

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**VALOR DIAGNÓSTICO DE LA TINCIÓN DE WARTHIN STARRY PARA
LA IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* EN BIOPSIAS GÁSTRICAS**

Iris Daniela Joaquín Velásquez

Ana Gabriela Mendoza Castellanos

Jessica Lorena Salazar Bermúdez

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, Mayo 2016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**VALOR DIAGNÓSTICO DE LA TINCIÓN DE WARTHIN STARRY PARA
LA IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* EN BIOPSIAS GÁSTRICAS**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

Iris Daniela Joaquín Velásquez

Ana Gabriela Mendoza Castellanos

Jessica Lorena Salazar Bermúdez

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

Guatemala, Mayo 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreína Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por ser nuestro guía, darnos fortaleza en todo momento y permitirnos alcanzar una meta más en nuestras vidas.

A NUESTROS PADRES

César Joaquín e Irma Velásquez; José Belisario Mendoza y Nora Elizabeth Castellanos; María Eugenia Bermúdez y Sergio Salazar, por su gran amor, por ser unos padres maravillosos y excepcionales, quienes con esfuerzo y dedicación han estado en cada etapa de nuestra vida, brindándonos consejos y ejemplo de perseverancia siempre. ¡Nuestros triunfos son suyos!

A NUESTROS HERMANAS Y HERMANOS

Por su apoyo y amor, que son, además, grandes amigos para toda la vida.

A NUESTROS FAMILIARES Y AMIGOS

Por su compañía, apoyo, paciencia y cariño.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

En especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por brindarnos los conocimientos y enseñanzas necesarias para nuestra formación académica.

A NUESTRO ASESOR

Lic. Gerardo Arroyo, por orientarnos en todo momento para la elaboración de esta investigación, por su apoyo incondicional y amistad brindada.

A LOS SERVICIOS DE PATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS, HOSPITAL ROOSEVELT E INSTITUTO DE CANCEROLOGÍA Y HOSPITAL “DR. BERNARDO DEL VALLE S.”

En especial a la Dra. Clara Chanquín, Dr. Hessler Morales y Dr. Roberto Orozco, por el apoyo brindado en todo momento y permitirnos llevar a cabo la parte de nuestra investigación dentro de sus instalaciones.

ÍNDICE

I. Ámbito de la investigación.....	1
II. Resumen.....	4
III. Antecedentes.....	6
A. Historia.....	6
B. <i>Helicobacter pylori</i>	7
1. Microbiología.....	7
1.1 Factores de riesgo para la infección y modo de transmisión.....	9
2. Patogenia.....	10
2.1 Factores bacterianos patogénicos y de colonización.....	11
2.1.1 Movilidad por flagelos.....	11
2.1.2 Adhesinas.....	12
2.2 Factores citotóxicos.....	12
2.2.1 CagA (citotoxina asociada al antígeno A).....	12
2.2.2 VacA (citotoxina vacuolizante A).....	13
2.2.3 Otros factores citotóxicos.....	13
3. Patología.....	13
4. Diagnóstico.....	15
4.1 Métodos directos.....	16
4.1.1 Histología.....	16
4.1.2 Cultivo.....	17
4.1.3 Pruebas moleculares.....	17
4.1.4 Citología con cepillado endoscópico.....	18
4.1.5 Técnicas con aspirado gástrico.....	18
4.2 Métodos Indirectos.....	18
4.2.1 Prueba del aliento con urea marcada (C ¹³ o C ¹⁴).....	18
4.2.2 Test rápido de la ureasa.....	18
4.2.3 Serología.....	19
4.2.4 Otras técnicas.....	19
5. Epidemiología.....	20
6. Tratamiento.....	21

V.	Objetivos.....	25
	A. General.....	25
	B. Específicos.....	25
VI.	Hipótesis.....	26
VII.	Materiales y Métodos.....	27
	A. Universo de trabajo.....	27
	B. Muestra.....	27
	C. Recursos.....	27
	1. Humanos.....	27
	2. Recursos institucionales.....	27
	3. Físicos.....	28
	D. Métodos.....	29
	1. Selección de la muestra.....	29
	2. Procedimientos.....	29
	3. Análisis de datos.....	31
	E. Diseño experimental.....	32
VIII.	Resultados.....	34
IX.	Discusión.....	37
X.	Conclusiones.....	42
XI.	Recomendaciones.....	43
XII.	Referencias Bibliográficas.....	44
XIII.	Anexos.....	48

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En los últimos años, los estudios relacionados con la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) han tenido una gran relevancia en el área de la gastroenterología debido a que el cáncer gástrico es la cuarta neoplasia maligna más común en el mundo y la segunda causa de muerte por cáncer anualmente, totalizando más de un millón de defunciones por año, siendo el adenocarcinoma (ADCA) del estómago el tumor más frecuente (95%). Se considera que la presencia de esta bacteria es un factor necesario en la cadena de la carcinogénesis en la mayoría de pacientes que desarrollan ADCA gástrico intestinal o diferenciado (Ramírez & Sánchez, 2008). Aunque los primeros trabajos que comunican la presencia de bacterias espirales en estómagos humanos datan ya de hace más de un siglo, fue hasta 1983 cuando el estudio de Robin Warren y Barry J. Marshall estableció una relación entre la infección por *H. pylori* y la presencia clínica de trastornos gastrointestinales. Hoy en día se conoce a esta bacteria como el principal agente causal de la gastritis crónica y un factor de riesgo para el linfoma gástrico y el adenocarcinoma (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009).

En la actualidad nadie pone en duda la importancia de la infección por *H. pylori* como el factor causal más importante en la úlcera péptica, tanto duodenal como gástrica. Este conocimiento ha causado un gran impacto en la evaluación diagnóstica y terapéutica de esta enfermedad (Blancas, 2004).

La bacteria tiene una gran variabilidad genética, evidenciada por estudios de genotipos y secuenciación de ADN. Recientemente se han descrito genes bacterianos específicos que están asociados con la virulencia de las especies bacterianas. La interacción entre la bacteria y el hospedero, es un factor clave que determina las consecuencias clínicas de la infección por *H. pylori*. A este respecto, el sistema inmune juega un papel importante en prevenir o promover la enfermedad (Camorlinga, *et al*, 2005).

H. pylori fue aislado por primera vez en 1983 por Marshall y Warren. Este microorganismo es una bacteria espiralada, microaerofílica, gram negativo y con extremos redondeados cuando se observa directamente de biopsias gástricas (Roblejo, *et al*, 2005). Esta bacteria segrega ciertas proteínas que atraen a los macrófagos y neutrófilos produciendo inflamación en la zona afectada; produce además grandes cantidades de ureasa, la cual al hidrolizar la urea neutraliza el ácido del estómago en su entorno, mecanismo por el cual se

protege aún más del medio externo. La bacteria segrega además proteasas, citotoxinas como interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa, factor de activación plaquetaria, interferón gamma, especies reactivas de oxígeno, lipopolisacáridos y fosfolipasas que son las principales responsables del daño de la mucosa que genera *H. pylori* (Triana, 2001). Así mismo, está asociada fuertemente con diferentes desórdenes gastroduodenales como gastritis, úlcera péptica, linfoma MALT de bajo grado y cáncer gástrico (Ramírez & Sánchez, 2008).

Uno de los aspectos de la infección por *H. pylori* en los que más se ha trabajado y avanzado es en el diagnóstico. Actualmente se dispone de una amplia variedad de técnicas para la detección de este microorganismo, las cuales tienen una gran fiabilidad. Se pueden realizar métodos directos, que son aquellos que detectan la presencia de la bacteria o el genoma de ésta (cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares), o indirectos, que son los que aprovechan algunas características del microorganismo (prueba rápida de la urea, prueba del aliento con urea marcada, técnicas serológicas). Se dispone de técnicas menos invasivas tales como: la detección de antígenos del microorganismo en heces fecales empleando un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales y el cultivo a partir de la ingestión de una cápsula atada a una cuerda (Roblejo, *et al*, 2005). Todos los métodos tienen ventajas y desventajas en términos de disponibilidad, rapidez, costos, precisión del diagnóstico, etc. Los métodos invasivos, en especial la prueba rápida de la urea, se ha encontrado que tiene baja sensibilidad diagnóstica en pacientes con úlcera péptica sangrante. Se ha sugerido que la manera de proceder en estos casos es ya sea obtener biopsias gástricas solo para histología o utilizar un método de diagnóstico no invasivo. Las causas para la disminución de la sensibilidad diagnóstica de los métodos invasivos en casos con úlcera péptica sangrante aún no están claros y el método diagnóstico que se debe utilizar en estos casos aún no ha sido establecido (Castro, Sánchez, García, Miralles, & Vargas, 2004).

Gracias al desarrollo de métodos diagnósticos, se ha podido avanzar en el conocimiento del papel que representa esta bacteria en las patologías gastroduodenales, en la historia natural del microorganismo, su epidemiología y en la valoración de la eficacia de los diferentes tratamientos empleados para su erradicación (Roblejo, *et al*, 2005). Para el diagnóstico no invasivo de la infección por *H. pylori*, se recomienda la prueba del aliento con urea marcada con C¹³, es sencilla, tiene un costo moderado y es la prueba no invasiva más sensible y específica. Se recomienda aplicar el protocolo europeo, que incluye la administración previa de ácido cítrico, dado que en caso contrario parece que aumenta el riesgo de resultados falsamente positivos y/o negativos de la prueba. El reciente consenso

europeo de Maastricht IV recomienda también el uso de las pruebas monoclonales en heces, aunque requiere su validación local (Gisbert, *et al*, 2013). En cuanto a los métodos invasivos, la prueba de ureasa rápida en biopsias se ha considerado método diagnóstico suficiente para comenzar la terapia en pacientes sin métodos diagnóstico invasivos previos (Malfertheiner, *et al*, 2006)

El objetivo de este estudio fue establecer el valor diagnóstico de la tinción Warthin Starry (WS) para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas. La tinción WS se fundamenta en que el nitrato de plata es reducido mediante hidroquinona a plata metálica y que esta última se deposita selectivamente sobre *H. pylori* dándole una coloración negra contra un fondo marrón claro. Esta tinción evidencia bacilos pleomórficos en grupos o cadenas cortas en las zonas de necrosis, fácilmente visibles en lesiones tempranas (Rodríguez, Giachetto, Cuneo, Gutiérrez, & Shimchack, 2009). Las tinciones de rutina empleadas en biopsias gástricas para la identificación de *H. pylori* son la tinción Giemsa y la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE). La tinción HE es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xanténico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateína, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación (Panreac Química S.L.U., 2011). La tinción de Giemsa está formada por varios colorantes: los tintes neutros utilizados combinan el azul de metileno como tinte básico y la eosina como tinte ácido, lo que da una amplia gama de colores. El azul de metileno es un colorante metacrómico, de ahí que muchas estructuras se tiñen de púrpura y no de azul. El pH de la solución de esta coloración es crítico y se debe ajustar idealmente según diversos fijadores. La gama del pH debe de estar entre 6.4 y 6.9 (Ortiz, *et al*, 2005).

II. RESUMEN

H. pylori es una bacteria que posee la capacidad de sobrevivir en el estómago y duodeno de los seres humanos, se estima que el 50% de la población mundial es infectada por este microorganismo y es la causa principal de afecciones como gastritis, úlcera gastroduodenal, linfoma gástrico, entre otras. El diagnóstico de *H. pylori* se realiza mediante el estudio de cortes de biopsias gástricas teñidos con tinciones como Giemsa, Hematoxilina Eosina, Warthin Starry (WS), entre otras. El presente estudio tuvo como objetivo establecer el valor diagnóstico de la tinción Warthin Starry para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas. En esta investigación se determinó la sensibilidad, especificidad y concordancia de la tinción Warthin Starry comparada con la tinción Giemsa, así como las características de equivalencia entre ambas tinciones.

Se obtuvieron 450 biopsias gástricas, 150 de cada hospital participante (Hospital General San Juan de Dios (HGSJD); Hospital Roosevelt e Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN), las cuales fueron teñidas con Giemsa y Warthin Starry. Se determinó la presencia de *H. pylori* por un patólogo de cada hospital participante, utilizando como referencia la tinción Giemsa y haciendo una evaluación de Warthin Starry sin conocer los resultados previos de la tinción de Giemsa (estudio ciego). Los datos recolectados fueron tabulados y analizados, determinándose 199 (44.22%) casos positivos para *H. pylori* con la tinción de Giemsa y 156 (34.67%) casos positivos con la tinción WS; 251 (55.78%) casos negativos para *H. pylori* y 294 (65.33%) casos negativos con la tinción WS.

El hospital Roosevelt presentó un mayor porcentaje de casos positivos para ambas tinciones, 72% (108/150) con Giemsa y 62.67% (94/150) con WS; el INCAN presentó 32% (48/150) de casos positivos con Giemsa y 22.67% (34/150) con WS; el Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) presentó 28.67% (43/150) de casos positivos con Giemsa y 18.67% (28/150) con WS. Se determinó que la diferencia en la frecuencia de *H. pylori* encontrada con la tinción de Giemsa en el Hospital Roosevelt fue estadísticamente significativa comparándola con el Hospital General San Juan de Dios y el INCAN ($p < 0.0001$).

