

Instituto de Gastroenterología

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE *HELICOBACTER PYLORI* MEDIANTE CITOLOGÍA GÁSTRICA POR CEPILLADO

Lic. Sara Mandado Pérez,¹ Dr. Bienvenido Gra Oramas,² Dr. Miguel González Carvajal,³ Dr. Manuel Paniagua Estévez,⁴ Dr. Felipe Piñol Nery⁵ y Dr. Carlos Domínguez Álvarez⁶

RESUMEN

Se conoce que en Cuba la citología gástrica por cepillado no había sido utilizada para el diagnóstico morfológico del *Helicobacter pylori*. Se realizó en el Instituto de Gastroenterología, mediante endoscopia, a 625 pacientes adultos, 585 con gastritis crónica y 40 con úlcera gástrica. Se fijaron las muestras en alcohol de 95° Se probaron las coloraciones de Papanicolaou, hematoxilina y eosina, Gram, safranina y azul de metileno al 2 %. Se observaron las muestras en un microscopio óptico previamente calibrado. Se diagnosticó *H. pylori* en 310 gastritis crónicas y en 28 úlceras, 2 de las cuales eran malignas. Se diagnosticó *H. heilmannii* en un caso con úlcera gástrica negativo de *H. pylori*. Se eligió el azul de metileno al 2 % para la coloración.

DeCS: HELICOBACTER PYLORI/citología; HELICOBACTER PYLORI/aislamiento y purificación; GASTRITIS CRONICA/diagnóstico; ULCERA GASTRICA/diagnóstico; ENDOSCOPIA DEL SISTEMA DIGESTIVO; COLO-RACION/métodos.

Aunque por la acidez del estómago parecía inconcebible que allí pudieran sobrevivir bacterias, desde finales del siglo pasado se reportaron bacterias espiladas en el estómago de perros y gatos,¹⁻³ que después han sido bien estudiadas.⁴⁻⁸ En 1984 fue aislada de la mucosa gástrica humana una bacteria espirilada que denominaron *Campylobacter pyloridis*⁹⁻¹² posteriormente, por reglas de nomenclatura en latín cambiaron a *Campylobacter pylori*.¹³ Los estudios al microscopio óptico y al microscopio electrónico permitieron conocer en detalles su morfología^{14,15} y más

tarde, con la aplicación de las modernas técnicas de biología molecular se pudieron secuenciar las bases nitrogenadas de la molécula 16S del RNA ribosomal de esta bacteria,^{4,16-18} lo que determinó el surgimiento de un nuevo género: *Helicobacter*; entonces se le dio a esta bacteria el nombre *H. pylori*. En este género fueron incluidas otras bacterias gástricas productoras de ureasa, de las cuales solamente *H. heilmannii* y *H. felis*^{4,17} han sido reportadas en seres humanos.

Al microscopio óptico *H. pylori* se observa en forma de S simple o doble (una a continuación de la

¹ Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. Instituto de Gastroenterología (IGE).

² Especialista de II Grado en Patología. Investigador Auxiliar. Profesor Titular. IGE.

³ Especialista de II Grado en Gastroenterología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. IGE.

⁴ Especialista de II Grado en Gastroenterología. Investigador Titular. Profesor Titular. IGE.

⁵ Especialista de II Grado en Gastroenterología. Investigador Agregado. IGE.

⁶ Especialista de II Grado en Patología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermandades Amieijeiras".

otra), mide 2,5 a 4 mm de largo y 0,5 a 1 mm de grosor, y en un extremo tiene de 4 a 6 flagelos, pero estos no se observan al microscopio óptico.¹⁸

Se ha comprobado que *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica en cualquier parte del tubo digestivo que esta exista, no así en las áreas de metaplasia intestinal.¹⁸ Esta bacteria ha sido implicada en la patogénesis de la gastritis crónica, úlcera gástrica y del cáncer gástrico (carcinomas gástricos y linfomas).^{9-10,12,18-30}

