



PATOLOGIA

IDENTIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE HELICOBACTER PYLORI POR LOS MÉTODOS DE TINCIÓN DE WARTHIN-STARRY Y GIMENEZ EN BIOPSIAS GÁSTRICAS



Rita Marín.*
Pilar Salas.*
Fernando Mena.**
Rafaela Sierra.*

SUMMARY:

Forty-nine patients (20 men and 29 women) were investigated for *Helicobacter pylori* infection. All patients had dyspeptic problems and underwent gastroscopy at the Max Peralta Hospital, Cartago. They were examined by histology (Warthin-Starry and Gimenez stains) and cultivation as a reference method. *Helicobacter pylori* strains could be isolated from 71.4% of the patients. Altogether, 69.4% patients were shown to be infected using a combination of both stains; the Warthin-Starry stain showed 97% sensitivity and 85.7% of specificity and the Gimenez technique, 97.7% and 78.6% respectively. The results confirm that both stains are sen-

sitive methods for the detection of *H. pylori* in gastric biopsies.

INTRODUCCION:

En 1983 Warren y Marshall informaron del aislamiento de una bacteria espiral en muestras de biopsia de antro en agar chocolate incubado bajo condiciones microaerofílicas (19). Posteriormente varios investigadores encontraron una asociación entre *H. pylori* y gastritis (4). *H. pylori* y una bacteria Gram-negativa, móvil con 4 a 6 flagelos unipolares múltiples, produce grandes cantidades de ureasa y es catalasa y oxidasa positiva (1). Además puede ser cultivado bajo condiciones de tensión de oxígeno reducido y su crecimiento óptimo es a 37°C (7). *H. pylori* se ha encontrado en biopsias gástricas de personas sintomáticas sometidas a endoscopia gastrointestinal y parece ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad ulcerativa

* Instituto de Investigaciones en Salud (INISA),
Universidad de Costa Rica.

** Servicio de Patología, Hospital Max Peralta, Cartago,
Caja Costarricense de Seguro Social.

Palabras Claves: *Helicobacter pylori*, Tinción de Gimenez,
Tinción de Warthin-Starry, cultivo.

duodenal (2). Normalmente esta bacteria no invade el epitelio, más bien se localiza en la mucosa antral, pero puede estar presente en otras partes del estómago y coloniza solamente tejido gástrico (1). Los microorganismos se localizan típicamente en el moco adyacente al epitelio gástrico dentro del antro, cuerpo o fondo del estómago (11). Se ha observado que individuos colonizados muestran un incremento en el número de células mononucleares y en muchos casos existe un número aumentado de neutrófilos (1). La infección de *H. pylori* puede estar relacionada con carcinogénesis gástrica (6) y se ha encontrado una prevalencia alta de infección por esta bacteria en poblaciones con riesgo aumentado de cáncer gástrico como Japón, China, Escocia, Perú y Colombia (3). Además estudios epidemiológicos recientes han indicado que la infección de *H. pylori* está asociada con un riesgo significativo para el desarrollo de cáncer gástrico (14, 15) y que ésta asociación no es afectada por la dieta y factores socioeconómicos, que influyen en el riesgo de cáncer gástrico. Los métodos utilizados para la detección de *H. pylori* se basan en la identificación de microorganismos con apropiada morfología, localización y características de tinción en las muestras de mucosa gástrica (1).

H. pylori se observa en la superficie del epitelio gástrico en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) pero esta tinción es muy débil y puede ser enmascarada por la presencia de moco superficial (7). Para una mejor visualización de esta bacteria se utilizan tinciones especiales como son los métodos de plata, tinciones de Romanowsky, tinción de Gram y recientemente la tinción de Giménez (11).

El objetivo de este estudio fue el de comparar la especificidad y sensibilidad de dos tinciones histológicas diferentes (Warthin-Starry y Giménez), para la identificación de *H. pylori*, en pacientes que asistieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Max Peralta de Cartago por presentar síntomas dispépticos.

