

# Infecciones por *Helicobacter pylori*: detección de antígeno en muestras fecales

Araceli González-Cuevas<sup>a</sup>, Teresa Juncosa<sup>a</sup>, Margarita Jené<sup>b</sup>, Vicente Varea<sup>b</sup>, Amadeu Gené<sup>a</sup>, Carmen Muñoz<sup>a</sup> y Cristina Latorre<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. <sup>b</sup>Servicio de Gastroenterología. Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat. Barcelona

**FUNDAMENTO.** El objetivo del estudio es evaluar la técnica de detección del antígeno de *Helicobacter pylori* en heces (HpSA), y comparar los resultados con los de las técnicas standard (prueba del aliento con <sup>13</sup>C-urea, serología, cultivo y estudio histológico), en una población de pacientes pediátricos con sintomatología gastrointestinal sugestiva de infección por *H.pylori*.

**PACIENTES Y MÉTODOS.** Se estudiaron 60 pacientes pediátricos atendidos en el Servicio de Gastroenterología por manifestar síntomas de dispepsia. Ninguno refería haber tomado antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, ni compuestos con sales de bismuto. A todos ellos se les realizó la prueba del aliento con <sup>13</sup>C-urea, una determinación de IgG anti-*H.pylori*, se les practicó una endoscopia gastrointestinal con la finalidad de obtener muestras para estudio histológico, prueba de la urea inmediata y cultivo microbiológico, y se les recogió una muestra fecal para estudiar la presencia de antígeno de *H.pylori*.

**RESULTADOS.** Cuarenta y siete de los 60 pacientes estudiados mostraron estar infectados por *H.pylori*. En todos se aisló el microorganismo del cultivo y la prueba del aliento fue positiva. En 45 de ellos se positivizó la prueba HpSA (95,7%). No hubo ningún falso positivo de esta técnica.

**CONCLUSIONES.** La prueba HpSA además de la buena sensibilidad (95%) y especificidad (100%) que ha manifestado en este estudio, aporta ventajas sobre las otras técnicas no invasoras, por su simplicidad en la obtención de la muestra, realización de la técnica, rapidez en la obtención de los resultados y bajo coste económico, al compararlo con el elevado coste de la prueba del aliento.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, antígeno *H.pylori* en heces, pacientes pediátricos.

## *Helicobacter pylori* infections: antigen detection in stool samples

**BACKGROUND.** The aim of this study is to evaluate a new diagnostic test to detect *Helicobacter pylori* antigen in stool samples (HpSA), and compare the results with those obtained by standard techniques (rapid urease test, culture, histological examination of gastric biopsy specimens, <sup>13</sup>C-urea breath test and serology), in a paediatric population with gastrointestinal symptomatology.

**PATIENTS AND METHODS.** Sixty patients with dyspeptic symptoms (37 females and 23 males; mean age 10.9 years) attending the Gastroenterology Service were included in the study. Exclusion criterium was previous treatment with proton pump inhibitors, bismuth compounds or antibiotics. Rapid urease test, culture and histologic study of gastric biopsies, <sup>13</sup>C-urea breath test and serology, as well as HpSA, were performed to all patients.

**RESULTS.** Forty seven patients were considered infected by *H.pylori* on the basis of bacterium isolation and <sup>13</sup>C-urea breath test positivity. HpSA was detected in 45 of the 47 *H.pylori* positive patients (95.7%). There were no HpSA false positive.

**CONCLUSION.** Our results show that this new test is highly sensitive (95%) and specific (100%) for detection of *H.pylori* infection. It has some advantages over other non invasive techniques: it is easy to perform, requires no blood samples and its cost is lower than that of <sup>13</sup>C-urea breath test.

Key words: *Helicobacter pylori*, *H. pylori* stool antigen, pediatric patients.

## Introducción

La presencia de bacilos espirilares en el epitelio gástrico se conoce desde finales del siglo pasado, al visualizarse en material procedente de autopsias, pero no fue hasta 1983 cuando Warren y Marshall observaron estas bacterias gramnegativas en biopsias de pacientes con gastritis crónica activa, logrando su aislamiento en 1984, y consideraron su posible implicación en patología gastrointestinal<sup>1</sup>.

La alta producción de ureasa de esta bacteria crea a su alrededor un microambiente alcalino que le protege de la acidez gástrica, a la que es sensible, permitiendo su instauración y persistencia en la mucosa gastro-duodenal.

