

# Comparación de coloraciones histológicas para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* \*

Giugni, Ma.Cristina<sup>1</sup>; Benmelej, Adriana<sup>1</sup>; Graciani, Gabriela<sup>1</sup>; Gómez Ayet Juan. M<sup>1</sup>; Roldán, José.N<sup>1</sup>; Costamagna, Alicia<sup>1</sup>; Jiménez, Félix<sup>2</sup>; Demaría, José.L<sup>2</sup>; Nagel, Alicia<sup>3</sup>; Ahumada, Carlos.A<sup>3</sup>; Méndez, Emilce<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Cátedra Morfología Normal. Facultad de Bioquímica y Cs.Biológicas.UNL.Paraje El Pozo Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Sección Gastroenterología, Hospital José María Cullen, Avenida Freyre 2150.

<sup>3</sup> Sección Microbiología, Laboratorio Central, Hospital José María Cullen, Avenida Freyre 2150.

Correspondencia: Giugni Ma. Cristina, FBCB, UNL, Ciudad Universitaria-CC530, Paraje El Pozo. (3.000) Santa Fe, Argentina.Email: cgiugni@fbc.unl.edu.ar

**RESUMEN:** La gastritis crónica por *Helicobacter pylori* es una de las infecciones más prevalentes en nuestro medio, y teniendo en cuenta la elevada proporción con que la úlcera péptica se asocia a la misma (1), se deduce la importancia del correcto diagnóstico de esta patología.

El objetivo del presente trabajo fue comparar alguna de las coloraciones existentes para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. Se estudiaron 20 pacientes adultos, con diagnóstico de infección por este germen. Se obtuvieron 6 muestras de la región antral. Dos fueron procesadas en un medio de cultivo adecuado, dos se usaron para la prueba de la ureasa y dos sometidas a tinción histológica, las cuales fueron coloreadas con: Hematoxilina-eosina, Alcian Blue, PAS, Gram, Brown-Hopps, Alcian Yellow y Warthin-Starry.

Los preparados teñidos con Warthin-Starry se evaluaron más rápidamente, debido a que la plata precipita sobre la membrana del microorganismo, haciéndola aparecer más gruesa y más fácil de identificar, además existe un claro contraste entre el ennegrecimiento de los bacilos y la mucina y las células epiteliales amarillo-doradas.

La presencia de *Helicobacter pylori* fué diagnosticada en forma más correcta con Warthin-Starry que con otras tinciones incluyendo Hematoxilina-Eosina.

**SUMMARY:** Chronic gastritis due to *Helicobacter pylori* is one of the most prevalent infections in our region. The fact that it is most frequently found to be associated with peptic ulcer (1) allows us to conclude that it is extremely important to accurately diagnose the infection.

The aim of this work was to compare some of the staining techniques available for the diagnosis of *Helicobacter pylori* to. Twenty adult patients to whom infection by *Helicobacter pylori* had been diagnosed were examined. Six samples were obtained from the antral region. Two of them were processed in an appropriate culture medium, two were used for the ureasa test and two were subjected to histological staining with Hematoxylin-Eosin, Alcian Blue, PAS, Gram, Brown-Hopps Alcian Yellow and Warthin-Starry dyes. The Warthin-Starry stained preparations were evaluated more quickly, because silver precipitates on the organism membrane, making it appear thicker and easier to identify. A clear contrast between blackened bacilli and mucin and the golden-yellow epithelial cell is also achieved.

The presence of *Helicobacter pylori* was more accurately diagnosed with Warthin-Starry than with the other staining techniques, including Hematoxylin-Eosin.

## Introducción

La gastritis crónica es la lesión habitual ocasionada por la infección de *Helicobacter pylori* como una fase primera, a partir de la cual en algunos sujetos puede originarse úlcera péptica (2). El mecanismo lesional o patogénico de la gastritis es una consecuencia entre la acción de los factores agresivos patogénicos de la bacteria *Helicobacter*

*pylori* y los mecanismos defensivos del huésped (hombre) (3).

Por otra parte, los investigadores siguen estudiando la asociación de la gastritis crónica por *Helicobacter pylori* con el adenocarcinoma y linfoma tipo MAL gástricos (4,5,6).

La detección del *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas fijadas en formol al 10%, procesadas convencionalmente para sus cortes en parafina y coloreadas, brindan alta sensibilidad y especificidad que aumentan leve y proporcionalmente el uso de técnicas complementarias.