En la actualidad existen diversos métodos diagnósticos para determinar la presencia de *H. pylori*^{19-22,24-31} los no invasivos y los invasivos; estos últimos comprenden todas las técnicas de detección del microorganismo en la mucosa gástrica e implican la realización de una endoscopia para obtener muestras, algunos son más caros, trabajosos y nos ocupan más tiempo, como son el cultivo de la bacteria, las modernas técnicas de biología molecular (PCR) y la localización de ésta en la biopsia gástrica. Existen otros más baratos. Sencillos y rápidos.^{19-22,25,27,29-31}

En Cuba, el Lic. Buesa inició los cultivos de *H. pylori* en 1986.¹⁹ Desde 1991 se ha implantado en nuestro país el método rápido de la ureasa utilizando el Urepyl – L^{25,27} para el diagnóstico enzimático de la bacteria, mediante el cual se le agrega al fragmento de mucosa gástrica, una solución-sustrato amarilla pajiza y ésta en presencia de la ureasa (enzima producida por la bacteria, si está presente) cambia de color a rosado rojizo.

En los últimos tiempos, algunos trabajos han demostrado la utilidad de la citología gástrica por cepillado en el diagnóstico morfológico de *H. pylori*,^{21,29} pero en nuestro país la citología no se había utilizado con esta finalidad.

Nuestros objetivos de trabajo fueron realizar el diagnóstico morfológico de la bacteria mediante citología gástrica por cepillado en pacientes con gastritis crónica y/o úlcera gástrica y probar varias técnicas de coloración para elegir la de los mejores resultados de acuerdo con el grado de nitidez, contraste, monotonía, costo, tiempo, posibilidad de realizar al mismo tiempo el diagnóstico de malignidad y la conservación de las láminas.

MÉTODOS

Se les hizo citología gástrica por cepillado a 625 pacientes adultos, 585 con gastritis crónica y 40 con úlcera gástrica, en el período comprendido entre julio de 1995 y el propio mes de 1998, en los salones de endoscopia de esta institución. Se prepararon 2 láminas de cada paciente como mínimo y fueron fijadas en alcohol de 95°, durante un tiempo mínimo de 15 min. Se probaron las coloraciones de Papanicolau, hematoxilina y eosina, Gram, safranina y azul de metileno al 2 % a pH alto. En las preparaciones fijas de Papanicolau y hematoxilina y eosina, el montaje se realizó con bálsamo del Canadá. En el resto de las coloraciones, las láminas se dejaron secar al aire. Las muestras fueron observadas primero con lentes de pequeños aumentos para localizar el *mucus* y los grupos de células glandulares y después, con lentes de inmersión para buscar las bacterias espiraladas en un microscopio óptico previamente calibrado. Las láminas sin montaje, que se dejaron secar al aire, se conservaron para ser observadas al transcurrir el tiempo y así valorar la conservación del germen y la calidad de la coloración. Para evaluar los resultados de las diferentes técnicas de coloración se tuvo en cuenta: nitidez (facilidad para precisar la imagen), contraste (diferentes grados de iluminación en diferentes puntos), monotonía (igual tonalidad del color en todo el extendido), costo (el valor de los reactivos utilizados), tiempo (el tiempo empleado en el procesamiento y diagnóstico de cada técnica) y posibilidad de realizar el diagnóstico de malignidad en la misma lámina (según el grado de conservación morfológica de las células, fundamentalmente estructuras nucleares). Los resultados se presentaron en tablas en forma descriptiva, en frecuencias absolutas y porcentajes.

RESULTADOS

Mediante este método diagnóstico se pudo constatar la presencia de abundantes bacterias espiraladas en forma de S simple o doble (una a continuación de la otra) cuya morfología y morfometría correspon-

den a *H. pylori*, en medio del *mucus* gástrico o entre las células glandulares, concomitantemente fueron observadas en muchos casos bacterias en forma de cocos, bacilos, monilias, infiltrado inflamatorio y material necrótico (figuras 1-6). Los bacilos y diplococos generalmente cubrían las células escamosas provenientes de la contaminación del equipo de la porción alta del tubo digestivo.