Correspondencia: Dra. T. Juncosa Morros.  
Hospital Sant Joan de Déu.  
Passeig de Sant Joan de Déu, nº 2.  
08950 Esplugues de Llobregat. Barcelona.  
E-mail: tjuncosa@hsjdbcn.org

Manuscrito recibido el 25-2-2000; aceptado el 2-11-2000.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 49-52

Estos organismos, en principio, se incluyeron en el género *Campylobacter* por su forma espiralada y su contenido en guanina + citosina (G+C), pero actualmente se les clasifica como *Helicobacter pylori*.

Se acepta a *H.pylori* como agente etiológico de la gastritis activa y crónica tipo B del hombre, así como su implicación en las úlceras pépticas y como cofactor en la patogenicidad de la úlcera y el carcinoma gástrico tipo MALT en adultos<sup>2</sup>, desempeñando también un papel importante en la patología gastrointestinal infantil<sup>3</sup>.

A pesar de los muchos estudios publicados sobre la epidemiología de este microorganismo, continúan persistiendo muchas lagunas por esclarecer. El nicho ecológico parece estar limitado al estómago humano, donde puede persistir durante meses y probablemente años, lo que hace suponer que el principal reservorio sea el hombre. Es conocida la mayor incidencia de pacientes infectados entre familiares de niños afectos, en comparación con otros grupos control. Las tasas de infección en poblaciones o grupos de bajo nivel socioeconómico son superiores a las de las poblaciones estándar, así como también se han relacionado las malas condiciones higiénicas de algunas instituciones infantiles con tasas elevadas de infección<sup>4,5</sup>. Todos estos datos sugieren que la transmisión sea persona-persona y que el contagio tenga lugar por vía fecal-oral, aunque no puede descartarse la vía oral-oral<sup>6</sup>.

Se han descrito diversos factores de patogenicidad (proteínas VacA, CagA y HpaA) cuya presencia se asocia a una mayor virulencia de la cepa que, añadidos a los factores asociados al huésped, permitirían explicar los diversos cuadros clínicos, así como el estado de portador en pacientes asintomáticos<sup>7,8</sup>.

Para el diagnóstico de la infección por *H.pylori* pueden utilizarse métodos no invasores, que muestran la infección de forma indirecta (prueba del aliento marcada con <sup>13</sup>C-urea y serología) y métodos invasores (endoscopia y toma de biopsia) que permiten estudiar las posibles alteraciones de la mucosa gastrointestinal y proceder al aislamiento del microorganismo.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la eficacia de la técnica de detección de antígeno de *H.pylori* en heces, una prueba no invasora, de rápida realización y de fácil obtención de la muestra, y comparar los resultados con los de las técnicas estándar (prueba del aliento con <sup>13</sup>C-urea, serología, cultivo y estudio histológico), en una población de pacientes pediátricos con sintomatología gastrointestinal con sospecha de infección por *H.pylori*.

## Pacientes y métodos

### Pacientes

Se estudiaron 60 pacientes (37 niñas y 23 niños), entre los meses de mayo de 1998 y julio de 1999, con edades comprendidas entre 4 y 16 años (media=10,9), que habían sido atendidos en el Servicio de Gastroenterología por manifestar síntomas de dispepsia. Ninguno de ellos refería haber tomado antibióticos en los tres meses anteriores al estudio, inhibidores de la bomba de protones, ni compuestos con sales de bismuto. A todos ellos se les realizó la prueba del aliento con <sup>13</sup>C-urea, una determinación serológica para estudio de anticuerpos IgG específicos anti-*H.pylori*, una detección de antígeno de *H.pylori* en heces y se les practicó una endoscopia gastrointestinal.

El tiempo transcurrido entre las dos primeras pruebas y la endoscopia no fue nunca superior a 15 días. La toma de heces se realizó, en todos los casos, el día anterior al de la endoscopia.

### Endoscopia

El estudio gástrico se llevó a cabo mediante la realización de una fibroendoscopia digestiva alta, utilizando, para ello, el modelo pediátrico Olympus GIF-XP. Se recogieron tres muestras antrales destinadas a cultivo de *H.pylori*, estudio de la capacidad de producción de ureasa y exámenes histológicos.