Comparada con la tinción de Giemsa, la tinción WS presentó una sensibilidad de 69.34%, una especificidad de 92.82% y una concordancia considerable (Kappa= 0.64). Se establecieron características de equivalencia entre ambas tinciones, encontrándose que la

tinción Giemsa tiene un menor costo, requiere un mayor tiempo de observación y menor tiempo de procedimiento. Se encontró que 313 casos se diagnosticaron con gastritis crónica y de esos casos 127 (40.58%) presentaron *H. pylori*; 73 casos se diagnosticaron con gastritis crónica folicular y de esos casos 55 (75.34%) presentaron *H. pylori*; 26 casos se diagnosticaron con gastritis atrófica folicular, de los cuales 8 (30.77%) presentaron *H. pylori*; el resto de casos incluían diagnósticos como gastritis aguda, adenocarcinoma, pólipos hiperplásicos, entre otros.

A pesar de una menor sensibilidad, la tinción de Warthin Starry puede recomendarse como una técnica de tinción con alta especificidad para confirmar los diagnósticos primarios realizados con Giemsa.

III. ANTECEDENTES

A. Historia

En los últimos años, los estudios relacionados con la bacteria *H. pylori* han tenido una gran relevancia en el área de la gastroenterología, aunque los primeros trabajos que comunican la presencia de bacterias espirales en estómagos humanos datan ya de hace más de un siglo (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009).

Hasta finales del siglo XX los científicos consideraron al estómago como un ambiente hostil para el crecimiento bacteriano. Por primera vez en 1975, la gastritis se asoció con la presencia en la mucosa gástrica, de una bacteria gram negativa (Triana, 2001). Fue hasta 1983 cuando el estudio de Robin Warren y Barry J. Marshall estableció una relación entre la infección por *H. pylori* y la presencia clínica de trastornos gastrointestinales (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009); lo que hicieron fue cultivar la mucosa gástrica humana observando un microorganismo gram negativo, microaerofílico y de forma espiralada y estudiaron su asociación con la inflamación del aparato gastrointestinal (Triana, 2001).

Desde su cultivo en 1983, *H. pylori* recibió diferentes denominaciones hasta adquirir su nombre definitivo (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009). El microorganismo cultivado fue previamente incluido en el género *Campylobacter*, con el nombre de *Campylobacter pylori*, pero más tarde, en 1989, se insertó en el nuevo género *Helicobacter*, donde además de *H. pylori*, se encuentran al menos 11 especies que han sido aisladas de la mucosa gástrica e intestinal de otros mamíferos (Triana, 2001).

Los bacilos pertenecientes al género *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Wolinella* pertenecen a un grupo distinto de bacterias (Superfamilia VI del ARNr), relacionado lejanamente con otras eubacterias. Las especies del género *Helicobacter* se dividen en las que viven en el estómago y las que viven en el intestino, tanto del ser humano como de animales. Hoy en día se conoce a esta bacteria como el principal agente causal de la gastritis crónica y un factor de riesgo para el linfoma gástrico y el adenocarcinoma (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009).

B. *Helicobacter pylori*

1. Microbiología

Es una bacteria con forma de espiral, gram negativo, móvil, curva, presente en la mucosa gástrica (Fotografía 1). Coloniza las mucosas no secretoras del ácido del estómago de la parte alta del tracto intestinal, incluyendo el duodeno (Schwizer, *et al*, 2001). Es una bacteria microaerofílica que se cultiva en medios con baja tensión de oxígeno (3-15%) y alta concentración de CO₂ (3-10%). Al microscopio se observa con colorantes cromogénicos, por ejemplo bromuro de etilio, mostrando imágenes muy definidas sobre su morfología (Triana, 2001).



Fotografía 1. *Helicobacter pylori* por microscopía electrónica de barrido. Fuente: (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004)

H. pylori mide 2-3 nm por 0.5-1.0 nm y posee seis flagelos unipolares cubiertos por una membrana y con terminación bulbar. Estos flagelos se hallan constituidos por unidades proteicas (flagelinas) de un peso molecular de 50,000 a 62,000 y estas flagelinas están codificadas por los genes Fla A y Fla B. Ambos genes han sido clonados y se han inducido mutaciones las que permitieron demostrar que la flagelina Fla A es esencial para la motilidad de la bacteria (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

Una de las características bioquímicas más trascendentes de esta bacteria es la producción de una enzima ureasa, capaz de generar amonio a partir de la hidrólisis de la urea, lo que le permite rodearse de un medio alcalino, protegiéndose de la secreción ácida gástrica, hasta lograr su ubicación entre la superficie celular y la capa de moco que la recubre (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

Si bien se han identificado diversos reservorios no humanos de esta infección, las fuentes más importantes de diseminación son los seres humanos por vía oral-oral y fecal-oral (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

H. pylori se tiñe como las bacterias gram negativas y se pueden observar en forma de bacilos curvados o espirales cuando se encuentran en la mucosa gástrica, aunque algo más rectos cuando se encuentran en medios de cultivo (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

Estos microorganismos para su acción patogénica deben adherirse y colonizar la mucosa, para lo primero juegan un papel muy importante dos genes: *hpaAc* y *eiceA*. A mayor número de bacterias adheridas mayor daño. Las responsables del daño tisular son las enzimas que produce. Entre ellas hay que destacar a la ureasa cuya función es proteger a la bacteria frente al pH ácido originando productos oxidativos dañinos (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

Las fosfolipasas también tienen un importante papel al degradar los componentes lipídicos de la mucosa que le proporciona integridad. Otras enzimas con actividad proteolítica son catalasa y superóxido dismutasa (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

Estudios de investigación se han centrado en dos factores bacterianos: citotoxina vacuolizante VacA (codificada por el gen VacA presente en todas las cepas) y la proteína CagA (codificada por el gen CagA, que no presenta toxicidad por si misma (Figura 1), pero parece intervenir en la expresión de la toxina vacuolizante, está presente en el 80% de las cepas (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

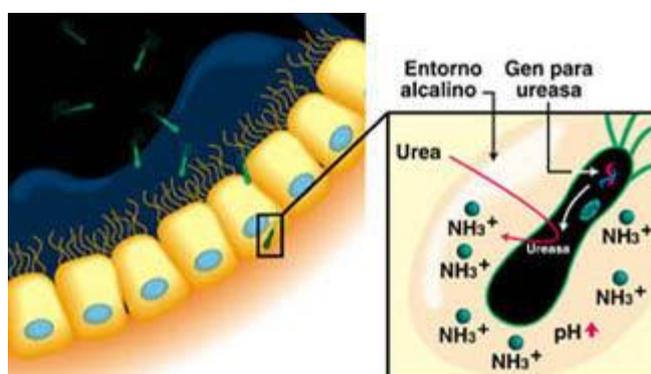


Figura 1. Principales mecanismos de virulencia de *Helicobacter pylori*.
Fuente: (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004)

1.1 Factores de riesgo para la infección y modo de transmisión

El reservorio natural es el estómago de la persona infectada, la cual puede permanecer sintomática durante años, instalándose por el resto de la vida del hombre, pues el sistema defensivo no se activa con la fuerza requerida para eliminar la bacteria. La saliva, las heces fecales y las manos contaminadas del portador son las fuentes contaminantes de alimentos, agua y objetos con los cuales se entra en contacto, transmitiéndose así de individuo a individuo. Las vías más posibles de transmisión son la oral-oral y la fecal-oral (Amores, *et al*, 2010).

Los factores ambientales que se relacionan con la adquisición de la infección por *H. pylori* son el número de personas en la vivienda, el número de hermanos, el compartir cama con uno o más familiares y la usencia de una fuente de agua caliente. Todos ellos son, en general, marcadores de un menor nivel socioeconómico y de peores condiciones de higiene durante la infancia. El reservorio principal de la infección por *H. pylori* es el estómago humano. Se han implicado en la transmisión de la infección tanto la vía fecal-oral como las vías oral-oral y gastro-oral. Se desconoce, sin embargo, el mecanismo exacto de transmisión (Triana, 2001).

En el caso de los países en vías de desarrollo, estudios epidemiológicos realizados en Latinoamérica sugieren que la transmisión fecal-oral a través del agua de bebida es el mecanismo principal de transmisión. Otros datos que apoyan la posibilidad de esta vía como fuente de infección son:

- Que se ha podido cultivar *H. pylori* en heces de pacientes con síndrome diarreico o tras estimulación con catárticos.
- Que cuando se somete a *H. pylori* a condiciones adversas para su crecimiento adopta una forma cocoide que es viable pero no cultivable y que se supone que puede ser una forma de resistencia de la bacteria capaz de sobrevivir en ambientes adversos.
- Que se ha detectado *H. pylori* por PCR en aguas de pozos residuales (Triana, 2001).

Por el contrario, en los países con un adecuado tratamiento de aguas, no parece darse esta vía de transmisión. En este caso, la vía de transmisión más importante es la de persona a persona, o bien fecal-oral, oral-oral o gastro-oral. La transmisión de la infección es en la mayoría de los casos intrafamiliar, de madres a hijos o entre hermanos. Aunque los datos

sobre el aislamiento de *H. pylori* en la boca son contradictorios, no parece que la cavidad oral sea un reservorio habitual. Sin embargo, sí se ha detectado *H. pylori* cultivable en el vómito de pacientes infectados (Triana, 2001); otra vía alternativa es a través de la instrumentalización debido a que se han publicado casos de transmisión de la infección a través de sondas de pHmetría esofágica (la pHmetría esofágica es una prueba en la cual se realiza la medición de pH o la cantidad de ácidos que pasan del estómago al esófago durante 24 horas), sondas gástricas o endoscopios incorrectamente desinfectados (Alba, Toledo, & Viana, 2006). Además será necesario establecer con más exactitud los mecanismos de transmisión para determinar qué medidas preventivas pueden ser útiles para el control de la infección (Triana, 2001). Algo importante es que no se ha descrito transmisión sexual y tampoco hay evidencia de que puedan existir vectores en la transmisión de esta bacteria (Alba, Toledo, & Viana, 2006).

2. Patogenia

H. pylori se adapta fuertemente al nicho ecológico de la mucosa gástrica debido a sus características que le permiten entrar dentro del moco, nadar, atacar a las células epiteliales, evasión de la respuesta inmune y como resultado, la colonización y transmisión persistente (Alba, Toledo, & Viana, 2006).

La infección por *H. pylori* altera de manera variable la secreción ácida gástrica, induce una lesión celular que aumente la permeabilidad de la mucosa al ácido y desencadena una potente reacción inflamatoria local. Así, *H. pylori* desencadena una respuesta tanto celular con infiltración mucosa por células mononucleares y polinucleares como humoral con producción de anticuerpos específicos. La mucosa gástrica de los pacientes infectados presentan niveles elevados de citosinas proinflamatorias como IL-1, (TNF- α), IL-8 e IL-6 (Peña, 2008).

Como sucede con otras infecciones crónicas, la interacción entre la mayor o menor patogenicidad de la cepa *H. pylori*, las características genéticas del individuo infectado y los factores ambientales condicionan que las manifestaciones de la infección sean muy diversas. Así, esta infección puede causar desde una úlcera gástrica o duodenal hasta un adenocarcinoma o un linfoma gástrico (Peña, 2008).

También, como en otras infecciones crónicas, la infección por *H. pylori* puede ser asintomática durante largos períodos. Así, como se ha comentado, la mayoría de individuos infectados no presentarán nunca manifestaciones clínicas de la infección. Hasta hace poco se creía que la infección por *H. pylori* era exclusivamente extracelular y afectaba únicamente la superficie mucosa y a la capa de moco gástricas (Alba, Toledo, & Viana, 2006).

Sin embargo, recientemente se ha demostrado la presencia de bacterias visibles a nivel intracelular, intercelular y en el tejido subyacente de la mucosa gástrica. Se ha sugerido que dicha invasión tisular puede tener un papel importante en la toxicidad de la bacteria, en la modulación de la respuesta inmune o en la aparición de las manifestaciones de la enfermedad. Son necesarios, sin embargo, estudios adicionales para determinar el papel exacto de las bacterias intracelulares en la patogenia de la infección (Peña, 2008).

2.1 Factores bacterianos patogénicos y de colonización

2.1.1 Movilidad por flagelos

La movilidad de *H. pylori* es facilitada por los flagelos, estructuras extracelulares complejas que requieren energía para funcionar. *H. pylori* lleva de 5 a 7 flagelos agrupados en uno de sus polos. Normalmente, las inmunoglobulinas humanas están dirigidas contra las proteínas flagelares de *H. pylori*. Una característica particular de los flagelos de esta bacteria es que están cubiertos por una vaina lipoproteica que los protege de los ácidos gástricos (Olivares & Gisbert, 2006).

Las cepas de *H. pylori* con flagelos mutados son menos virulentas que las del tipo silvestre, lo que indica que los flagelos son cruciales en el proceso patogénico. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB, característica inusual distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homopoliméricas. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante, FlaA, se encuentra en el exterior. La eliminación de ambas flagelinas (FlaA⁻/FlaB⁻) da como resultado bacterias inmóviles, que conservan una capacidad de adherencia similar a la del tipo silvestre, pero tan sólo son capaces de infectar de manera eficiente en los estadios tempranos de la infección (Olivares & Gisbert, 2006).