FIG. 1. Abundantes bacterias espiraladas en forma de $\sim 0 \sim$ correspondientes a *H. pylori*, obtenidas de un cultivo (coloración de Gram 1 200X).

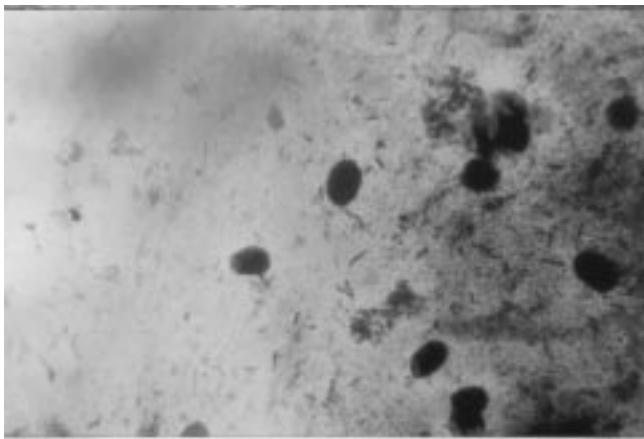


FIG. 2. Abundantes *H. pylori* bordeando un grupo de células gástricas bien conservadas con algunos leucocitos (coloración: azul de metileno al 2 % a pH alto, 1 200X).

Los resultados se muestran en la tabla. Al calcular el porcentaje se consideró como total el número de muestras citológicas útiles para diagnóstico. El *H. pylori* estuvo presente en 338 de las 524 muestras citológicas; en 310 de las 486 gastritis y en 28 de las 38 úlceras.

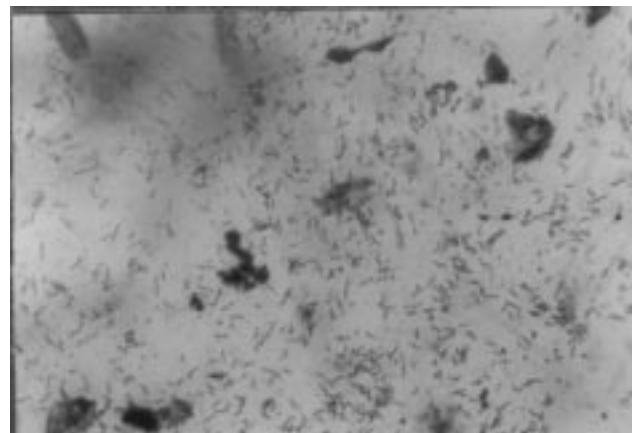


FIG. 3. Campo lleno de bacterias tipo *H. pylori* y algunas formas cocoideas (coloración: azul de metileno al 2 %, a pH alto, 1 200 X).

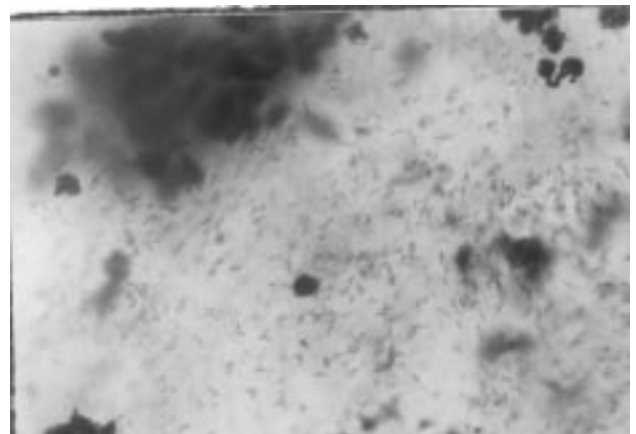


FIG. 4. Presencia de *H. pylori* y otras bacterias en un extendido hemorrágico con abundantes células necróticas e infiltrado inflamatorio proveniente de una úlcera gástrica (coloración: azul de metileno al 2 % a pH alto, 1 200 X).