### Estudio microbiológico

Dos de las muestras se remitieron al laboratorio de microbiología, una de ellas en medio de transporte *Portagerm Pylori* (bioMérieux®) para cultivo específico de *H. pylori*, y otra en un tubo con 1 ml de urea de Christensen al 10% para la prueba de la ureasa rápida.

La muestra para cultivo se homogeneizaba en 1 ml de suero fisiológico estéril en un homogeneizador de fondo cónico y se sembraba en dos medios de cultivo, uno selectivo (Pylori agar, bioMérieux®) y otro no selectivo (Columbia+5% de sangre de cordero, bioMérieux®). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de microaerofilia, haciéndose lecturas a los 3, 5 y 7 días. Las colonias compatibles con *H.pylori* se identificaron por tinción de Gram, y pruebas de ureasa y catalasa.

El tubo de urea que contenía la otra muestra se incubó a temperatura ambiente, haciéndose la lectura a las 4 horas, y se consideró positivo el viraje a color rosa, obtenido por alcalinización del medio al degradarse la urea.

### Estudio histológico

Las muestras se procesaron en bloques de parafina para el estudio histológico con microscopía óptica convencional (microscopio óptico Leitz Dialux). Se practicaron diversos cortes de 4 micras, que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Se estudió el grado de alteración (superficial o profunda) de la mucosa, el tipo de infiltrado (agudo o crónico) y la presencia de microorganismos en los cortes.

### Prueba del aliento con <sup>13</sup>C-urea (UBT)

Se utilizó un kit comercial (TAUKIT, Isomed®), en el que se tomaban dos muestras de aire, una de aspirado basal, antes de la toma de la <sup>13</sup>C-urea y la otra después de la toma, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de cada una de las muestras se expresaban mediante el índice de las concentraciones <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>. Se consideró la prueba positiva si la concentración de la muestra posterior, respecto a la basal, era superior o igual a seis.

### Estudio serológico

Se determinó el nivel de anticuerpos IgG específicos anti-*H.pylori* mediante una técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) que utilizaba un sustrato quimioluminiscente (IMMULITE® *H. pylori* IgG). La cantidad de fotones emitidos, que eran cuantificados mediante un luminómetro, se relacionaba con la presencia de IgG anti-*H.pylori* de la muestra. El resultado, semicuantitativo, se obtenía comparando la lectura del paciente con un punto de corte establecido.

### Detección de antígeno en muestras fecales (HpSA)

Las muestras fueron almacenadas a -20°C, desde su recogida hasta el momento de procesarse. Se utilizó una prueba comercial de EIA (Meridian Diagnostics Inc.-HpSA®) con un anticuerpo policlonal de *H.pylori*, fijado en pocillos de una placa de microtiter.

La técnica se procesó siguiendo las instrucciones del fabricante, leyendo los resultados en un espectrofotómetro a 450nm. Se consideraron positivos los valores de absorbancia superiores o iguales a 0,160, negativos los inferiores a 0,140, y valores comprendidos entre 0,140 y 0,160 eran considerados como indeterminados.

### Criterio diagnóstico

Se definió un paciente como infectado por la positividad del cultivo y/o dos de las siguientes pruebas: alteración histológica de la mucosa, ureasa rápida, UBT o serología.

## Resultados

*H. pylori* se aisló en 47 de los 60 pacientes estudiados (78,3%), siendo la prueba de la urea rápida positiva en 43 de ellos.

De las tinciones con hematoxilina-eosina de los cortes parafinados, se consiguió visualizar el microorganismo en 17 casos, no valorándose uno de ellos por ser el resto de las pruebas complementarias negativas; en los 16 restantes el cultivo fue positivo.

En 46 pacientes se observaron alteraciones histológicas en la mucosa, en tres de ellos sin la positivización de ninguna de las otras pruebas realizadas, por lo que no se atribuyeron a una infección por *H. pylori*; en los 43 restantes se aisló el microorganismo del cultivo.

La prueba del aliento fue positiva en 50 casos, tres de los cuales con cultivo y serología negativos. Ante la negatividad de todas las otras pruebas realizadas en estos tres pacientes, se realizó un segundo control a los tres meses, obteniéndose los tres resultados negativos, por lo que se valoraron como falsos positivos.

En 40 pacientes (66,6%) se mostró la presencia de anticuerpos IgG específicos frente a *H. pylori*, con niveles variables, desde 35 a 1,1 veces por encima del nivel del punto de corte (media = 7,8). En 39 de ellos el cultivo fue positivo. El resultado de la serología del paciente con cultivo negativo correspondía al nivel más bajo de anticuerpos, y se consideró un falso positivo, debido a la negatividad de todas las otras técnicas realizadas.