2.1.2 Adhesinas

H. pylori presenta un tropismo tisular por la mucosa gástrica y se adhiere específicamente al epitelio de tipo gástrico a través de moléculas de adhesión. El proceso de la adquisición de la infección por *H. pylori* se puede dividir en: la adhesión a la capa celular epitelial y la inducción de citosinas proinflamatorias. La adhesión está mediada por las adhesinas de *H. pylori*, entre las cuales está BabA, que se une al epítipo Lewis del huésped, habiéndose sugerido que esta molécula juega un papel crucial en el desarrollo del adenocarcinoma gástrico, la úlcera péptica y la gastritis crónica. El gen polimórfico BabA tiene dos alelos, BabA1 y BabA2, codificando este último para la proteína BabA. Tan sólo se diferencian en una serie de repeticiones de 10 pares de bases que contienen un codón de inicio de la transcripción. Se ha observado que la presencia de BabA2 se correlaciona con la de otros genes patógenos (CagA y los alelos s1 y m1 de VacA) (Olivares & Gisbert, 2006).

Otra proteína implicada en la adhesión es la proteína NAP (proteína activadora de neutrófilos), codificada por el gen *napA* y aislada de la fracción proteica de la membrana plasmática externa de *H. pylori*. Aparte de su función de bacterioferritina en la captación de hierro, tiene funciones muy diferentes cuando se secreta o se presenta en la superficie bacteriana, como la afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares. La proteína NAP también tiene una alta afinidad por ceramidas sulfatadas, por el grupo antigénico sanguíneo SO_3 -Lewis^a y en menor medida por los Lewis^x y SO_3 -Lewis^x, lo que demuestra que NAP funciona como una adhesina. Posee también una hemaglutinina codificada por el gen *hpaA* que se une a restos de N-acetilneuraminil a (2,3)-lactosa y a restos de ácido siálico, puesto que se ha demostrado la reversibilidad de la unión de *H. pylori* a las células gástricas usando sialilactosa o la glucoproteína fetuina (Olivares & Gisbert, 2006).

En resumen, se puede concluir que la presencia de adhesinas permite a la cepa que posea una mayor capacidad de infección en la mucosa (Olivares & Gisbert, 2006).

2.2 Factores citotóxicos

2.2.1 CagA (citotoxina asociada al antígeno A)

CagA es una proteína de 120 a 140 kd, altamente antigénica, con potentes propiedades citotóxicas y proinflamatorias. Forma parte de la denominada isla de

patogenicidad Cag, que debe estar completa para ser funcional. La isla de patogenicidad codifica, además de la proteína CagA, para un conjunto de proteínas que forman un sistema de microinyección que introduce la proteína CagA en el interior de la célula epitelial. A este nivel CagA es fosforilada e induce cambios morfológicos en la célula. CagA está presente en el 60 a 80% de las cepas aisladas en los países occidentales (Blancas, 2004).

La infección por una cepa que exprese CagA aumenta el grado de inflamación mucosa y se ha relacionado con un aumento del riesgo de úlcera y de cáncer gástrico. Sin embargo, se ha descrito úlceras y tumores gástricos en pacientes infectados por cepas de *H. pylori* que no expresaban CagA y muchos individuos infectados por cepas CagA positivas nunca presentan manifestaciones de la infección. Otra proteína, conocida como CagE, ha demostrado también un potente efecto liberador de citotoxinas por la célula epitelial, entre ellas IL-8 (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

2.2.2 VacA (citotoxinavacuolizante A)

Todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen VacA que codifica para la proteína vacuolizante (VacA), pero sólo la mitad de las cepas producen la proteína que es la responsable de la vacuolización de la célula epitelial. Se han descrito variantes alélicas de este gen, esencialmente centradas en la secuencia señal (variantes s1a y s1b del alelo s1 y el alelo s2) y en la porción central del gen (alelos m1 y m2). Las cepas que contienen los alelos s2m2 producen poco o ninguna citotoxina. Por el contrario, los alelos s1/m1 de VacA se han asociado a la presencia de CagA y se consideran de alto potencial para la secreción de factores citotóxicos, específicamente TNF α -IL-8. Por lo tanto, la infección por cepas que expresan dichos factores citotóxicos parece conferir un mayor riesgo de patología gastroduodenal (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

2.2.3 Otros factores citotóxicos

H. pylori posee fosfolípidos de membrana con actividad citotóxica o endotoxinas. Las endotoxinas de *H. pylori* son, sin embargo, mucho menos potentes que las de otras bacterias gram negativas, como por ejemplo *E. coli*. Se han descrito también la síntesis por parte de *H. pylori* de proteínas con capacidad de reclutar y activar los neutrófilos. Finalmente, la presencia de la proteína IceA se ha relacionado -aunque de manera no

concluyente por el momento- con la aparición de úlcera péptica (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

3. Patología

La infección por *H. pylori* constituye una de las infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal con mayor prevalencia a nivel mundial. El nivel socioeconómico y cultural de las distintas poblaciones dentro de un mismo país influye en la distribución de la infección por *H. pylori*, siendo ésta mayor en los grupos más pobres y marginados, o con menor educación (Araujo, Pinto, Ramírez, Cok, & Bussalleu, 2005).

H. pylori es el principal agente asociado al desarrollo de gastritis crónica activa, la cual en su variedad atrófica, es considerada una lesión pre-maligna precursora del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Otra neoplasia asociada a la infección con *H. pylori* es el Linfoma no Hodgkin del tejido linfoide asociado a la mucosa o «MALT», donde los estudios han demostrado que la erradicación de *H. pylori* se acompaña de la regresión completa del tumor en un 60 a 80% de los casos (Araujo, Pinto, Ramírez, Cok, & Bussalleu, 2005).

Las causas etiológicas más importantes que producen molestias gastroduodenales son: enfermedad de reflujo gastro esofágico, enfermedad ácido péptica, cáncer gástrico y dispepsia no ulcerosa; sin embargo, dichas causas no son del todo delimitadas ni excluyentes, sino por el contrario, con el transcurso de los años se han dilucidado los mecanismos etiopatológicos que muestran características comunes y secuenciales. En el lapso de 20 años, hemos visto como *H. pylori* ha pasado de ser un hallazgo en las biopsias de mucosa gástrica a convertirse en el principal agente etiológico de la úlcera duodenal, gastritis crónica activa y gastritis crónica atrófica. Más aún, *H. pylori* ha sido asociada al desarrollo de patología neoplásica gástrica, principalmente el carcinoma gástrico y el linfoma de bajo grado (Salas, Benites, & Salinas, 2005).

En los últimos años se ha profundizado en el estudio de *H. pylori*, sin embargo los resultados han sido muchas veces controversiales, como por ejemplo en lo que respecta a la relación entre la presencia de *H. pylori* y la sintomatología de la dispepsia no ulcerosa. Por esta razón, existe una gran controversia con relación al estudio y tratamiento de la dispepsia ya que el elevado número de personas que la presentan generaría enormes cargas sociales y

económicas. Por otro lado, el diagnóstico histológico suele representar el diagnóstico definitivo de la mayor parte de patologías gástricas y de esta manera determina el tratamiento más efectivo. Con el uso de técnicas sencillas y de bajo costo podemos determinar en las biopsias gástricas, la tasa de infección por *H. pylori*, grado inflamatorio de la mucosa, lesiones pre malignas, ulceraciones y patología maligna. Además existen estudios que señalan la importancia de la toma de biopsias en las endoscopías, debido a la falta de correlación entre el diagnóstico endoscópico e histológico de la gastritis crónica y la normalidad de la mucosa (Salas, Benites, & Salinas, 2005).

4. Diagnóstico

Las pruebas diagnósticas para detectar la infección por *H. pylori* incluyen métodos endoscópicos y no endoscópicos. Las técnicas utilizadas pueden ser directas (cultivo, demostración microscópica del microorganismo) o indirectas (utilizando ureasa, antígenos fecales o una respuesta de anticuerpos como marcador de enfermedad) (Cuadro 1) (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010).

La elección del examen depende en gran medida de la disponibilidad y el costo; además, hay que distinguir entre los análisis utilizados para establecer el diagnóstico de infección y aquellos que buscan confirmar la erradicación de esa infección. Otros factores importantes son: situación clínica, prevalencia de la infección en la población, probabilidad de la infección antes del análisis, diferencias en la realización del test y factores que puedan incidir en los resultados de los análisis, tales como el uso de tratamiento contra la secreción y antibióticos (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010).

Cuadro 1. Principales métodos de diagnóstico utilizados en la infección por *Helicobacter pylori*

Métodos	Agresivos(biopsia gástrica)	No agresivos
Directos	Cultivo Histología Técnicas moleculares (PCR Tiempo real)	Técnicas moleculares: jugo gástrico, saliva o heces Antígeno en heces
Indirectos	Ureasa rápida	Prueba del aliento con urea (UBT)Serología Anticuerpos en saliva (en investigación)

Fuente: (Fernández & Pértegas, 2003)

4.1 Métodos directos

4.1.1 Histología

El estudio histológico de biopsias de la mucosa antral consiste en observar la bacteria en espiral en los cortes histológicos de las biopsias y también se aprecian los cambios en la mucosa gástrica originados (gastritis crónica con nódulos linfoides) (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009). La dificultad de este estudio, radica en que depende del entrenamiento del patólogo y de la experiencia del endoscopista en la selección de los sitios de biopsia, ya que puede haber falsos negativos debido a que la distribución de la bacteria es focal, o bien cuando la biopsia ha sido tomada de una zona con metaplasia intestinal. (Calderón & Badani, 2013)

Existen diferentes tipos de tinciones que, sin ser específicas para *H. pylori*, permiten su detección:

- a. Tinción de hematoxilina-eosina: permite el estudio histológico y valorar la infección por *H. pylori* (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004). Su principal ventaja consiste en que permite el diagnóstico y la graduación de la lesión histológica asociada; tiene como inconveniente que requiere una experiencia superior a la de otras técnicas para establecer un correcto diagnóstico en la presencia de *H. pylori*. Debe existir una alta densidad de colonias bacterianas para que sea posible reconocer el microorganismo, el cual queda teñido débilmente y puede confundirse con productos celulares y moco. Por estas razones, algunos patólogos recomiendan realizar siempre una tinción especial además de hematoxilina y eosina (Amores, *et al*, 2010).
- b. Tinción de plata Warthin Starry: emplea el nitrato de plata y se basa en la afinidad de esta bacteria por las moléculas de su membrana con la plata, lo que permite una buena visualización del microorganismo (Ortiz, *et al*, 2005). Esta tinción es la utilizada habitualmente para la identificación de espiroquetas. Esta técnica es muy buena para visualizar el microorganismo, se considera específica para identificar *H. pylori* y su sensibilidad y especificidad alcanzan el 95% (Montalvo, *et al*, 2009). Pero es relativamente complicada de realizar, es laboriosa y tiene un elevado costo por el tipo de reactivos utilizados. Además, en ocasiones pueden producirse falsos positivos al ser difícil distinguir al microorganismo de los precipitados de plata en la capa mucosa. Ello hace que habitualmente no se utilice como técnica de rutina, reservándose para aquellos casos en que existan dudas diagnósticas (Martín, *et al*, 1996).

- c. Tinción de Giemsa: permite una fácil identificación de *H. pylori* que aparece teñido de azul intenso sobre el fondo azul luminoso. Por su simplicidad, rapidez y bajo costo, se considera la tinción de elección (Martín, *et al*, 1996). Sin embargo, no es adecuada para el estudio anatomopatológico de la muestra gástrica (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).
- d. Tinción de Gram: precisa una muestra de biopsia fresca y no aporta información histológica de la pieza (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

4.1.2 Cultivo

Es un método diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad (del 100%), imprescindible para la investigación y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos de las distintas cepas y el fracaso del tratamiento erradicador. El aislamiento de *H. pylori* en un medio de cultivo se sitúa como el patrón de referencia en el diagnóstico. La muestra debe transportarse en el medio adecuado y en el menor tiempo posible dado la sensibilidad de *H. pylori* a la desecación y las condiciones ambientales. Por otro lado, es una técnica no rutinaria, indicada para el estudio de fracasos terapéuticos y que requiere cierto tiempo hasta obtener el resultado diagnóstico. El cultivo para *H. pylori* puede realizarse en medios no selectivos enriquecidos con agar nutriente (sangre y otros elementos) y medios selectivos con 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y suplementos antibióticos (el medio de Skirrow es el más utilizado) (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004). Otros medios que se han utilizado para el aislamiento de la bacteria se encuentran diferentes formulaciones de agar base, como infusión de cerebro corazón, Columbia, Brucella, Müller-Hinton y GC-agar base, suplementados con 5-10% de sangre de carnero o caballo y otros suplementos como hemoglobina, isovitalex, ciclodextrina, etc. (Amores, *et al*, 2010).

4.1.3 Pruebas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa PCR)

La sensibilidad y especificidad son muy elevadas, cercanas al 100% y se reservan para estudios de investigación. Es una prueba compleja que requiere un equipo sofisticado y un personal experimentado, por lo que tiene un costo elevado (Moncayo, *et al*, 2011).