En 2 de las úlceras con citologías positivas para *H. pylori*, la endoscopia era sospechosa de malignidad, en ambos casos, los extendidos citológicos mostraron células glandulares con carácter de malignidad y en la biopsia se confirmó adenocarcinoma de estómago. En la citología de un paciente con úlcera, negativa para *H. pylori* se observaron bacterias espiraladas no *H. pylori*, cuya morfología y morfometría se correspondían con *H. heilmannii*. En total hubo 101 casos (16 %) no útiles para diagnóstico.

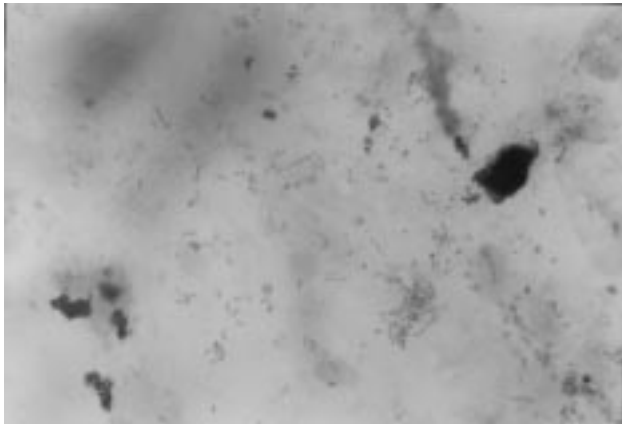


FIG. 5. Abundantes *H. pylori* en un paciente con gastritis que toman la coloración de Gram positiva o negativa de acuerdo con el grosor del *mucus* (coloración de Gram, 1 200 X).

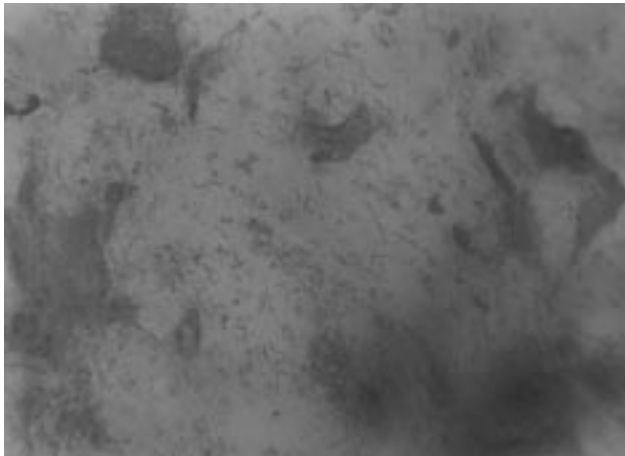


FIG. 6. Frotis gástrico con abundantes *H. pylori* algunos restos celulares y leucocitos (coloración: safranina, 1 200X).

Todas las técnicas de coloración utilizadas permitieron visualizar las bacterias. Las técnicas de Papanicolau y de hematoxilina-eosina no resultaron de nuestra elección, por ser más largas y costosas, aunque ofrecen la ventaja de poder realizar al mismo tiempo el diagnóstico de malignidad y de archivar las láminas por tiempo indefinido. De las técnicas no permanentes, la de Gram es útil, pero colorea el extendido muy irregularmente y presenta muchos artefactos de coloración, pues *H.pylori* en extendidos procedentes de cultivos es *Gram negativo*, sin embargo en nuestro trabajo, en las láminas obtenidas por cepillado de la mucosa gástrica, en algunos campos y en medio de secreciones gástricas, la bacteria se teñía fuertemente con este colorante. La safranina ofrece una imagen monótona que causa la vista del observador. Las láminas de las 3 coloraciones no permanentes conservaron la calidad de la preparación y la morfología del germen hasta los 3 meses. El azul de metileno al 2 % fue nuestra técnica de elección porque proporciona mayor contraste, resalta la morfología de *H.pylori* y es la más sencilla, barata y rápida.

DISCUSIÓN

En este trabajo se detectó la presencia de *H.pylori* en el 65 % de los casos estudiados, en el 64 % de las gastritis crónicas y en el 74 % de las úlceras gástricas, mientras que el 16 % de los extendidos citológicos resultaron no útiles por muestra escasa.