Ambos dependen de la densidad de los bacilos colonizando la mucosa gástrica, la experiencia del

\* Datos preliminares fueron presentados en el VIII Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Tandil Marzo de 1998.

observador, el tamaño y número de biopsias y la calidad de la "tinción" (7,8).

Se sabe que todas las técnicas de coloración, permiten el reconocimiento del bacilo en estudio; siendo la mucosa antral la ideal para identificarlo.

La localización de esta bacteria en la mucosa gástrica es variable (moco superficial, adherido al epitelio de las faveolas y glándulas, en los espacios intercelulares del epitelio y aisladamente en el corion superficial).

Los métodos de referencia para su diagnóstico son el cultivo y la tinción histológica; existen mundialmente numerosas coloraciones propuestas para el estudio de este microorganismo al microscopio óptico: Hematoxilina-eosina, Gram, Genta (hematoxilina-eosina y Alcian-Blue pH: 2,5), Giemsa, Giemsa prolongado, Giménez, Gallyas (modificado con hematoxilina-eosina), Alcian Blue, PAS, Cresyl Fast Violet, Brown-Hopps (gram modificado con ácido pírico de contraste), Naranja de acridina, Alcian-Yellow, Warthin-Starry.

Debido a que la gastritis crónica por *Helicobacter pylori* es una de las infecciones bacterianas más prevalentes en nuestro medio; teniendo en cuenta la elevada proporción con que la úlcera péptica se asocia a ella (1) y la modificación que se imprime en la historia natural del paciente con el éxito del tratamiento erradicador; se deduce la relevancia clínica asistencial del diagnóstico de esta patología.

El objetivo del presente trabajo, fue comparar alguna de las innumerables coloraciones existentes para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*, a los fines de seleccionar la técnica más sensible, más específica, de fácil realización y detección del germen, bajo costo y en concordancia con los concensos mundiales establecidos.

## Materiales y Métodos

Se estudiaron 20 pacientes adultos, de ambos sexos edad media 44 años (IC: 41-48), con diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*; que habían sido sometidos a fibroendoscopia digestiva alta, realizándose tomas biopsias pre y post tratamiento. Se obtuvieron 6 muestras de la región antral. Dos se usaron para la realización del test rápido de la ureasa (utilizando kits comercial), dos procesadas en un medio de cultivo adecuado (donde se confirmó el aislamiento e identificación de *H.p.*).

Las dos restantes se colocaron en formalina al 10%, las cuales fueron sometidas al procedimiento

habitual de inclusión en parafina y finalmente se realizaron las tinciones histológicas de: Hematoxilina-eosina, Giemsa, Alcian Blue, Gram, PAS, Brown-Hopps, Alcian-Yellow y Warthin-Starry. (9,10).

La coloración de Warthin-Starry se realizó respetando normas internacionales, pero utilizando dos técnicas diferentes, A) Convencional (tiempo de trabajo 70 minutos) (9,10); B) Usando horno microondas (tiempo de trabajo: 5 minutos) (11).

### A) Técnica convencional:

1. -Desparafinar en xileno e hidratar hasta agua destilada.
2. -Lavar con solución tampón.
3. -Teñir en la solución de plata 1% durante una hora a 60°C.
4. -Desarrollar las secciones en la solución de trabajo durante tres minutos a 60°C.
5. -Lavar con agua corriente a 60°C.
6. -Lavar los cortes en solución tampón.
7. -Deshidratar, aclarar y montar.

### B) Técnica usando horno microondas

1. -Desparafinar - hidratar.
2. -Lavar con agua destilada dos veces.
3. -Colocar el portaobjetos en la solución de nitrato de plata 1% (a 483 W) cuarenta y cinco segundos; sacar un minuto a temperatura ambiente.
4. -Precalentar en matraces separados: A) Nitrato de plata 2%. B) Gelatina 5%. C) Hidroquinona 0,15%. D) Precalentar un matraz sin nada.
5. -Mezclar en el matraz precalentado, solución desarrolladora en el siguiente orden:  
Nitrato de plata 2%-----1,50 ml  
Gelatina 5%-----3,75 ml  
Hidroquinona 0,15%-----2,00 ml
6. -Colocar el portaobjetos horizontalmente en un soporte, a temperatura ambiente, cubrir con la solución desarrolladora 1 minuto o menos.
7. -Lavar con agua de canilla, 50 ml precalentada cuarenta y cinco segundos a 450 W.
8. -Lavar con agua destilada.
9. -Deshidratar y montar.

## Resultados y Discusión

FOTOS: 1-2-3 (1-Hematoxilina-eosina, 2-Warthin Starry, 3-Warthin-Starry) Pág. 171-172.

La figura 1 muestra una microfotografía de biopsia antral (x1.000), teñida con Hematoxilina-eo-

sina. Se observa el microorganismo coloreado débilmente, situado sobre el mucus en la luz y adherido al epitelio, su tinción es semejante al epitelio.

La figura 2 presenta otra sección de la mucosa antral, (x 1.000), teñida con Warthin-Starry, donde se evidencia gran Nº de bacilos; mientras que la figura 3, (x1.000) realizada también con W-S, visualiza menor densidad de gérmenes; debido a que la

plata precipita sobre la membrana, haciéndola aparecer más gruesa, manifiesta claro contraste entre el ennegrecimiento de los bacilos y el amarillo-dorado de la mucina y células epiteliales.

Los resultados cualitativos de las coloraciones antes mencionadas y el resto de las tinciones realizadas se muestran en la tabla (1).

**Tabla 1.** Comparación de coloraciones histológicas

Coloraciones	Laboriosidad	Identificación Morfológica	Sensibilidad	Especificidad	Costo (12)
Hematoxilina-Eosina	+	+	+++	+	< \$ 1
Giemsa	+	+	+++	+	< \$ 1
Alcian-Blue	++	+	+++	+	< \$ 1
Gram	+	+	+++	+	< \$ 1
PAS	+	+	+++	+	< \$ 1
Brown-Hopps	+	+	+++	+	< \$ 1
Alcian-Yellow	+	+++	+++	+	\$ 1,30
Warthin-Starry	+	+++	+++	+++	\$ 1.10

+: Baja

++: Mediana

+++ : Alta

Estos resultados concuerdan con Alcalde, M; Sánchez Risco, P; García-Díaz, M, quienes sostienen que la tinción de hematoxilina-eosina, es sencilla y barata, requiere experiencia en la identificación del germen, ofrece buena sensibilidad, carece de especificidad (13).

Dichos autores consideran además que, las coloraciones de: Giemsa, Alcian-Blue, Gram, PAS, Brown-Hopps, son semejantes a la anterior, pero remarcan la necesidad de utilización de tinciones complementarias para su mejor identificación, y

fundamentalmente hematoxilina-eosina para poder realizar el estudio histopatológico de la mucosa gástrica.

Nuestros hallazgos coinciden con Gomollón García F, 1997, quien expresa que la tinción de Warthin-Starry es extraordinariamente fiable, (dos muestras arrojan un: 98% de sensibilidad y especificidad; cuatro muestras: 99% de sensibilidad y especificidad) (14).

Se disiente con Rodrigo Sáez, L, 1997, que manifiesta que esta tinción requiere experiencia

para su realización, es laboriosa y tiene un costo elevado (15).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo acuerdan con las normas establecidas por la 1ª Reunión Nacional de Congreso de Diagnóstico y Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, Abril 1998, donde se concluyó que una de las formas de constatar la eficacia de erradicación, es utilizar cultivo y tinción de Warthin-Starry (16,17).

## Conclusiones

Teniendo en cuenta la gradación inicialmente descrita por Marshall y Warren de 0 a 3; no cabe duda que para la correlación clínico patológica post-terapéutica (eliminación y erradicación) el grado más dificultoso de asegurar es el 0 (18).

De los datos antes expuestos, se concluye que la tinción de hematoxilina-eosina es poco específica, pero se debe tener en cuenta que brinda correlaciones entre infección y grado histológico de la gastritis.

Si bien las condiciones fundamentales en la elección de una, u otra tinción, dependen de la dotación técnica disponible en el medio donde se trabaje y la experiencia de los observadores; la presencia de *Helicobacter pylori*, en el presente estudio fue diagnosticada en forma más correcta con Warthin-Starry que con otras tinciones, incluyendo hematoxilina-eosina.

Los preparados teñidos con W-S se evaluaron más rápidamente, debido a que la plata precipita sobre la membrana del microorganismo, haciéndola aparecer más gruesa y más fácil de identificar; además existe un claro contraste entre el ennegrecimiento de los bacilos y el amarillo-dorado de la mucina y células epiteliales.