4.1.4 Citología con cepillado endoscópico

Es una buena técnica de identificación, aunque agresiva sobre la cobertura epitelial que puede llegar a romperse y exponer a *H. pylori* a la acción de los jugos gástricos, lo que reduciría su sensibilidad (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

4.1.5 Técnicas con aspirado gástrico

No requieren estrictamente la realización de una endoscopia, aunque sí precisan la introducción de una sonda nasogástrica para obtener la muestra (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

4.2 Métodos indirectos

4.2.1 Prueba del aliento con urea marcada (C^{13} o C^{14})

El test del aliento con urea marcada (Prueba del Aliento con UreaUBT) se basa en la capacidad de la ureasa producida por la *H. pylori* para hidrolizar rápidamente una solución de urea marcada previamente con C^{13} o C^{14} , valorando la totalidad de la mucosa gástrica. Es una prueba fácil, cómoda, simple de realizar, bien tolerada, que detecta infección activa incluso ante cantidades pequeñas de *H. pylori*, siendo el medio óptimo de control y seguimiento de pacientes sometidos a tratamiento erradicador (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010).

4.2.2 Test rápido de la ureasa

Es una prueba de bajo costo, rápida y sencilla, la cual permite en escaso tiempo (hasta en una hora) obtener el diagnóstico. Se realiza con una biopsia del antro gástrico, tomada durante la endoscopia, que se coloca en un tubo con urea y un indicador (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009).

Al producir ureasa, *H. pylori* hidroliza la urea, se forman iones amonio, aumenta el pH de la solución y se produce un viraje del color del indicador. Se dispone de varias pruebas basadas en la ureasa, aunque las más utilizadas son: la prueba de ureasa en biopsia (Prueba CLO), el caldo de urea de Christensen y las soluciones de urea a concentraciones variables, todas ellas con sensibilidad y especificidad elevadas (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

La concordancia y el valor predictivo positivo ronda el 100% cuando se comparan los resultados de la prueba de la ureasa con los métodos histológicos (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

Pueden producirse resultados falsos negativos si la cantidad de bacterias en el estómago es pequeña y en casos de pacientes con hemorragia digestiva (Vallejos, Enríquez, López, Valdez, & Pérez, 2009).

4.2.3 Serología

Es una prueba sencilla, barata, basada en la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos de *H. pylori* como consecuencia de la reacción inmunológica local/sistémica del individuo. Dada la permanencia de anticuerpos en el período comprendido entre los 3 y los 6 meses inmediatamente posteriores al tratamiento, las pruebas serológicas indican únicamente infección previa por *H. pylori* y no discriminan entre personas con infección activa y enfermedad de aquellos pacientes infectados pero asintomáticos. El valor de la serología como método de control es muy limitado, aunque resulta útil en estudios epidemiológicos o cuando no se puede realizar la endoscopia u otros métodos diagnósticos en individuos sin terapia erradicadora (Fochesatto, Guayán, Morán, & Vizcaíno, 2004).

4.2.4 Otras técnicas

La detección de anticuerpos en orina ha sido empleada con éxito en el diagnóstico de varias enfermedades, como el cáncer de mama y la aspergilosis invasora. Cuando ocurre la infección por *H. pylori* se eliminan anticuerpos de clase IgG por la orina. Basado en este principio, fueron desarrollados en Japón 2 juegos comerciales: un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) estándar denominado Urinelisa (OtsukaDiagnostic) y un juego basado en inmunocromatografía, denominado RapiRum (OtsukaDiagnostic). Estos juegos han sido empleados en diversos estudios y han demostrado tener buena sensibilidad, pero la especificidad ha sido muy variada y no siempre aceptable. La mayoría de estos estudios se han realizado en países orientales, principalmente en Japón, por lo que a pesar de ser la orina una muestra no invasiva promisoría, es necesario realizar más estudios para validar su factibilidad en el diagnóstico. Varios estudios han evaluado la saliva y la placa dental como posibles muestras no invasivas para el diagnóstico de *H. pylori* empleando diversas técnicas. Juegos comerciales basados en la detección de anticuerpos anti

H. pylori en saliva se han empleado, pero los valores de sensibilidad y especificidad han sido inferiores al 90% (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

5. Epidemiología

A nivel mundial hay varias cepas de *H. pylori* que difieren en su virulencia y los diferentes factores que intervienen, como los vinculados al huésped y al ambiente, los cuales determinan diferencias de expresión de la enfermedad. La edad, etnia, género, geografía y condición socioeconómica son todos factores que influyen en la incidencia y prevalencia de la infección por *H. pylori* (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010).

La prevalencia general es alta en los países en desarrollo y más baja en los países desarrollados; además, dentro de un mismo país puede haber una variación igualmente amplia de la prevalencia entre las poblaciones urbanas de mayor nivel económico y las poblaciones rurales. Las principales razones de estas variaciones tienen que ver con las diferencias socioeconómicas entre las poblaciones. La transmisión de *H. pylori* tiene lugar fundamentalmente por las vías oral-oral o fecal-oral. Son muchos los factores que intervienen en la prevalencia general de la infección, como la falta de una adecuada higiene, falta de agua potable, dietas pobres y superpoblación (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010).

En los países en desarrollo, la infección por *H. pylori* es marcadamente más prevalente en edades más jóvenes que en los países desarrollados (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010).

En los países desarrollados, la infección por este agente patógeno es poco frecuente en niños y aumenta gradualmente en función de la edad, llegando a alcanzar 30% de infestación a los 30 años de edad, valor que se mantiene constante hasta edades mayores (Amores, *et al*, 2010).

En México, América Central y América del Sur la prevalencia es del 70 al 90%, al igual que en África. Mientras que en Asia la prevalencia se da entre el 30% y 50%. En Estados Unidos y Canadá es del 30% en Australia se presenta en un 20% (Posada, Robles, & Orozco, 2010).

El papel de *H. pylori* como patógeno está bien documentado ya que produce gastritis crónica superficial, también está implicado en la aparición de la úlcera duodenal y gástrica, lo que ha llevado a que en junio del 1994 la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer-OMS reconociera al *H. pylori* como carcinógeno del grupo I, el rango de peligrosidad más alto otorgado (Araujo, Pinto, Ramírez, Cok, & Bussalleu, 2005).

En Guatemala la prevalencia de la infección se ve influenciada por la condición socioeconómica de los individuos mientras su prevalencia alcanza hasta un 86.3% en sujetos adultos dispépticos de condición socioeconómica baja y 63.6% en los individuos de condición socioeconómica alta (Schneider, *et al*, 1994).

6. Tratamiento

Los pacientes con úlcera péptica y *H. pylori* positivos deben ser tratados con terapia de erradicación, pero no está definido cuánto debe extenderse esta terapia de erradicación. Todos los pacientes con historia de úlcera que hacen uso frecuente de antiácidos necesitan ser identificados y tratados. Se desconoce si los pacientes sin úlcera se benefician del tratamiento antibiótico. Un tratamiento empírico ha sido sugerido para la dispepsia con el objetivo de curar a todos los pacientes con úlcera oculta. En poblaciones con elevada incidencia de enfermedad ulcerosa debe ser más barato prescribir antibióticos a todos los pacientes dispépticos con prueba de *H. pylori* positiva que investigar a todos los dispépticos para confirmar el diagnóstico de úlcera (Classen, Prinz, & You, 2010).

El cambio más significativo de la terapéutica en los últimos 5 años ha sido el desarrollo de tratamientos más efectivos. El tratamiento normalmente incluye dos antibióticos que ayudan a matar la bacteria y un inhibidor de bomba de protones que hace que el estómago produzca menos ácido y ayuda a aliviar la úlcera, lo que se conoce como terapia triple. Se puede añadir un cuarto compuesto, como la sal de bismuto, en una terapia cuádruple. La mayoría de los compuestos están ahora disponibles como genéricos de bajo costo (Classen, Prinz, & You, 2010).

La amoxicilina es generalmente más eficaz a pH neutral y mediante su combinación con un inhibidor de la bomba de protones como omeprazol, se podían obtener porcentajes de erradicación del 55% después de 2 semanas y con escasos efectos colaterales. Una terapia dual en la cual se combina el omeprazol, con la claritromicina resultó ser más consistente,

pero los resultados también variaban y frecuentemente se encontraban por debajo del 70%. Por todo lo anterior estos procedimientos han caído de uso en Europa (Triana, 2001).

La introducción de RBC (citrato-bismuto-ranitidina) vino entonces a aportar nuevas ventajas terapéuticas. La ranitidina como antagonista de los receptores de H_2 genera una disminución de la acidez gástrica mientras que el bismuto, como agente citoprotectivo es activo contra *H. pylori*. El RBC no es tan efectivo en la erradicación de *H. pylori*, sin embargo, cuando se usa en combinación con la amoxicilina, los resultados son muy favorables. Cuando se desean alcanzar niveles de erradicación superiores al 85% debe utilizarse el RBC en combinación con claritromicina, un antibiótico que es particularmente efectivo con *H. pylori*, posiblemente porque se concentra por la mucosa gástrica. En la actualidad se recomienda utilizar RBC con claritromicina 500mg 2 veces al día durante 2 semanas. Por supuesto, que a estas elevadas dosis, las 2 desventajas del método son su elevado costo y la posibilidad de efectos colaterales. Buenos resultados en comparación con los que se logran cuando usando la terapia triple, se obtienen cuando se utiliza un régimen como este propuesto durante 7 días (Triana, 2001).

Una terapia adicional que reduce el costo y que da buenos resultados con el tratamiento por una semana es la clásica terapia triple con bismuto y en combinación con un inhibidor de la bomba de protones. Algunas veces a ésta se le conoce también como terapia cuádruple y tiene las desventajas de los regímenes complicados, pero la duración es corta y por ello reduce el riesgo de los efectos colaterales (Triana, 2001).

La variante más ampliamente utilizada e investigada es la terapia triple basada en un inhibidor de la bomba ácida que se suministra durante 7 días. Se estructura de tal forma que se suministra un inhibidor de la bomba ácida con 2 de los siguientes 3 antibióticos: nitroimidazol, amoxicilina y claritromicina. Su ventaja es que el tratamiento tiene lugar por 7 días con 2 dosis diarias. El inhibidor que se recomienda es el omeprazol, aunque otras drogas similares son igualmente efectivas. La sustitución de un antagonista de los receptores H_2 por el inhibidor de la bomba ácida ha sido también usado con éxito en algunos estudios (Triana, 2001).

Un régimen usado con frecuencia es la combinación de omeprazol con metronidazol, 400mg 2 veces al día. Su mayor crítica es que en muchos países *H. pylori* tiene una elevada resistencia al metronidazol y se supone que en los países desarrollados hasta el 80% de los individuos pueden ser portadores resistentes. Los más recientes estudios en este campo

indican que el omeprazol desempeña una función fundamental en la erradicación de *H. pylori* a pesar de la presencia de cepas resistentes de esta bacteria (Triana, 2001).

Por todo lo anterior, la combinación de omeprazol-amoxicilina-claritromicina (terapia triple), la cual muestra cifras de erradicación superiores al 90% en la mayor parte de los estudios publicados, elimina las interferencias que se pudiesen producir por posible resistencia; además esta terapia se ha convertido en la más popular en la actualidad y es tan efectiva como la que incluye al metronidazol (omeprazol-amoxicilina-metronidazol, la cual tiene un porcentaje de erradicación del 80%) (Triana, 2001).

La mayoría de los individuos se cura tras una o dos semanas de tratamiento, pero es posible que otros necesiten ampliar el tratamiento otras dos semanas. Normalmente, se realiza una prueba de aliento o heces tras completar el tratamiento para garantizar que la bacteria se ha erradicado. Se espera que la erradicación de *H. pylori* evite el cáncer gástrico en el 20-40% de los individuos tratados (Classen, Prinz, & You, 2010).

IV. JUSTIFICACIÓN

H. pylori es una bacteria que infecta el epitelio gástrico humano ocasionando procesos inflamatorios crónicos que se han asociado a gastritis atrófica, adenocarcinoma gástrico y linfoma asociado a mucosas (MALT) y ha sido caracterizado por la OMS como un agente carcinogénico tipo I (Montalvo, *et al*, 2009).

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la infección en los países en vías de desarrollo se adquiere a temprana edad y que permanece en los individuos durante muchos años de su vida. En algunos de los pacientes infectados se desarrollarán síntomas y posibles procesos malignos, aunque no en todos. No están claras las causas del por qué únicamente una pequeña proporción de pacientes desarrolla síntomas y complicaciones, aunque la dieta, hábitos como fumar, consumo de alcohol y otros, pueden estar asociados como cofactores para el desarrollo de las enfermedades (Montalvo, *et al*, 2009).

El diagnóstico de infección por *H. pylori* puede ser establecido mediante diversas técnicas clínicas y de laboratorio, pero adquieren importancia en aquellos que presentan sintomatología o factores de riesgo asociados. Una de las técnicas para la evaluación de pacientes con síntomas es la endoscopia gástrica, mediante la cual se observa la mucosa en búsqueda de alteraciones y se obtiene una biopsia de las áreas sospechosas. Dichas biopsias son teñidas utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) o la Tinción de Giemsa. El estándar de oro según el III consenso de Maastricht es la prueba de ureasa rápida en biopsias gástricas. La detección mejora por el uso de tinciones especiales, como la técnica de Warthin Starry, para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas, la cual se fundamenta en la precipitación de plata metálica (color negro) sobre la bacteria ofreciendo de esta manera un mayor contraste durante la observación al microscopio (Alba, Toledo, & Viana, 2006).