TABLA. Frecuencia de *H. pylori* diagnosticado por citología en gastritis crónica y úlcera gástrica

Diagnóstico endoscópico	H. Pyloru +	H. Pylori -	Util	No útil	Total
Gastritis crónica	310 (64 %)	176 (36 %)	486	99 (17 %)	585
Úlcera gástrica	28** (74 %)	10* (26 %)	38	2 (5 %)	40
Total	338 (65 %)	186 (35 %)	524	101 (16 %)	625

* 1 úlcera gástrica negativa de *H.pylori* con presencia de *H. Helmannii*.

** 2 úlceras gástricas cancerosas positivas de *H. Pylori*.

Parte de nuestra casuística (235 gastritis) fue objeto de un estudio multidisciplinario, de una tesis de grado, cuyos resultados fueron presentados en el V Congreso Nacional de Gastroenterología.^{30,31} Se evaluó la citología exfoliativa como método diagnóstico para *H.pylori* que mostró una sensibilidad del 72 %, una especificidad del 100 % y una eficiencia del 77 % en relación con la histología, que fue considerada “prueba de oro”. En ese trabajo se comprobó que existe una estrecha relación entre la gastritis y la presencia de *H.pylori* en el antro gástrico y que al aumentar la densidad de esta bacteria aumenta la severidad de la gastritis crónica diagnosticada histológicamente, además que este germen puede aparecer en mucosas histológicamente normales, provocar síntomas dispépticos y colonizar el antro gástrico, independientemente de la existencia o no de reflujo duodeno-gástrico.

Faraker²¹ en 1996, demostró que aunque tanto la citología como la biopsia tenían una especificidad de 100 %, la sensibilidad de la citología por cepillado era mayor que la biopsia, ya que el barrido del cepillo abarca mayor superficie de la mucosa y como es conocido, esta es colonizada por *H.pylori* en parches.

El *H.pylori* está presente en la mitad de los pacientes con dispepsia y la infección se incrementa con la edad,³² es el agente etiológico en más del 80 % de las gastritis³³ y en la úlcera gástrica tiene una frecuencia de 75 %.²⁵

Es bueno aclarar que en muchos de nuestros casos con ureasa positiva y citología negativa para *H.pylori* se observaban formas cocoideas en medio del infiltrado inflamatorio y material necrótico. Según Goodwin,¹⁸ cuando *H.pylori* es cultivada en medios sólidos, las verdaderas formas espiriladas pueden ser escasas o estar ausentes, las cuales también aparecen después de una exposición al oxígeno, se asume que estas formas cocoideas son indicativas de un estadio latente y sirven a la supervivencia del organismo cuando las condiciones ambientales son desfavorables. También debemos tener en cuenta que estas bacterias son capaces de producir diferentes enzimas y proteínas citotóxicas para las células epiteliales,²⁶ lo cual produce gran necrosis celular y que la res-

puesta inflamatoria (que depende individualmente de cada sujeto)^{20,25,28} dificulta en ocasiones la observación del microorganismo, que logra subsistir oculto, bajo un material necrótico y abundante material inflamatorio.

Se demostró la presencia de *H.pylori* en 2 pacientes, cuyas citologías y biopsias confirmaron la existencia de adenocarcinoma de estómago; lo que se puede asociar a la participación de *H.pylori* en la etiología del cáncer gástrico.^{20,23,25}

Este método diagnóstico nos permitió informar por primera vez la presencia de una bacteria no reportada en nuestro país, *H.heilmannii*, lo que nos lleva a enfatizar en que “no siempre *H.pylori* es la bacteria responsable de la presencia de ureasa en el estómago humano”, los falsos positivos de la ureasa para *H.pylori* pueden explicarse por la presencia de otras bacterias (*H.heilmanni*, *H. felis*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klepsiella*, *estafilcocos* y *strep-tococos*).^{4,21,31} Para el diagnóstico de *H.pylori* no basta el test de la ureasa, es necesario además utilizar otros métodos más específicos como la biopsia o la citología por cepillado de la mucosa gástrica, el cultivo sería el idóneo, pero actualmente en nuestro país no se está aplicando en la práctica diaria, porque la técnica es cara, trabajosa, lenta y sólo especialistas de mucha experiencia logran altos niveles de sensibilidad.