Se definió como dispepsia un dolor localizado en la parte superior del estómago en el área re-

troesternal acompañado frecuentemente de algunos de los siguientes síntomas: disconformidad, ardor, náusea, vómito, sensación de llenura, inflamación, intolerancia a las grasas y dificultad para complementar la digestión.

MATERIALES Y METODOS:

Se estudió 49 pacientes dispépticos a los cuales se les tomó cinco biopsias gástricas, dos de la curvatura mayor, dos de la curvatura menor y la quinta al azar. A cada una de las biopsias se les realizó: examen histológico, tinciones y cultivo bacteriano. Las dos muestras, una de la curvatura mayor y la otra de la curvatura menor fueron incluidas en viales con formalina debidamente identificados para ser enviados al Servicio de Patología del Hospital Max Peralta de Cartago, donde se les practicó los procedimientos histológicos de rutina. La muestra fue sacada del frasco de formalina e incluida en recipientes especiales para el procedimiento de fijación con formaldehído al 10%, deshidratación con alcohol etílico al 100% y embebida con xileno-parafina para luego ser cortadas en secciones de 3 μ m mediante micrótopo rotativo. Las tinciones empleadas fueron las de Warthin-Starry modificado para espiroquetas (8) y la técnica de Giménez (11). Las biopsias fueron cultivadas en Agar Brucela (BBL), adicionándole sangre de caballo al 10%, vancomicina (10 ug/ml, polimixina B (2.5 U.I/ml) y trimetoprim (5 ug/ml). Los cultivos se incubaron a 37° C bajo una atmósfera microaerófila (5-10% de oxígeno y 90, 95% de una mezcla de nitrógeno y CO₂ por cinco días (16). Las colonias sospechosas fueron teñidas con tinción de Gram y se determinó su capacidad para producir catalasa, oxidasa y ureasa.

RESULTADOS:

Se determinó la presencia de *H. pylori* en biopsias gástricas de 49 sujetos, 20 hombres y 29 mujeres con edades comprendidas entre los 21 y 64 años que acudieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Max Peralta de Cartago, para realizarse una gastroscopía entre los

meses de julio de 1990 a Junio de 1991. Las tinciones se observaron al microscopio de luz en 40x y en inmersión, revisando minuciosamente hasta observar bacilos Gram negativos curvados o en forma de bastoncillos, localizados en los espacios intercelulares de las glándulas gástricas. En la tinción de Giménez las bacterias se tiñeron de color fucsia contra un fondo azul verdoso y en Warthin-Starry las bacterias se observaron de color negro contra un fondo dorado. La comparación de resultados entre las tinciones y el cultivo se presenta en el cuadro 1 para la tinción de Giménez y Warthin-Starry respectivamente. De los 49 pacientes estudiados por la tinción de Giménez, el 71.4% fue positivo por cultivo y el 69.4% por ambas tinciones. Con los datos del cultivo como referencia, la sensibilidad obtenida utilizando la tinción de Giménez como método de diagnóstico fue de un 97.7%, y la especificidad comparado con el cultivo fue un 78.6%. Con Warthin-Starry se obtuvo una sensibilidad del 97% y una especificidad del 85.7%. Los valores predictivos positivos y negativos para las dos tinciones fue de alrededor de un 90%.

CUADRO # 1			
Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de dos tinciones histológicas para la detección de <i>H. pylori</i> .			
	Warthin-Starry	Giménez	Cultivo
Sensibilidad	97%	97%	71.4%
Especificidad	85%	78.6%	100%
Valor predictivo positivo	94%	92%	-
Valor predictivo negativo	92%	92%	-

DISCUSION:

En el presente estudio se comparan dos métodos de tinciones histológicas con la técnica de cultivo bacteriano, con el objeto de valorar la especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de *H. pylori* en biopsias gástricas. Tanto la visualización microscópica como el cultivo de *H. pylori* tienen el inconveniente de requerir un

procedimiento invasivo para obtener una biopsia de mucosa gástrica. Además, el cultivo de la bacteria puede ser alterado por la ingestión de anestésicos tópicos, el uso reciente de antibióticos, o la contaminación de las pinzas de biopsia con glutaraldehído o microorganismos (10). Además el cultivo requiere mucho tiempo, es caro, difícil y se podría subestimar la presencia de *H. pylori* en la muestra de estudio.