Con la presente investigación se pretende determinar el valor diagnóstico de la tinción de Warthin Starry para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas de pacientes del Hospital General San Juan de Dios, Hospital Roosevelt e Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN), comparándola con la tinción utilizada en cada hospital, que en este caso sería la tinción de Giemsa, con la cual se va a evaluar la identificación de *H. pylori*, el tiempo, la facilidad de procedimiento y los costos entre ambas.

Se comparará con la tinción Giemsa ya que ésta es la que se utiliza en los hospitales nacionales para el diagnóstico de *H. pylori* en histología.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Establecer el valor diagnóstico de la tinción de Warthin Starry para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas.

B. ESPECÍFICOS

1. Establecer la sensibilidad, especificidad y concordancia de la tinción de Warthin Starry comparada con la tinción de Giemsa para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas.
2. Determinar las características de equivalencia entre las tinciones de Warthin Starry y Giemsa incluyendo tiempo, facilidad de procedimiento y costos.

VI. HIPÓTESIS

El valor diagnóstico de la tinción de Warthin Starry es igual que el valor diagnóstico de la tinción Giemsa para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Biopsias gástricas que llegaron al Hospital General San Juan de Dios, Hospital Roosevelt e Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN) durante los meses de enero a diciembre del año 2015 para el diagnóstico de *H. pylori*.

B. Muestra

Se analizaron 150 biopsias gástricas por cada hospital, para un total de 450 biopsias gástricas.

C. Recursos

1. Humanos

1.1. Investigadores

- Br. Iris Daniela Joaquín Velásquez
- Br. Jessica Lorena Salazar Bermúdez
- Mtra. Ana Gabriela Mendoza Castellanos

1.2. Asesor

- MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

1.3. Patólogos:

- Dra. Clara Lizeth Chanquín Alonzo
- Dr. Hessler Morales Mérida
- Dr. Roberto Elsidio Orozco Florián

2. Recursos institucionales

- Servicio de Patología del Hospital General San Juan de Dios
- Servicio de Patología del Hospital Roosevelt
- Unidad de Patología del Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN).

3. Físicos

a. Equipo

- Bandeja para tinción
- Baño maría
- Cronómetro
- Cubeta tipo Hellendahl
- Estufa
- Microscopio
- Pipeta (10-100 mL)
- Soportes para la tinción
- Termómetro

b. Materiales

- Algodón
- Cubeta para tinción
- Erlenmeyer (100-1000 mL)
- Láminas portaobjetos
- Papel absorbente desechable
- Pinzas plásticas o de madera
- Pipetas Pasteur
- Pizeta
- Probeta 10 mL
- Recipientes de plástico
- Varilla de coloración

c. Reactivos

- Ácido acético en solución al 1.2%
- Agua
- Agua destilada
- Alcohol isopropílico al 70%
- Etanol absoluto
- Etanol al 70%
- Etanol al 96%

- Gelatina en Polvo al 100%
- Kit de reactivos Warthin Starry
- Medio de montaje anhidro al 100%
- Mezcla de hidroquinona 42.7%
- Solución amortiguadora al 1.5%
- Solución Giemsa stock 20%
- Solución de nitrato de plata al 6%
- Xilol

D. Métodos

1. Selección de muestras

Se procesaron 450 muestras de biopsias gástricas en el orden que llegaron a cada hospital con las que se trabajó para identificación de *H. pylori* por medio de la tinción de Giemsa y Warthin Starry.

2. Procedimientos

2.1 Tinción Giemsa (Merck™)

- Se colocó el corte de biopsia gástrica en estufa durante 30 minutos a 60°C y se sumergió en xilol durante 12 minutos para desparafinar.
- Se sumergió el corte en etanol absoluto durante 5 min.
- Se sumergió el corte en etanol 96° durante 5 min.
- Se sumergió el corte en etanol 70° durante 5 min.
- Se lavó el corte con agua destilada durante 10 segundos.
- Se sumergió el corte en solución de Giemsa al 20% durante 15 min.
- Se sumergió el corte en ácido acético 0.1% durante 10 segundos.
- Se lavó el corte con agua destilada durante 10 segundos.
- Se sumergió el corte en 2-propanol durante 30 segundos.
- Se agregó xilol al corte de biopsia gástrica durante 10 min.
- Se montaron los cortes con Entellan y cubreobjetos.

2.2 Se realizó la evaluación del corte de biopsia gástrica al microscopio en objetivo 10x y 40x, se observó la bacteria como un bacilo de color azul.

2.3 Tinción Warthin Starry

Se solicitaron cortes diferentes de las mismas biopsias que fueron teñidas con Giemsa y fueron teñidas con la tinción Warthin Starry, para este procedimiento se utilizó el Kit de plateado según Warthin Starry modificado (Merck™) (Anexo 2).

- Se preparó la cubeta del agua acética en la cual se mezclaron cuidadosamente 1 L de agua destilada con 10 mL de ácido acético al 1.2% (solución de almacenamiento, se conservó máximo 3 semanas).
- Se preparó la solución de impregnación: se añadieron 50 mL de agua acética más 10 mL de solución de nitrato de plata al 6% en la cubeta de tinción.
- Se revolvió y colocó tapada la cubeta dentro del baño de agua caliente y se calentó a 60°C.
- Se preparó la solución de revelado/desarrollo añadiendo 60 mL de agua acética al 0.12% más 2 cucharas dosificadoras con gelatina.
- Se colocó la cubeta tapada en el baño de agua caliente, al mismo tiempo que la solución de impregnación revolviendo de vez en cuando. Se esperó hasta que la gelatina estaba completamente disuelta.
- Se preparó la solución de ultimación de los preparados con 2 cucharadas rasas de mezcla de hidroquinona con la cuchara dosificadora.
- Se mezcló bien.
- Se añadieron 3 mL de solución de impregnación caliente con pipeta Pasteur y se mezcló. Importante: Para preparar las soluciones se utilizaron sólo recipientes de vidrio o de plástico limpios. No se pusieron las soluciones en contacto con objetos metálicos.

2.2.1 Procedimiento para la tinción Warthin Starry

- Se colocó el corte de biopsia gástrica en estufa durante 30 min a 60°C y se sumergió en xilol durante 12 minutos para desparafinar.
- Se lavó el corte durante 10 segundos con agua destilada.
- Se tiñó el corte con solución de impregnación durante 30 min a 60°C.
- Se enjuagó con agua del grifo, fuertemente fluyente, durante 3 minutos.

- Se tiñó el corte con la solución de revelado/desarrollo durante 2 minutos a 60°C.
- Se lavó con agua destilada durante 10 segundos a 60°C.
- Se lavó nuevamente con agua destilada durante 2 minutos a 60°C.
- Se sumergió el corte en solución de tiosulfato de sodio durante 3 minutos.
- Se lavó nuevamente con agua destilada durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se desaguó el corte.
- Se sumergió en xilol durante 3 minutos.

2.4 Evaluación de datos

La evaluación microscópica de casos teñidos con Giemsa y Warthin Starry fue realizada por el patólogo encargado del diagnóstico. El observador no tuvo conocimiento de cuáles eran las láminas pares, de tal forma que su criterio diagnóstico no estuvo influenciado por resultados previos. Se utilizó un control positivo con cada corrida.

3. Análisis de Datos

Se llenó un formulario con los resultados de las muestras procesadas (Anexo 3) con el cual se creó una base de datos en el programa Excel que luego se analizó en los programas EpiInfo 7 y MedCalc. Con esta información se creó una tabla 2x2 con la cual se analizaron la sensibilidad, especificidad, concordancia, frecuencias. También se realizó el análisis de tiempo, costo, facilidad de procedimiento y facilidad y tiempo de observación (lo cual se realizó mediante una entrevista a los patólogos participantes).

Se planteó el caso de una prueba dicotómica, en donde se clasificó a cada paciente como positivo o negativo en función del resultado de la prueba. Un resultado positivo se asoció con la presencia del microorganismo y un resultado negativo con la ausencia del mismo. Los datos obtenidos permitieron clasificar a los sujetos en cuatro grupos según una tabla 2x2 como la que se muestra en el Cuadro 2. En ella, se enfrentó el resultado de la prueba diagnóstica (en filas) con el resultado de la prueba por Giemsa. El resultado de la prueba fue correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo). El análisis de su validez se obtuvo calculando los valores de sensibilidad y especificidad (Fernández & Pértegas, 2003).

3.1 Sensibilidad

Cuando los datos obtenidos a partir de una muestra de pacientes se clasifican en una tabla como la que se muestra en el cuadro 2, es fácil estimar a partir de ella la sensibilidad como la proporción de pacientes con presencia de *H. pylori* que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica (Fernández & Pértegas, 2003). Es decir:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} * 100$$

VP = Verdaderos Positivos, FN = Falsos Negativos

3.2 Especificidad

A partir de una tabla como el Cuadro 2, la especificidad se estimaría como:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} * 100$$

VN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos

Cuadro 2. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia *Helicobacter pylori*

Resultado de la prueba Tinción WS	Tinción Giemsa		
	Presencia	Ausencia	Total
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Nota: a = número de pruebas con presencia del microorganismo consideradas como "positivos" por la prueba b = número de pruebas con ausencia del microorganismo consideradas como "positivos" por la prueba. c = número de pruebas con presencia del microorganismo consideradas como "negativos" por la prueba. d = número de pruebas con ausencia del microorganismo considerados como "negativos" por la prueba. Puede apreciarse que cada celda de la tabla refleja una característica que también suele calificarse de la manera siguiente: a = Verdaderos positivos (VP). b = Falsos positivos (FP).c = Falsos negativos (FN).d = Verdaderos negativos (VN) (Fernández & Pértegas, 2003).

3.3 Concordancia

El índice Kappa valora la concordancia que existe entre dos tinciones tomando como base el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Valoración del Índice Kappa según Landis y Koch

Índice Kappa	Concordancia
0.00	Pobre
0.01 - 0.20	Leve
0.21 - 0.40	Aceptable
0.41 - 0.60	Moderada
0.61 - 0.80	Considerable
0.81 - 1.00	Casi perfecta

Fuente: (Cerdal & Villarroel, 2008)

E. Diseño experimental

Se realizó la evaluación pareada y ciega de biopsias gástricas obtenidas por endoscopia teñidas con la tinción Giemsa y la tinción de WS para la identificación de *H. pylori* en el Hospital General San Juan de Dios, Hospital Roosevelt e INCAN.

VIII. RESULTADOS

En este estudio se evaluó la tinción de Warthin Starry comparada con la tinción Giemsa para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas. Se analizaron 450 biopsias en total procedentes de 3 hospitales nacionales, Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN), Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) y Hospital Roosevelt, 150 biopsias de cada uno. De las 450 biopsias, se obtuvieron 199 (44.22%) casos positivos para *H. pylori* y 251 (55.78%) negativos con la tinción Giemsa; se obtuvieron 156 (34.67%) casos positivos y 294 (65.33%) casos negativos con la tinción Warthin Starry (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas del Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN), Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) y Hospital Roosevelt

Resultado	Giemsa		Warthin Starry	
	Casos	%	Casos	%
Positivo	199	44.22	156	34.67
Negativo	251	55.78	294	65.33
Total	450	100.00	450	100.00

Fuente: Datos experimentales

El hospital Roosevelt presentó un mayor porcentaje de casos positivos para ambas tinciones, 72% (108/150) con Giemsa y 62.67% (94/150) con Warthin Starry; el INCAN presentó 32% (48/150) de casos positivos con Giemsa y 22.67% (34/150) con Warthin Starry; el HGSJD presentó 28.67% (43/150) de casos positivos con Giemsa y 18.67% (28/150) con Warthin Starry. Se observa una diferencia de $9.55\% \pm 0.5$ de casos positivos entre ambas tinciones, es procedente realizar un análisis de las diferencias entre cada hospital (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de *H. pylori* en biopsias gástricas distribuidas por hospital (n=450)

Hospital	Resultado	Giemsa		Warthin Starry	
		Número	%	Número	%
INCAN ^a	Positivo	48	32.00	34	22.67
	Negativo	102	68.00	116	77.33
HGSJD ^b	Positivo	43	28.67	28	18.67
	Negativo	107	71.33	122	81.33
Roosevelt	Positivo	108	72.00	94	62.67
	Negativo	42	28.00	56	37.33

^aINCAN: Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S”. ^bHGSJD: Hospital General San Juan de Dios

Fuente: Datos experimentales

Se determinó que la diferencia en la frecuencia de *H. pylori* encontrada con la tinción de Giemsa en el Hospital Roosevelt fue estadísticamente significativa comparándola con el Hospital General San Juan de Dios y el INCAN ($p < 0.0001$), la diferencia en la frecuencia de *H. pylori* en el Hospital General San Juan de Dios y el INCAN no fue estadísticamente significativa ($p > 0.6002$).

Con los datos obtenidos se creó una tabla 2x2, encontrándose 138 casos positivos y 233 casos negativos para *H. pylori* con ambas tinciones, se encontraron 199 casos positivos para *H. pylori* con Giemsa y 156 positivos para *H. pylori* con WS (Tabla 3).