En conclusión, en nuestro trabajo se detectó la presencia de *H.pylori* en el 65 % y el azul de metileno al 2 % fue nuestra técnica de elección porque proporciona mayor contraste, resalta la morfología de *H.pylori* y es la más sencilla, barata y rápida. Todas las coloraciones probadas en nuestro trabajo permiten visualizar la bacteria; las no permanentes probadas son útiles para el diagnóstico del germen hasta los 3 meses.

La citología gástrica por cepillado también es útil para diagnosticar especies del género *Helicobacter* menos frecuentes en el ser humano; este método debe ser utilizado conjuntamente con otros como el test de la ureasa, para aumentar la eficiencia en el diagnóstico de la bacteria.

SUMMARY

It is known that in Cuba the gastric brush cytology has not been used for the morphological diagnosis of *Helicobacter pylori*. It was performed by endoscopy to 625 adult patients, 585 with chronic gastritis and 40 with stomach ulcer, at the Institute of Gastroenterology. The samples were fixed in alcohol 95 %. Papanicolaou's stains, hematoxylin and eosin, Gram's stain, safranin and methylene blue were tested. The samples were observed on a previously calibrated optical microscope. *H. pylori* was diagnosed in 310 chronic gastritis and in 28 ulcers, 2 of them were malignant. *H. heilmannii* was diagnosed in a case with stomach ulcer negative to *H. pylori*. Methylene blue 2 % was selected for staining.

Subject headings: HELICOBACTER PYLORI/citology; HELICOBACTER PYLORI/isolation & purification; GASTRITIS/diagnosis; STOMACH ULCER/diagnosis; ENDOSCOPY, DIGESTIVE SYSTEM; STAINING/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salomon H. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Balezellen. Zentrabl Bakteriolog (Naturwiss) 1896;19:433-41.
2. Bizzozero G. Über die schlauchförmigen Drüsen des Magen-Darm-Kanals und die Beziehung ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. Arch Mikrobiol Anat 1893;42:82-152.
3. Rappin J. Contribution à l'étude de bactéries de la bouche à l'état normal. En: Breed RS, Murray EGD, Hitchins A, eds, Bergey's manual of determinative bacteriology. 6 ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1948:68.
4. Lee A, O'Rourke. Gastric bacteria other than *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 1993;22:21-42.
5. Lockard VG, Boler RK. Ultrastructure of a spiral microorganism in the gastric mucosa of dogs. Am J Vet 1970;31:1453-62.
6. Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MW. Spiral organisms in the gastric antrum. Lancet 1987;2:96.
7. McNulty CAM, Dent JC, Curry A, Uff JS, Ford GA, Gear MW. New spiral bacterium in gastric mucosa. J Clin Pathol 1989;42:585-91.
8. Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Edit H. *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? Scand J Gastroenterol 1994;29:1061-4.
9. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;1:1273-5.
10. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984;1:311-5.
11. Marshall BJ, Armstrong JA, Mc Geachie DB. Attempt to fulfill Koch's postulates for *Campylobacter pyloris*. Med J Aust 1985; 142:436-9.
12. Tricottet V, Bruneval P, Vire O, Camilleri JP. *Campylobacter* like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans. An ultrastructural study. Ultrastructural Pathol 1986;10:113-22.
13. Marshall BJ, Goodwin CS. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Int J Syst Bacteriol 1987;37:68.
14. Jones DM, Curry A, Fox AJ. An ultrastructural study of the gastric *Campylobacter* organism *Campylobacter pyloridis*. J Gen Microbiol 1985;131:2335-41.
15. Chen XG, Correa P, Offerhaus J, Rodríguez E, Janney F, Hoffman E, et al. Ultrastructure of the gastric mucosa harboring *Campylobacter*-like organisms. Am J Clin Pathol 1986;86:575-82.
16. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilver T. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov and *Helicobacter mustelae* comb. Nov respectively. Int J Syst Bacteriol 1989;39:397-405.
17. The *Helicobacter* genus: now we are nine [editorial]. Lancet 1992;339:840-1.
18. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 1993;22:5-19.
19. Buesa F, Sotto A, Quintero M. Primer reporte del aislamiento de *Campylobacter pyloridis* en Cuba, 21 de marzo de 1986. Bol Epidemiol Hosp Doc Gen Calixto García 1986;2:3.
20. Rubiés Prat J, Panadés Arán A. *Helicobacter pylori*. Barcelona. Universidad Autónoma, 1995;t, 1, 2, 3.
21. Faraker CA. Diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric brush and biopsy specimens stained by Romanowsky and immunocytochemical methods: comparison with CLO test. Cytopathology 1996;7:108-19.
22. Skipper R, De Stephano B. A rapid stain for *Campylobacter pylori* in gastrointestinal tissue sections. Using Diff Quick J Histotechnol 1980;12:303-4.
23. Wotherspoon AC, Deglion C, Diss TC, Pan L, Mischini A, De Boni M. Regression of primary low grade B-cell gastric lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993;342:575-7.
24. Edit S, Stole M, Fisher R. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric no-Hodgkins lymphomas. J Clin Pathol 1994;47:436-9.