El cultivo de un microorganismo es prueba definitiva de la presencia del mismo en la muestra de estudio, por lo que no deberían existir pacientes con un resultado de cultivo falso positivo a menos que se produzca una contaminación de las pinzas, es por esto que se recomienda hacer el diagnóstico de *H. pylori* utilizando al menos tres pruebas positivas (17). Aún cuando el cultivo no es el método más sensible de diagnosticar la infección por *H. pylori* permanece como el más específico y es importante para la determinación de la susceptibilidad de la bacteria a agentes antimicrobianos en casos de resistencia (10). A principios de 1980, Warren y Marshall volvieron al uso de la tinción de plata (Warthin-Starry) para la observación microscópica de biopsias obtenidas endoscópicamente de mucosa gástrica. Con esta tinción se observan bacilos curvos o en forma de espiral y con una distribución en parche (5). En biopsias gástricas teñidas con H&E la bacteria se observa muy borrosa y estudios comparativos con la tinción de Warthin-Starry y la tinción de Gram han demostrado que la H&E es menos sensible, por lo que la visualización microscópica no es confiable para dar un diagnóstico (9). Por el contrario, con la tinción de Warthin-Starry se observan bacilos curvos de color negro, contra un fondo amarillo. Los microorganismos parecen más largos que con otras tinciones y pueden ser vistos a baja magnificación. Entre las desventajas que presenta la tinción de Warthin-Starry incluye su costo, el tiempo requerido para llevar a cabo la técnica, la precipitación excesiva de la plata y la decoloración (13). Dicha precipitación da lugar a una apariencia granular por lo que pueden darse

falsos positivos. La tinción de Giménez es un método que utiliza fucsina carbólica con verde de malaquita como tinción de contraste y fue utilizada por primera vez por Giménez en 1964. Con esta tinción las bacterias se observan de color amarillo contra un fondo verde azulado. *H. pylori* presenta una morfología de un bacilo curvo corto y grueso. Ambas tinciones demostraron una buena correlación con el cultivo bacteriano para el diagnóstico de *H. pylori*, obteniéndose resultados similares en Vandeplass et al., 1992 (17) y Morera et al., 1993 (12). Barthel et al., 1990 (1) sugiere que la detección histológica de los microorganismos por el análisis de múltiples biopsias es el mejor método de referencia. Sin embargo el utilizar esta metodología tiene el inconveniente de que *H. pylori* no es el único microorganismo que puede persistir en la mucosa gástrica o inducir gastritis histológica (14). Aún cuando el cultivo no es el método más sensible de diagnosticar la infección por *H. pylori* permanece como el más específico y es importante para la determinación de la susceptibilidad de la bacteria a agentes antimicrobianos en casos de resistencia (10).

Además, se deben tomar en cuenta otros factores que podían influenciar los resultados como son el número de microorganismos necesarios a ser detectados y el número de biopsias que se deben tomar para eliminar el error de muestreo que es causado por la distribución en parche que presenta *H. pylori* en la mucosa gástrica (12).