Tabla 3. Tabla 2x2 entre la tinción Giemsa y Warthin Starry (n=450)

Tinción	Giemsa			Total
	+	-		
Warthin	+	138	18	156
Starry	-	61	233	294
Total		199	251	450

Fuente: Datos experimentales

De acuerdo con la tabla 2x2, se determinó la sensibilidad, especificidad y concordancia de la tinción Warthin Starry, obteniéndose una sensibilidad de 69.34% (IC_{95%} 62.43-75.67), especificidad de 92.82% (IC_{95%} 88.90-95.69). Se determinó el índice Kappa de concordancia entre las dos tinciones, obteniéndose un 0.64 (IC_{95%} 0.56-0.70). Con base al valor de este índice se considera que la concordancia es considerable (Tabla 4).

Tabla 4. Sensibilidad, especificidad y concordancia de la tinción Warthin Starry para el diagnóstico de *H. pylori* en biopsias gástricas comparada con la tinción Giemsa (n=450)

	Tinción Warthin Starry	IC 95%^a
Sensibilidad	69.34	62.43-75.67
Especificidad	92.82	88.90-95.69
Kappa	0.64	0.565-0.707

^aIC95%: Intervalo de confianza al 95%

Fuente: Datos experimentales

Las características de equivalencia entre ambas tinciones (tiempo y facilidad de procedimiento, tiempo y facilidad de observación y costo) fueron establecidas en una entrevista con los patólogos participantes, estableciéndose que la tinción Giemsa requiere menos tiempo de procedimiento (30 minutos) pero más tiempo para su observación (5 minutos). Es un procedimiento fácil y su observación es moderadamente difícil en comparación con la tinción Warthin Starry que posee un mayor tiempo de procedimiento (80 minutos), un menor tiempo de observación (3 minutos), un procedimiento más difícil y es más fácil su observación. El costo de cada tinción difiere en Q 4.16, la tinción de Giemsa siendo la tinción de menor costo (Tabla 5).

Tabla 5. Características de equivalencia de la tinción Warthin Starry comparada con la tinción Giemsa

Característica	Parámetro	Giemsa	Warthin Starry
Procedimiento	Tiempo (min)	30	80
	Facilidad	Fácil	Moderadamente difícil
Observación	Tiempo (min)	5	3
	Facilidad	Moderadamente difícil	Fácil
Costo por corte de biopsia		Q 0.30	Q 4.46

Fuente: Datos experimentales

El diagnóstico de cada biopsia fue emitido por el patólogo de cada hospital, relacionándolo con la presencia de *H. pylori*, encontrándose que el 69.56% (313/450) de los casos se diagnosticaron con gastritis crónica y de esos casos 127 (40.58%) presentaron *H. pylori* con la tinción Giemsa; un 16.22% (73/450) se diagnosticaron con gastritis crónica folicular y de esos casos 55 (75.34%) presentaron *H. pylori*; un 5.78% (26/450) se diagnosticaron con gastritis crónica atrófica folicular y de esos casos 8 (30.77%) presentaron *H. pylori*; un 1.78% (8/450) se diagnosticaron con

adenocarcinoma y 1 (12.50%) presentó *H. pylori*; un 6.44% (29/450) se diagnosticaron como otros, entre los cuales se incluye gastritis crónica erosiva, carcinoma diferenciado, pólipos hiperplásicos y casos sin anomalías histológicas, de esos casos 8 (27.59%) presentaron *H. pylori* (Tabla 6).

Tabla 6. Diagnóstico y presencia de *H. pylori* en biopsias gástricas del Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN), Hospital General San Juan de Dios y Hospital Roosevelt (n=450)

Diagnóstico	Casos	%	<i>H. pylori</i> (Giemsa)	
			Positivo	%
Gastritis aguda	1	0.22	0	0.00
Adenocarcinoma	8	1.78	1	12.50
Gastritis crónica atrófica folicular	26	5.78	8	30.77
Otros	29	6.44	8	27.59
Gastritis crónica folicular	73	16.22	55	75.34
Gastritis crónica	313	69.56	127	40.58
Total	450	100.00	207	46.00

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN

En el presente estudio se compararon dos métodos de tinciones histológicas con el objetivo de determinar el valor diagnóstico de la tinción Warthin Starry para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas. La proporción de casos detectados de *H. pylori* en el grupo de 450 biopsias fue mayor cuando se utilizó la tinción Giemsa, que la tinción de Warthin Starry (Tabla 1). Esta proporción también se observa en cada una de las tres instituciones evaluadas (Tabla 2). Estos hallazgos sugieren que habría un sobrediagnóstico al usar solamente la tinción de Giemsa.

Esta proporción mayor para Giemsa, también coincide con otros estudios; como el de Montealegre, en el cual al comparar la detección de *H. pylori* a través de la identificación del bacilo con la detección molecular a través de la amplificación de un fragmento del gen 16S ADNr especie-específico, se observan algunas discrepancias en cuanto a que en 12 pacientes se detectó la presencia del bacilo por medio de la tinción histológica de Giemsa pero el resultado de la amplificación del gen 16S ADNr fue negativo. El índice kappa entre estas dos pruebas fue de 0.41 lo cual indica una concordancia considerable. Otros estudios también han reportado mediante tinción histológica la presencia de bacilos en muestras con resultados negativos de la RPC específica de *H. pylori* (Montealegre, *et al*, 2010).

Otro estudio realizado por Arteta, indica que la tinción Giemsa ha demostrado ser un buen método para la identificación de la bacteria, ya que es la tinción que todos los patólogos aprenden durante su entrenamiento. Aún así, es posible que detritus de material mucoso u otros artificios en la biopsia lleven a problemas de interpretación que generan, la mayoría de la veces, falsos positivos y, ocasionalmente, falsos negativos (Arteta, Giraldo, & Arias, 2006). En el caso de presentarse un diagnóstico falso positivo, pueden desencadenarse una serie de factores perjudiciales para el paciente, como: iniciar un tratamiento innecesario, el cual utiliza una combinación de inhibidor de la bomba de protones (omeprazol 20 mg, 30 mg de lansoprazol, Pantoprazol 40 mg), 500 mg de amoxicilina y claritromicina 1.0 g, Ranitidina-citrato de bismuto 400 mg, dos veces al día durante 7 a 14 días (el tratamiento varía según la pauta erradicadora que utilice el médico tratante) (Vaz, 2000). La complejidad del tratamiento puede llevar a la aparición de efectos adversos ya que está bien documentado que los imidazoles son la

medicación peor tolerada (López, Domingo, Sánchez, & Alarcón, 1997). Además de esto se debe mencionar el costo del tratamiento, lo cual afecta la economía del paciente.

En 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 (Marin, 1996). Pero, aparte de tener ventajas, también posee desventajas como su costo, el tiempo requerido para llevar a cabo la técnica (Tabla 5), la precipitación excesiva de la plata y la decoloración (Marin, 1996). Ello hace que no se realice como técnica de rutina reservándose para aquellos casos en que existen dudas diagnósticas (Martínez & González, 2002).

Lo expuesto en el párrafo previo coincide con la sensibilidad y especificidad (69.34, 92.82 respectivamente) que presentó la tinción de Warthin Starry en el presente estudio, lo que induce a considerar la utilización de esta tinción como prueba confirmatoria para el diagnóstico de *H. pylori*, ya que se puede utilizar en biopsias gástricas que no contengan mucha muestra o cuyo diagnóstico sea difícil, evitando así los resultados falsos positivos.

Este estudio también indica que el hospital Roosevelt presentó un mayor porcentaje de casos positivos para ambas tinciones (72% con Giemsa y 62.67% con Warthin Starry); el INCAN presentó 32% de casos positivos con Giemsa y 22.67% con Warthin Starry; el HGSJD presentó 28.67% de casos positivos con Giemsa y 18.67% con Warthin Starry, observándose una diferencia de $9.55\% \pm 0.5$ de casos positivos entre ambas tinciones (Tabla 2). Debe considerarse que estos resultados presentan una variabilidad entre ambos hospitales debido a que la identificación histológica de esta bacteria por sus características morfológicas depende en gran parte del observador ya que existe una serie de factores que influyen en la habilidad del observador para la identificación de *H. pylori*, entre éstos están: la densidad bacteriana, el entusiasmo-experiencia del patólogo y los criterios utilizados para su identificación (Arévalo, Rosales, & Ortiz, 2007).

Al momento de comparar las frecuencias de *H. pylori* entre cada hospital con la tinción Giemsa, se encontró que la relación entre Hospital Roosevelt fue estadísticamente significativa al compararla con el Hospital General San Juan de Dios y el INCAN ($p < 0.0001$), pero al hacer la comparación entre el Hospital General San Juan de Dios y el INCAN, la relación no fue estadísticamente significativa ($p > 0.6002$). No

se sabe el por qué existe esta diferencia pero si se puede deducir que en el Hospital Roosevelt se diagnosticaron a pacientes como positivos para *H. pylori* cuando realmente no la tenían, lo que implica que obliguen al paciente a iniciar con el tratamiento para erradicar la bacteria o como se mencionó antes, que depende de la experiencia del patólogo que hizo los diagnósticos, ya que la experiencia del patólogo en su quehacer permite que la reproducibilidad del diagnóstico sea alta (Arévalo, Rosales, & Ortiz, 2007).

A diferencia de otros estudios, el presente realiza una comparación entre dos técnicas histológicas, obteniendo un índice kappa que indica una concordancia considerable entre ambas tinciones con un valor de 0.64 (Tabla 4).

A este estudio también podría agregarse otra técnica diagnóstica, como han realizado en el estudio publicado por Osorio, en el cual además de realizar la comparación de dos tinciones, utilizan la prueba de la ureasa rápida, donde se menciona que es conveniente planificar el empleo de otro método que complemente al histológico lo que mejora la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (Osorio, *et al*, 2009). Otros métodos podrían ser: pruebas serológicas, identificación de antígenos de *H. pylori* en heces, prueba de aliento con urea marcada con C isotópico, cultivo, entre otros (Pajares, 2002).

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 (Marin, 1996).

Por otro lado al analizar la frecuencia de pacientes con *H. pylori* positivo y su relación con el diagnóstico de la mucosa gástrica, los resultados reflejan que, en la mayoría de los casos con gastritis crónica folicular, se detectó el mayor porcentaje para *H. pylori* (75.34%) (Tabla 6). Este dato concuerda con estudios internacionales como el de Martínez, en el que realizan un análisis de 1,850 pacientes adultos determinando la presencia de *H. pylori* por la prueba de ureasa rápida y por histología, estudio en el cual se encontró un OR 28.94 (IC 95% 7.72-243.2) el cual es estadísticamente significativo,

lo que indica una muy fuerte asociación entre la infección por *H. pylori* y la presencia de la enfermedad gastritis crónica folicular (Martínez & Heano, 2009).

X. CONCLUSIONES

1. La tinción Warthin Starry presenta una sensibilidad de 69.34% (IC_{95%} 62.43-75.67), una especificidad de 92.82% (IC_{95%} 88.90-95.69), y una concordancia considerable (Kappa = 0.64) respecto a la tinción de Giemsa.
2. La tinción Giemsa en comparación con la tinción Warthin Starry, es un procedimiento más sencillo y fácil de realizar, su costo es menor, sin embargo lleva más tiempo para la identificación de *H. pylori* que la tinción de Warthin Starry.
3. Se detectaron un total de 207 (46%) casos positivos para *H. pylori*, encontrándose con mayor frecuencia en casos de gastritis crónica folicular (75.3%) y gastritis crónica (40.6%).
4. El diagnóstico patológico más frecuente fue el de gastritis crónica encontrando en 313 casos (69.6%).
5. Con base en la sensibilidad, especificidad, concordancia y características de equivalencia determinadas en este estudio, se establece que el valor diagnóstico para *H. pylori* de la tinción Giemsa es superior al valor diagnóstico de la tinción Warthin Starry, para la evaluación de *H. pylori*, por lo que se rechaza la hipótesis planteada para este estudio.