25. Soneira Pérez M. Ensayo clínico con Q-ulcer (subcitrato de bismuto coloidal cubano) en la úlcera gastroduodenal *Helicobacter pylori* positivo. Trabajo para optar por el título de Especialista de 1er Grado en Gastroenterología. La Habana: Instituto de Gastroenterología, 1994.
26. Annika Hamlet, Ann-Catrin Thoreson, Ola Nilsson, Ann Mari Svennerholm and Lars Olbe. Duodenal *Helicobacter pylori* infection. Differs in cag A genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* 1999; 116:259-68.
27. Buesa F, Quintero M, Haedo W, González Cansino J, González Carvajal M, Borbolla E. Urepyl-L: nuevo medio de urea para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en biopsias. Instituto de Gastroenterología, pag. 67. Programa-Resúmenes xxiii Congreso Panamericano de Enfermedades Digestivas. 14-18 de octubre de 1991, La Habana, Cuba.
28. Kar hu korpi J, Käheimo I, Silvennoinen-Kassinen, Tülikaiinen AS & Karttunen R. HLA-DQA, alleles and the presence of *H. pylori* antibodies. *Eur J Immunogen* 1999;26:15-7.
29. Govosdis B, Triantafillidis JK, Athanasiadou E, Barbanou E, Sotoriou E, Cheracakis P, Barbatzas CH. Brush-cytology: a satisfactory method for the detection of *Helicobacter pylori* infection. *Hellenic J Gastroenterol* 1995;8:261-4.
30. Hernández Domínguez M, Paniagua Estévez M, Valdés Alonso L. Citología exfoliativa en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. Programa-Resúmenes. V Congreso Nacional de Gastroenterología. 1998, Nov. 16-20: La Habana, Cuba. La Habana: Palacio de Convenciones, 1998:331.
31. Hernández Domínguez M. Citología exfoliativa en el diagnóstico de *H. pylori*. Trabajo para optar por el título de Especialista de 1er Grado en Gastroenterología. La Habana: Instituto de Gastroenterología, 1997.
32. García Paneque O. Determinación de sangre oculta en jugo gástrico en pacientes con síntomas dispépticos funcionales. Trabajo para optar por el título de Especialista de 1er Grado en Gastroenterología. La Habana: Instituto de Gastroenterología, 1999.
33. Paniagua Estévez M. Gastritis crónica (I) [editorial]. *Gastrum* 1997;(141):9.

Recibido: 18 de enero de 2002. Aprobado: 18 de marzo de 2002.

Lic. Sara Mandado Pérez. Instituto de Gastroenterología, 25 e I, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.