AGRADECIMIENTO:

Se agradece la colaboración de los doctores Rodrigo Altmann Ortiz, Francisco Mora Zúñiga y Ever Quirós y la enfermera Sra. Luz Solano del Servicio de Gastroenterología, a la Sra. Laura Miranda del Servicio de Patología del Hospital Max Peralta de Cartago y al Sr. Jorge Quesada del INISA su ayuda técnica. Este proyecto fue financiado por la Universidad de Costa Rica y la Corporación CEFA. P. Salas es miembro del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones

Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

RESUMEN:

En el presente estudio se comparan sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de dos métodos de tinción: Warthin-Starry y Giménez, utilizando como referencia la técnica de cultivo para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*, en biopsias gástricas. De los 49 pacientes estudiados, el 71.4% fueron positivos por la técnica de cultivo y el 69.4% por ambas tinciones. Para las tinciones de Warthin-Starry y Giménez se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 97% y 85.7% y de 97.7% y 78.6% respectivamente. Los valores predictivos positivos y negativos para las dos tinciones fueron de alrededor de un 90%.

Aún cuando el cultivo no es el método más sensible de diagnosticar la infección por *H. pylori* permanece como el más específico. Ambas tinciones demostraron correlación con el cultivo bacteriano para el diagnóstico de *H. pylori*.

BIBLIOGRAFIA:

- 1- Barthel, J.S., Dale Evereff, E. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: The gold standard and the alternatives. *Rev. Inf. Dis.* 1990; 12 (1): S 107-S114.
- 2- Blaser, M., Dooley, C.P., Cohen, H., et al. High prevalence of *H. pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic hispanics. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 1128-1131.
- 3- Correa, P., Fox, J.G., Fontham, E., et al. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Cancer.* 1990. 66: 2560-2574.
- 4- Coudron, P.E., Kirby, D.F. Comparison of rapid urease test, staining techniques and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 1527-1530.
- 5- Chtikian, C.K., Schenk, E. A. A method for demonstrating Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Histotech.* 1982; 5(3): 127-129.
- 6- Dixon, M.F. *Campylobacter pylori* and chronic gastritis. En: Rathbone, B.J., Heatley, R.V. (de). *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989, 106-116.
- 7- Drumm B. *Helicobacter pylori*. *Arch. Dis. Child.* 1990; 65: 1278-1282.
- 8- Garvey, W., Fathi, A., Bigelow, F. Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. *J. Histotech.* 1985; 8(1): 15-17.
- 9- Hawkins, J. A., Gubbay, N. Cold Ziehl-Neelsen stain for *Campylobacter* in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42: 1309-1312.
- 10- Martínez, E., Marcos, A. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer diseases. *New. Engl. J. Med.* 1991; (10): 737.
- 11- McMullen, L., Walker, M. M., Bain, L.A. et al. Histologi-

cal identification of Campylobacter using Giménez technique in gastric antral mucosa. *J.Clin.Pathol.* 1987; 40: 464-465.

12- Morera-Brenes, B., Sierra, R., Barrantes, R. et.al. Helicobacter pylori in a Costa Rican dyspeptic patient population. *Eur. J. Clin. Microbiol. Of. Dis.* 1994; 13: 253-258.

13- Musgrove, C., Bolton, F.J. , Kryszyk, A. M. et. al. Campylobacter pylori clinical, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41: 1316-1321.

14- Nomura, A., Stemmermann, G.N. , Chyou, P.H. et. al. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New.Engl.J.Med.* 1991: 325: 1132-1136.

15- Parsonnet, J., Friedman, G.D, Vandersteen, D.P. et.al. Heli-

cobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *New. Engl.J.Med.* 1991: 325:1127-1131.

16- Sjostedt, S., Kager, L., Veress, B. et.al. Campylobacter pylori in relation to other aerobic and anaerobic microorganisms in patients with gastric diseases. *Microbial. Ecol. Health. Dis.* 1989; 2: 107-114.

17- Skirrow, M. G. Campylobacter ententis. a new disease. *Brit. Med. J.* 1977; 2: 9.

18- Vandenplas, Y., Biecker, U., Devreker, T. et.al. Contribution of the ¹³C-Urea breath test to the detection of Helicobacter pylori gastritis in children. *Pediatrics.* 1992; 90(4): 608-609.

19. Warren, J.R., Marshall, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1983; 2: 1273-1275.