XI. RECOMENDACIONES

1. La confirmación de la presencia de *H. pylori* no debe estar ceñida a una sola técnica diagnóstica, por lo que es recomendable la integración de otras técnicas para mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico para *H. pylori*.
2. Para dar un mejor diagnóstico sobre la infección de *H. pylori* se debe tomar en cuenta el número de microorganismos necesarios para detectar la infección a través de cruces, indicando si se evidencia una cantidad leve (+), moderada (++) o abundante (+++) de la bacteria en una muestra de biopsia gástrica.
3. Tener en cuenta que la tinción Warthin Starry debe ser realizada por una persona experta en el campo de tinciones ya que requiere mucho cuidado porque se puede dar una precipitación excesiva de la plata o las muestras se decoloran demasiado lo que puede provocar falsos positivos o falsos negativos.
4. Se recomienda que en Guatemala se realicen más estudios sobre el diagnóstico de *H. pylori* ya que ésta ha sido clasificada como un carcinógeno de clase I por la Organización Mundial de la Salud, debido a que esta bacteria coloniza la mucosa gástrica e induce una respuesta inflamatoria persistente.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba, R., Toledo, R., & Viana, M. (2006). *Helicobacter pylori*: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*(158), 9-12.
- Amores, J., Arredondo, A., Martínez, B., Estrada, Y., Pereira, L., & Potente, A. (2010). Correlación histológica-microbiológica en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 57, 135-142.
- Araujo, R., Pinto, J., Ramírez, D., Cok, J., & Bussalleu, A. (2005). Nuevo esquema ultracorto para erradicar la infección por *Helicobacter pylori* utilizando tetraciclina, furazolidona y subcitrate de bismuto coloidal en pacientes dispépticos con o sin úlcera péptica en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 25, 23-41.
- Arévalo, M., Rosales, D., & Ortiz, L. (2007). Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Médica de la Extensión Portuguesa - ULA*, 1(2), 99-105.
- Arteta, A., Giraldo, R., & Arias, L. (2006). Variabilidad entre patólogos en el diagnóstico histológico de la infección por *Helicobacter pylori*: un diagnóstico subjetivo? *Iatreia*, 19(3), 229-235.
- Bermúdez, L., Torres, L., & Rodríguez, B. (2008). Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 48(1), 5-10. Recuperado el 2014 de Enero de 2014, de http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol48_1_09/med07109.htm
- Blancas, J. (2004). La importancia del diagnóstico del *H. pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 69(3), 186-187.
- Calderón, O., & Badani, O. (2013). *Enfermedad Ulcero Péptica y Helicobacter pylori*. (G. Villa, Ed.) Bolivia: Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de la Paz.
- Camorlinga, M., Cavazza, M., Correnti, M., Lecuna, V., Muñoz, L., Perrone, M., & Torres, J. (2005). Importancia de la respuesta humoral de IgG anti-CagA de

- Helicobacter pylori* en pacientes venezolanos con enfermedades de las vías digestivas superiores. *Revista de Investigación clínica*, 46(4), 357-367.
- Castro, M., Sánchez, D., García, E., Miralles, J., & Vargas, J. (2004). Diagnosis of *H. pylori* infection in patients with bleeding ulcerating disease: rapid urease test and histology. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96(6), 398-401.
- Cerdal, J., & Villarroel, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: coeficiente de kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1): 54-58.
- Classen, M., Prinz, C., & You, W. (2010). *Helicobacter pylori*: una bacteria que puede provocar cáncer de estómago. *UICC*, 38-42.
- Fernández, S., & Pértegas, S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y Especificidad. *Cuadernos de atención primaria*(10), 120-124. Recuperado el 12 de Noviembre de 2013, de http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp
- Fochesatto, N., Guayán, V., Morán, E., & Vizcaíno, A. (2004). *H. pylori* y enfermedad gastroduodenal. Bases para el diagnóstico y tratamiento. *Revista de Postgrado de la VIa. Cátedra de Medicina*(158), 11-17.
- Gisbert, J., Calvet, X., Bermejo, F., Boixeda, D., Bory, F., Bujanda, L., . . . Sánchez, J. (2013). III Conferencia española de consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología y Hepatología*, 36(5), 340-374.
- Jaime, C., & Villarroel, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica:coeficiente de kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54-58.
- López, M., Domingo, D., Sánchez, I., & Alarcón, T. (1997). Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Española de Quimioterapia*, 10(2), 132-145.

- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., Elomar, E., & Garham, D. (2006). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- The Maastricht III consensus report. *Gut*, 56(6), 772.
- Marín, R. (1996). Identificación histológica de *Helicobacter pylori* por los métodos de tinción de Warthin-Starry y Giménez en biopsias gástricas. *Médica de Costa Rica*, LIII, 147-151.
- Martín, C., Boixeda, D., Cantón, R., Mir, N., de Rafael, L., Gisbert, J., . . . García, A. (10 de Enero de 1996). *Helicobacter pylori* infection in a healthy population in Spain. *Revista Europea de Gastroenterología y Hepatología*, 8(12), 1165-1168.
- Martínez, J., & Heano, S. (2009). Hiperplasia linfoide folicular gástrica e infección por *Helicobacter pylori* en adultos colombianos. *Colombiana de Gastroenterología*, 24(2), 148-156.
- Martínez, L., & González, M. (2002). *Infomed, Red de Salud de Cuba*. Obtenido de <http://www.sld.cu/print.php?idv=18247>
- Merck. (2014). *Merck Millipore*. Recuperado el 15 de Mayo de 2013, de http://www.merckmillipore.com.gt/pharmaceutical-ingredients/warthin-starry-%20silver-plating/spanish/c_Deeb.s1OGvUAAAEdqRF38wsE
- Moncayo, J., Álvarez, A., Santacruz, J., Santacoloma, M., Arturo, B., Giraldo, L., & Ángel, A. (2011). Evaluación de diferentes pruebas para el diagnóstico de *H. pylori*. *Revista de Investigaciones Andina*, 13(23), 297-310.
- Montalvo, C. (Agosto de 2010). *Técnica Histológica*. Recuperado el 08 de Enero de 2014, de Facultad de Medicina UNAM: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
- Montalvo, E., Montalvo, C., Ortega, L., Pena, J., Valdés, A., Martínez, A., . . . Bernal, F. (2009). *Helicobacter pylori*, patología gástrica y cirugía. Descubrimiento que mereció el Premio Nobel en Medicina 2005. *Cirujano General*, 31(2), 115-124.
- Montealegre, M., Jaramillo, C., Montealegre, G., Parra, G., Echeverry, M., & Delgado, M. (2010). Detección histológica y molecular de *Helicobacter pylori* y

genotipificación con base en los genes de virulencia babA2 e iceA en paciente con patología gástrica benigna. *Chilena de infectología*(2), 112-118.

Murra, J. (s.f.). *Helicobacter pylori*, *Atlas de Video Endoscopía Gastrointestinal de El Salvador*. Recuperado el 8 de Enero de 2014, de http://www.gastrointestinalatlas.com/Espanol/Estomago/Gastritis/Helicobacter_Piloris/helicobacter_piloris.html

Olivares, D., & Gisbert, J. (2006). Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(5), 374-386.

Organización Mundial de Gastroenterología. (Agosto de 2010). *Helicobacter pylori en los países en desarrollo*. Recuperado el 24 de Enero de 2014, de Worldgastroenterology: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/helicobacter_pylori_en_los_paises_desarrollo.pdf

Ortiz, M., Salazar, O., Brito, O., Abundis, L., García, C., Gutiérrez, S., & Jacobo, A. (2005). Detección de *Helicobacter pylori* en niños con los métodos de Gram, Giemsa y Warthing-Starry, inicialmente negativos con otras técnicas histológicas. *Revista de Gastroenterología*, 70(2), 143-145.

Osorio, M., Olivert, M., Pasos, J., Quiñónez, A., Galindo, M., & Ortega, A. (2009). Caracterización de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera gástrica. *Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos*, 7(6), 897-902.

Pajares, J. (2002). Infección por *Helicobacter pylori*. *Clínica Española*, 202(2), 99-110.

Panreac Química S.L.U. (2011). *Tinción Hematoxilina-Eosina*. Recuperado el 05 de diciembre de 2013, de <http://www.panreac.es/pdf/pdf01/Tincion-Hematoxilina-Eosina.pdf>

Peña, D. (2008). Frecuencia e incidencia del cáncer gástrico asociado a *H. pylori* en el instituto de gastroenterología boliviano-japonés, La Paz. *Tesis de licenciatura no publicada*. La Paz, Bolivia.

- Posada, L., Robles, A., & Orozco, M. (2010). Detección de anticuerpos IgG contra *Helicobacter pylori* en personas a riesgo. *Tesis de licenciatura no publicada*. Guatemala, Guatemala.
- Ramírez, A., & Sánchez, R. (2008). *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Revista de Gastroenterología de Perú*, 28(3), 258-266.
- Roblejo, Y., Samada, M., González, C., Sabatier, C., Martínez, M., Marrero, A., . . . Rodríguez, B. (2005). Comparación de métodos en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con desórdenes gastroduodenales. *CENIC*, 36(3), 191-197.
- Rodríguez, M., Giachetto, G., Cuneo, A., Gutiérrez, M., & Shimchack, M. P. (2009). Enfermedad por arañazo de gato con compromiso óseo: Una forma atípica de presentación clínica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(4), 363-369.
- Salas, W., Benites, M., & Salinas, C. (2005). Asociación de *Helicobacter pylori* y patología gástrica no neoplásica en una clínica privada de Lima Norte. *Revista Médica Herediana*, 16(2), 89-99.
- Schneider, R., Vettorazzi, M., Torres, M., Solis, C., Marroquín, S., Morales, H., & Rodríguez, E. (1994). La infección gástrica por *H. pylori* en adultos dispépticos de Guatemala. Su relación con el estado socioeconómico y cambios displásicos gástricos. *Revista de Medicina Interna*, 5(1), 2-9.
- Schwizer, W., Thumshirn, M., Dent, J., Guldenschuh, I., Menne, D., Cathomas, G., & Fried, M. (2001). *Helicobacter pylori* and symptomatic relapse of gastro-oesophageal reflux disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 357(9270), 1738-1742.
- Triana, M. (2001). *H. pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 15(1), 42-52.
- Vallejos, C., Enríquez, M., López, M., Valdez, J., & Pérez, K. (2009). *Helicobacter pylori* en pacientes de la tercera edad atendidos en un hospital de Puebla. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(3), 131-134.

Vaz, L. (2000). Consenso Nacional Latinoamericano sobre *Helicobacter pylori*.
Gastroenterología Brasil, 6(2), 127-139.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos

1. COLORACIÓN GIEMSA

1.1. Solución Giemsa stock

Colorante Giemsa en polvo, certificado	0.75 g
Metanol puro (sin acetona).....	65 mL
Glicerina pura.....	35 mL

En un frasco ámbar que contiene perlas de vidrio, mezclar los reactivos agitándolos vigorosamente varias veces al día. Generalmente el colorante está listo al tercer día cuando, en el ensayo de tinción, los parásitos muestran los colores apropiados. Filtrar la solución Giemsa stock con papel de filtro y conservarla en frasco oscuro a temperatura ambiente.

1.2. Solución diluyente (agua amortiguada)

Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)	4.0 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	5.0 g

Mezclar las sales a homogeneidad.

Diluir un gramo de la mezcla de sales en un litro de agua destilada.

El rango de pH apropiado oscila entre 6.6 y 7.2.

1.3. Solución Giemsa diluida

Colorante Giemsa stock.....	0.10 mL
Solución diluyente	0.90 mL

Otra forma de preparar la solución Giemsa diluida es agregando dos gotas de Solución Giemsa stock por cada mililitro de solución diluyente (Merck, 2011).

Anexo 2. Inserto kit de plateado según Warthin Starry modificado

1.02414.0001

Microscopia

Kit de plateado según Warthin-Starry modificado

para la detección de *Helicobacter pylori* en cortes parafinicos

IVD Producto sanitario para diagnóstico in vitro



Empleo previsto

El kit de plateado según Warthin-Starry está destinado a la detección histológica de *Helicobacter pylori* en muestras de tejidos mediante microscopia óptica.

Principio del método

En el plateado según Warthin-Starry el nitrato de plata se reduce a plata metálica mediante hidroquinona, oxidándose entonces la hidroquinona a quinona.

La solución reactiva está elegida de tal manera que la plata metálica se adiciona en una reacción específica a las estructuras destinatarias, aquí *Helicobacter pylori*. La reacción es parada mediante un paso de lavado, que termina el desarrollo de la plata.

La plata se adiciona a la superficie de las bacterias, las bacterias aparecen de pardo oscuro a negro en la imagen microscópica, las células se presentan de amarillo a amarillo dorado, los núcleos son pardos. Las bacterias se encuentran en las mucosas del epitelio superficial, en las glándulas gástricas apicales y en las fositas de la mucosa gástrica.

Mediante otro paso con solución de tiosulfato sódico la plata formada es fijada y estabilizada adicionalmente. Si se emplea tiosulfato sódico puede montarse a continuación con cualquier medio de montaje que contenga xileno.

Si se prescindiera de este baño de tinción adicional, los preparados deben montarse con DPX o Neo-Mount®, para evitar la decoloración.

Material

Muestras de tejidos fijadas con formalina tamponada neutra.
Cortes parafinicos de 3-5 µm de espesor

Reactivos suministrados

Componentes en el kit de plateado según Warthin-Starry modificado
Nro.art. 1.02414.0001

Reactivo 1: Solución de nitrato de plata 6%	500 ml
Reactivo 2: Mezcla de hidroquinona	2 x 14 g
Reactivo 3: Gelatina en polvo	130 g
Reactivo 4: Ácido acético en solución al 1,2%	60 ml

Nota: El contenido del reactivo 2 y reactivo 4 no corresponde al consumo real, un resto permanece siempre como reserva en el envase.

Reactivos necesarios adicionalmente

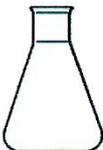
Nro. art. 101979 DPX 500 ml
Medio de montaje anhidro
(Para el empleo sin solución de tiosulfato sódico)

o *alternativamente*

Nro. art. 109147 Sodio tiosulfato en solución 1 l
(Para montar con otros medios de montaje que contengan xileno)

Preparativos

El empleo tiene lugar en la cubeta de tinción. El kit está preparado para un volumen de 60 ml, que corresponde a una cubeta tipo Hellendahl. Calentar el baño de agua a 60°C.