La utilización de horno microondas, permite una rápida y uniforme impregnación del tejido en estudio; además las diferencias existentes entre los preparados expuestos a la alta frecuencia de los que no lo fueron, radican fundamentalmente en que en los segundos se produce una precipitación de fondo que impide la visualización correcta del bacilo.

Finalmente se sugiere que para el diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*, se deberían utilizar conjuntamente las tinciones de Hematoxilina-eosina y Warthin-Starry.

## Agradecimientos

Al Bqco Gómez Ayet, Mario, Docente del Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, UNL, por su colaboración en el contacto (vía Internet) con el Dr. Larry I. Giltman, M.D, investigador de la Universidad de Emory-Giorgia, con quien intercambiamos opiniones, y quien nos suministró la técnica no conocida: Alcian-Yellow.

Al preparador histológico Gallo José, de la Cátedra de Morfología Normal, UNL, quién gentilmente realizó los cortes histológicos.

## Bibliografía

- 1- Marshall B. Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; 2:1311-1315.
- 2- Pajares García José M. Mecanismo de lesión de la mucosa gastrointestinal por *Helicobacter pylori* N° 1-Suplemento. Abril, 1998: 71-73.
- 3- Pajares García J.M. *Helicobacter pylori* y dispepsia funcional ¿huésped o patógeno? En "Dispepsia Funcional" Abril 1998. Edit. F.Mearin. Ediciones Doyma. Barcelona, 113-116.
- 4- NIH. Consensus Conference *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *J. Amer. Med. Assoc.* 1994. 272: 65-69.
- 5- Feldman R.A, Bailler. 1995. Prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Gastroenterol.* 93: 447-465.
- 6- Dr. Roberto Santos Lucero. 1997. Revisión Temática: *Helicobacter pylori*. VII Congreso Nacional de Medicina. II Congreso Nacional de Medicina Ambulatoria.
- 7- Madam, E.; Kemp, J.; Westblom, TU.; et al. Evaluation of staining methods for identifying *complyobacter pylori*. *Am J Clin. Pathol.* 1986; 90: 450-453.
- 8- Genta, RM.; Robasan, GO.; Graham, DY. Simulación visualización de *Helicobacter pylori* and gastritis morphology: a new stain. *Hum Pathol.* 1994; 25: 221-226.
- 9- R.García del Moral. Laboratorio de Anatomía Patológica. Mc.Graw-Hill-Interamericana de España. 1993.
- 10- E.B. Prophet, B.Mills, J.B Arkington, L.H. Sobin. 1996 Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EE.UU.
- 11- Joyce Moore HT/HTL (ASCP) Technical Specialist. Special Stains Using the Microwave. 1997. 1515 West 42 nd Avenue-Pine Bluff, AR 71603 (501) 541-7544. Adapted for the Jefferson Regional Medical Center Histo-Path Laboratory-Warthin-Starry Techniques.
- 12- Jiménez Félix; Demaría José.Luis; Ahumada, Carlos; Nagel, Alicia; Méndez, Emilce; Stifelman, María; Demarco Guadalupe; Giugni María.Cristina; Costamagna, Alicia 1997. Análisis de costos en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*.

Congreso de la SAM, Buenos Aires, 23 al 28 de noviembre de 1997. **156:** P-11-11.

**13-** Alcalde, M; Sánchez Risco, P. García-Díaz, M. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. Utilización del Laboratorio 1994 **1:** 122-132.

**14-** Gomollón García F. Infección por *Helicobacter pylori*. Medicine 1997 **2:** 45-52.

**15-** Rodrigo Sáez L. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. 1997. Rev And Pat Digest. Vol, N° **4:** 26,27.

**16-** 2º Simposio Internacional de Patología Gastroduodenal: 1ª Reunión Nacional de Congreso del Diagnóstico y Tratamiento de la Infección por *Helicobacter pylori*. 24-25 abril 1998. Córdoba República Argentina.

**17-** Jiménez F; Demaría J.L; Giugni M.C; Bennmelej A; Gomez Ayet, J.M; Graciani, G; Roldán, N.J; Ahumada, C.A; Nagel, A Méndez, E; Stifelman, M.

Erradicación del *Helicobacter pylori* con el tratamiento combinado de tres fármacos. Acta Gastroenterológica Latinoamericana. 1997. Vol. N° 27 – Suplemento N° 3 – **176:** N° 61.

**18-** Zárate, J.O.; Lucero, R.S. Comentarios en Resúmenes agrupados *Helicobacter pylori*. Agela 1991. Vol. **21** (4) 324:336.