para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en la infancia. *Enf Infec Microbiol Clin* 1999; 17: 119-125.
- (33) Sengupta, S.; Crosthwaite G. One minute unbuffered urease test: should it be read at 10 minutes? *Gut* 2000; 47: 155-156.
- (34) McNulty, C.; Dent, J.; Uff, J.; Gear, M.; Wilkinson, S. Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test: an assessment in 1445 patients. *Gut* 1989; 30: 1058-1062.
- (35) Coudron, P.; Kirby, D. Comparison of rapid urease tests, staining techniques, and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1527-1530.
- (36) Serrano, N.; Carvajal, Z.; Piñero, R.; Urrestarazu, MI. Evaluación de métodos para el diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*. *Gen* 1995; 49: 292-295.
- (37) Kuo, Ch.; WU, D.; Lu, C.; Su, Y.; Yu, F.; Lee, Y. et al. The media of rapid urease test influence the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1191-1194.
- (38) Arigbabu, O.; Ndubaba, D.; Agbakwuru, E.; Fadiora, S.; Adeosun, O.; Rotimi O. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection correlation between Clotest (urease enzyme) and gastric mucosal histology. *West Afr J Med* 2004; 23: 21-23.
- (39) Marshall, B.; Warren, J.; Francis, G.; Langton, S.; Goodwin, C.; Blincow, ED. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 200-210.
- (40) Lim, L.; Ho, KY.; Ho, B.; Salto-Tellez, M. Effect of biopsies on sensitivity and specificity of ultra-rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* infection: a prospective evaluation. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1907-1910.
- (41) Wong, B.; Wong, W.; Wang, W.; Tang, V.; Young, J.; Lai, K. et al. An evaluation of invasive and non-invasive tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 505-511.
- (42) Kullavanijaya, P.; Thong-Ngam, D.; Hanvivatvong, O. Nunthapisud P, Tangkijvanich P, Suwanagool P. Analysis of eight different methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:1392-1396.
- (43) Tseng, C.; Wang, W.; Wu, D. Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2005; 50:449-452.

- (44) Midolo, P.; Marshall, B. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Urease Tests. Gastroenterol Clin N Am 2000; 29: 871 – 878.
- (45) Arvind, A.; Cook, R. Tabaqchali S, Farthing M. One minute endoscopy room test for *Campylobacter pylori* (Letter). Lancet 1988; 1: 704.
- (46) Hazell, S. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol 2000; 15 (suppl.): H28.
- (47) Yousfi, M.; El-Zimaity, H.; Genta, R.; Graham, D. Evaluation of a new reagent strip rapid urease test for detection of *H. pylori* infection. Gastrointest Endosc, 1996; 44: 519-522.