El resultado de HpAS fue positivo en 45 casos, dando valores de absorbancia entre 2,688 y 0,212 (media = 1,133), en uno se interpretó como indeterminado (absorbancia = 0,159). En todos ellos el cultivo fue positivo.

Los resultados de las diferentes pruebas se exponen en la tabla 1.

Valorando los resultados obtenidos, no podemos considerar ningún paciente infectado por *H. pylori* con cultivo negativo (13 casos). En ninguno de estos 13 pacientes se positivizó más de una prueba, por lo que al analizarlas individualmente se han considerado como falsos positivos.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de cada una de las técnicas complementarias al cultivo se reflejan en la tabla 2.

## Discusión

El diagnóstico de estas infecciones puede establecerse por métodos directos, que muestren la presencia del microorganismo (cultivo, tinciones histológicas y métodos moleculares) e indirectos, que estudian la capacidad ureásica de la bacteria (urea rápida o prueba del aliento con  $^{13}\text{C}$ -urea) o la respuesta de anticuerpos específicos frente

al microorganismo (serología). Por regla general se precisa de la combinación de más de una prueba para llegar al diagnóstico de certeza, siempre en función de las indicaciones clínicas.

En pacientes pediátricos que acuden a la consulta de gastroenterología por dispepsia, en los que no está indicada la endoscopia, es interesante poder disponer de un método no invasor, sensible y específico, para estudiar la posible etiología del cuadro clínico.

Frecuentemente se ha usado la serología como método de cribaje, aunque está mostrada la presencia de individuos seropositivos sin infección activa<sup>9</sup>, lo que puede dar lugar a la instauración de tratamientos innecesarios. En nuestro estudio la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos IgG han sido del 82% y del 92%, respectivamente, similar a las encontradas en otros estudios<sup>10-12</sup>. Consideramos que la serología es una prueba adecuada para estudios de seroprevalencia, más que para cribado en el diagnóstico de estas infecciones<sup>4,13</sup>.

La UBT es considerada, hasta el momento, la técnica no invasora de referencia, dada su alta sensibilidad (96%-98%) y especificidad (91%-96%), según las diferentes publicaciones<sup>14,15</sup>, además ha mostrado ser de elección para comprobar la erradicación del microorganismo después del tratamiento específico. En nuestro estudio la especificidad obtenida ha sido del 76%, con una sensibilidad del 100%. En tres pacientes con UBT positivo, que no recibieron en ningún momento tratamiento erradicador de *H. pylori*, y en los que todas las pruebas complementarias fueron negativas, el UBT se repitió al cabo de tres meses. Los tres replicados se negativizaron, por lo que se consideraron falsos positivos.

La nueva técnica de detección de antígeno de *H. pylori* ha mostrado, en este estudio, tener una buena sensibilidad (95%), con una especificidad del 100%, similar a otras publicaciones aparecidas recientemente<sup>16-19</sup>. Algunos estudios proponen la necesidad de bajar el punto de corte de la técnica en pacientes pediátricos. En este estudio, la supuesta disminución del punto de corte hasta

**TABLA 2. Resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las diferentes técnicas, expresados en %**

	Ureasa	Tinción	Histología	UBT	Serología	HpSA
S	91	34	91	100	82	95
E	100	92	76	76	92	100
VPP	100	94	91	94	97	100
VPN	76	27	71	100	60	86

S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; UBT: prueba del aliento con  $^{13}\text{C}$ -urea; HpSA: detección de antígeno en muestras fecales.

**TABLA 1. Resultados de las seis pruebas complementarias en relación con el cultivo**

	Ureasa POS/NEG	Tinción POS/NEG	Histología POS/NEG	UBT POS/NEG	Serología POS/NEG	HpSA POS/NEG
Cultivo POS n=47	43/4	16/31	43/4	47/0	39/8	45*/2
Cultivo NEG n=13	0/13	1/12	3/10	3/10	1/12	0/13

POS: positivo; NEG: negativo; \*: uno indeterminado (absorbancia = 0,159); UBT: prueba del aliento con  $^{13}\text{C}$ -urea; HpSA: detección de antígeno en muestras fecales.

0,043 (valor de absorbancia más bajo de HpSA de los niños infectados) para poder considerar positivos todos los resultados de HpSA de estos pacientes y conseguir una sensibilidad del 100%, haría disminuir notablemente la especificidad hasta un 30%, ya que de los 13 pacientes no infectados, nueve manifestaban una absorbancia superior al 0,043%<sup>20</sup>.

Este método aporta ventajas sobre las otras técnicas no invasoras ya comentadas, el test del aliento y la serología, no sólo en cuanto a la buena sensibilidad y especificidad, sino desde el punto de vista de simplicidad en la realización, rapidez en la obtención de los resultados, y bajo coste económico, si se compara con el elevado coste de la UBT<sup>12,21,22</sup>. La facilidad de obtención de la muestra en un paciente de corta edad le aventaja frente a la complicación que puede suponer la colaboración por parte del niño en la realización de la UBT y permite evitar una extracción sanguínea en los casos en que el estudio se hubiese llevado a cabo por serología.

## Bibliografía

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 8390: 1.311-1.315.
2. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen D P, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New Engl J Med* 1991; 325:1.127-1.131.
3. Prieto G. Diagnóstico clínico de la infección por *Helicobacter pylori* en el niño. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12: 18-22.
4. Mégraud F, Brassens-Rabbé MP, Denis F, Belbourni A, Quynh Hou D. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.870-1.873.
5. Graham DY, Malaty HD, Evans DG, Evans DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterol* 1991; 100: 1.495-1.501.
6. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S118-S128.
7. Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Pérez-Pérez G, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *New Engl J Med* 1989; 321: 1.562-1.566.
8. Domingo D, Alarcón T, Sanz JC, Villar H, Hernández JM, Sánchez J, et al. Estudio del gen de la adhesina de *Helicobacter pylori*: relación con la procedencia de los aislamientos y la enfermedad asociada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 342-346.
9. Adler-Shohet F, Palmer P, Reed G, Edwards K. Prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in normal children. *Pediatric Infect Dis J* 1996; 15: 172-174.
10. Best LM, Veldhuyzen van Zanten SJO, Sherman PM, Bezanson GS. Serological detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children and their parents. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1.193-1.196.
11. Meijer BC, Thijs JC, Kleibeuker JH, van Zwet AA, Berlkamp RJP. Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 292-294.
12. Cohen H, Rose S, Lewin DN, Retama B, Naritoku W, Johnson C, et al. Accuracy of four commercially available serologic test, including two office-based test and a commercially available <sup>13</sup>C urea breath test, for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1999; 4: 49-53.
13. Sanz JC. Seroepidemiología, diagnóstico y seguimiento postratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12(S1): S28-S31.
14. Vincent P, Michaud L, de Lasalle EM, Benon B, Turck D, Gottrand F. <sup>13</sup>C-urea breath test and gastric mucosal colonization by *Helicobacter pylori* in children: quantitative relation and usefulness for diagnosis of infection. *Helicobacter* 1999; 4: 233-237.
15. Corbaglia L, Bontems P, Devaster JM, Heimann P, Glupczynski Y, Kerpens E, et al. Accuracy of serology and <sup>13</sup>C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* in children. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 976-979.
16. Chang MC, Wu MS, Wang HH, Wang HP, Lin JT. *Helicobacter pylori* stool antigen (HpSA) test – a simple, accurate and non-invasive test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 299-302.
17. Trevisani L, Sartori S, Galvani F, Rossi MR, Ruina M, Chiamenti C, Caselli M. Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in feces: a prospective pilot study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1.830-1.833.
18. Fanti L, Mezzi G, Cavallero A, Gesu G, Bonato C, Masci E. A new simple immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* infection: antigen in stool specimens. *Digestion* 1999; 60: 456-460.
19. Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon ATR, Deltenre M, Hirschl AM, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. *Lancet* 1999; 354: 30-33.
20. Calvet X, Feu F, Forné M, Montserrat A, Elizalde JJ, Viver JM, et al. Evaluación de un nuevo enzimoimmunoanálisis para la detección de la infección por *Helicobacter pylori* en muestras fecales. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 270-272.
21. Lehmann F, Drewe J, Terracciano L, Stuber R, Frei R, Beglinger C. Comparison of stool immunoassay with standard methods for detecting *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 1999; 319: 1409.
22. Savarino V, Vigneri S, Celle C. The <sup>13</sup>C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1999; 15 (suppl 1): I18-22.