	<p>1. Preparación del agua acética Mezclar cuidadosamente 1 l de agua destilada con 10 ml de ácido acético al 1,2% (solución de almacenamiento, se conserva máximo 3 semanas)</p>
---	--

 60°C	<p>2. Solución de impregnación: Añadir 50 ml de agua acética + 10 ml de solución de nitrato de plata al 6%, revolver y colocar tapado en el baño de agua caliente y calentar a 60°C. Control de la temperatura (solución lista para el uso). Importante: no usar objetos metálicos</p>
 60°C	<p>3. Solución de revelado/desarrollo A) Preparativos: Añadir 60 ml de agua acética + 2 cucharas dosificadoras de color anaranjado con gelatina y colocar tapado en el baño de agua caliente, al mismo tiempo que la solución de impregnación revolviendo de vez en cuando. La gelatina tiene que estar completamente disuelta. Otras adiciones no tienen lugar hasta poco antes de introducir los cortes en esta solución. (ver Ultimación de los preparados) B) Ultimación de los preparados: Adición de 2 cucharadas rasas de mezcla de hidroquinona con la cuchara dosificadora de color naranja (en la tapa), revolver bien. Añadir 3 ml de solución de impregnación caliente con la pipeta adjunta, mezclar bien. Nota: Los cortes deben introducirse inmediatamente en la solución de revelado/desarrollo ahora lista para el uso.</p>
 60°C	<p>4. Agua destilada Enjuagar 2 veces</p>

Importante: Para preparar las soluciones usar sólo recipientes de vidrio o de plástico limpios. No poner las soluciones en contacto con objetos metálicos (p. ej. soportes de portaobjetos o pinzas).

Advertencia: Las soluciones de trabajo (solución de impregnación y solución de desarrollo/revelado) se utilizan solamente para un solo uso y se eliminan correspondientemente después de usarlas.

Técnica operatoria

Sin solución de tiosulfato de sodio

Tiempo	Temperatura	Paso
		Desparafinar en forma típica los cortes y rehidratar.
10 segundos		Agua destilada
30 min	60°C	Solución de impregnación
3 min		Enjuagar bien en agua fuertemente fluyente del grifo
2-3 min	60°C	Solución de revelado/desarrollo (ver Ultimación)
10 segundos	60°C	Agua destilada
2 min	60°C	Agua destilada
		Desaguar y clarificar de forma típica los cortes con xileno o Neo-Clear®
		Montar con DPX los preparados humedecidos con xileno, o con Neo-Mount® los preparados humedecidos con Neo-Clear®, y colocar cubreobjetos.

Resultado

Helicobacter pylori pardo oscuro a negro
Fondo amarillo a amarillo dorado

Con solución de tiosulfato de sodio

Tiempo	Temperatura	Paso
		Desparafinar en forma típica los cortes y rehidratar.
10 segundos		Agua destilada
30 min	60°C	Solución de impregnación
3 min		Enjuagar en agua fuertemente fluyente del grifo
2-3 min	60°C	Solución de desarrollo (ver Ultimación)

10 segundos	60°C	Agua destilada
2 min	60°C	Agua destilada
3 min		Solución de tiosulfato sódico
10 segundos		Agua destilada
		Desaguar y clarificar de forma típica los cortes con xileno
		Montar con Entellan® Nuevo los preparados humedecidos con xileno y colocar cubreobjetos.

Resultado

Helicobacter pylori pardo oscuro a negro
Fondo pardusco

Detección de errores

Ya que las técnicas de plateado son una de las "tinciones especiales" más difíciles en histología, esta técnica requiere especial cuidado en la técnica operatoria. Hay que tener en cuenta los siguientes puntos en caso de resultado no satisfactorio:

Imagen microscópica	Posible causa	Remedio
Fondo no limpio	Enjuague insuficiente tras la solución de impregnación	Intensificar el enjuague con agua fluyente del grifo
Decoloración lenta de los preparados	Medio de montaje inadecuado	Empleo de DPX o solución de tiosulfato sódico (ver descripción)
Tinción demasiado fuerte de los preparados	Tiempo de incubación de la solución de revelado/desarrollo demasiado prolongado	Tener en cuenta el tiempo prescrito
Tinción demasiado débil	Temperatura de los reactivos demasiado baja	Comprobación directa de la temperatura de los reactivos (la indicación del baño de agua frecuentemente no es suficiente)

Nota técnica

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico. Seguir las indicaciones de empleo del fijador. Deben seguirse las indicaciones de empleo del procesamiento histológico y las instrucciones de empleo del fabricante del aparato y del software. Para el baño de agua deben tenerse en cuenta las instrucciones de empleo del fabricante del aparato.

Preparación de las muestras

Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con el estado de la tecnología. Todas las muestras deben estar rotuladas inequívocamente. Deben usarse instrumentos adecuados para la toma de muestras y en la preparación, y deben seguirse las instrucciones del fabricante para la aplicación/el empleo.

Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas. Cada aplicación debería implicar controles adecuados para descartar resultados erróneos. Deberán emplearse las nomenclaturas vigentes. Deberán elegirse y realizarse ensayos ulteriores según métodos reconocidos.

Almacenamiento

El kit de plateado debe almacenarse entre +15°C y +25°C. Las soluciones pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada.

Estabilidad

Después de abrir el frasco por primera vez, el contenido almacenado entre +15°C y +25°C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada. Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

Capacidad

El kit es suficiente para hasta 500 preparaciones.

Notas sobre el empleo

Para evitar errores, la técnica de plateado debería ser realizada por personal especializado. Solamente para uso profesional. Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad. Deben emplearse microscopios equipados de acuerdo con el estándar.

Protección contra infecciones

Debe observarse a toda costa una protección eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de laboratorio.

Indicaciones para la eliminación de residuos

Las soluciones usadas y las soluciones caducadas han de ser eliminadas como basura peligrosa, respetándose las prescripciones locales de eliminación. Si se presentan más preguntas acerca de la eliminación, éstas podrán ser tramitadas a través de E-Mail: retrologistik@merck.de. Dentro de la UE tienen validez las prescripciones basadas en la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje e etiquetado de sustancias peligrosas, en la correspondiente versión vigente.

Reactivos auxiliares

Nro. art. 107961	Entellan® Nuevo Medio de montaje anhidro	100 ml, 500 ml
Nro. art. 107960	Entellan® Medio de montaje anhidro	500 ml
Nro. art. 108681	Xileno para análisis EMSURE®, ACS, ISO, Reag. Ph Eur	1 l, 2,5 l
Nro. art. 109843	Neo-Clear® (sustituto de Xileno) para microscopía	5 l
Nro. art. 109016	Neo-Mount® medio de montaje anhidro tras la aplicación de Neo-Clear®	500 ml

Clasificación de sustancias peligrosas

Merck nro. art. 102414

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta y las indicaciones en la ficha de datos de seguridad. La ficha de datos de seguridad de Merck está disponible en Internet y a solicitud.

Componentes principales de los productos

Nro. art. 102414

Reactivo 1 AgNO ₃ 1 l = 1,05 kg	60 g/l
Reactivo 2 C ₆ H ₆ O ₂	42,7% en peso
Reactivo 3 Gelatina	100,0% en peso
Reactivo 4 C ₂ H ₄ O ₂ 1 l = 1,0 kg	-12,6 g/l

Status: Febrero 2011
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany.
Tel: +49 (0)6151 72-2440
www.merck-chemicals.com/microscopy



Anexo 4. Fotografías



Fotografía 1. Rehidratación de las muestras que fueron desparafinadas usando xilol y etanol en diferentes concentraciones.



Fotografía 2. Láminas con las muestras de biopsias ya hidratadas listas para empezar la tinción.

Fase de impregnación



Fotografía 3. Preparación de la solución de impregnación.



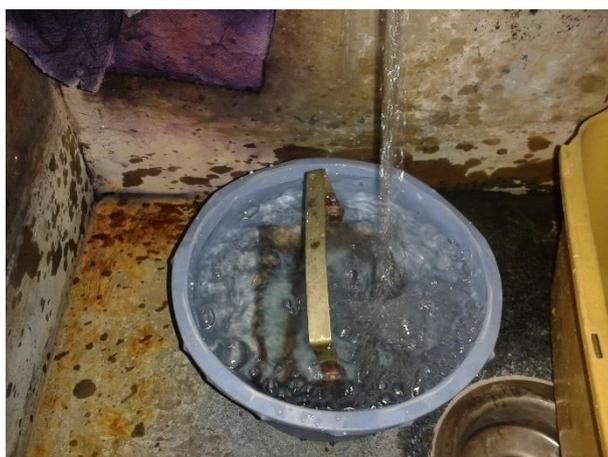
Fotografía 4. Adición de la solución de impregnación en la cubeta de tinción.



Fotografía 5. Colocación de las muestras en la cubeta con la solución de impregnación para luego incubarlas.



Fotografía 6. Cubeta con las muestras en solución de impregnación ya incubadas.



Fotografía 7. Lavado de las muestras con agua del grifo para quitar el exceso de la solución de impregnación.

Fase de revelado y desarrollo



Fotografía 8. Preparación de la solución de revelado: esta cubeta contiene agua acética y gelatina en polvo.



Fotografía 9. En esta cubeta ya se deshizo la gelatina debido a que se colocó en baño maría.



Fotografía 10. Adición de la mezcla de hidroquinona a la solución de revelado.



Fotografía 11. Adición de la solución de nitrato de plata a la solución de revelado.



Fotografía 12. Colocación de las muestras en la solución de revelado.

Fase de fijación



Fotografía 13. Muestras en solución de tiosulfato de sódico.

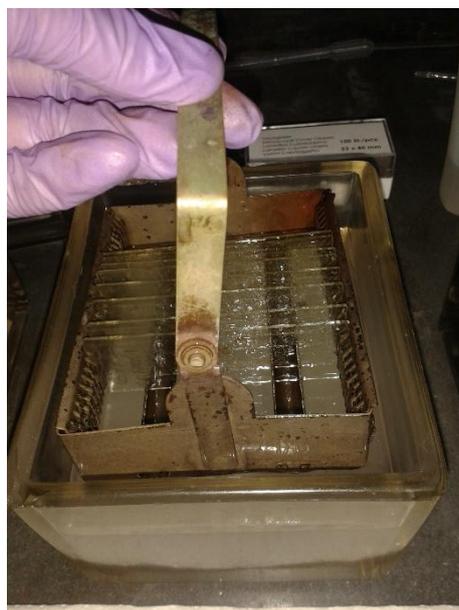


Fotografía 14. Muestras teñidas listas para deshidratar.

Fase de preparación de deshidratación de las muestras



Fotografía 15. Deshidratación de las muestras.



Fotografía 16. Muestras ya deshidratadas listas para ser montadas con Entellan.

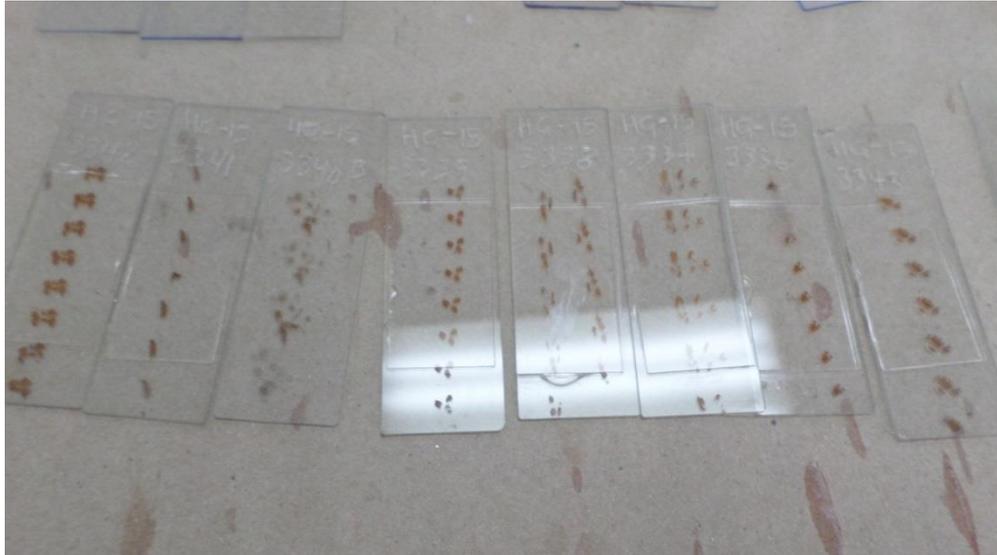
Fase de montaje de las muestras para ser vistas en el microscopio



Fotografía 17. Montaje de las muestras.



Fotografía 18. Muestras montadas.



Fotografía 19. Muestras ya listas para ser vistas al microscopio.

Br. Iris Daniela Joaquín Velásquez

Autora

Br. Jessica Lorena Salazar Bermúdez

Autora

Mtra. Ana Gabriela Mendoza Castellanos

Autora

MSc. Gerardo Arroyo Catalán

Asesor

M.A. Keila Mariana Guerrero Gutiérrez

Revisora

MSc. Alba Marina Valdés de García

Directora de Escuela

PhD. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano