

Estandarización de nuevo protocolo Inmunohistoquímico para identificar *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas y valoración frente a la tinción Hematoxilina-Eosina

Standardization of the new immunohistochemical protocol to identify *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and contrast against Hematoxylin-Eosin staining

Jorge L. Jhoao Mejía-Parra^{1,a}, Andric Emanuel Guerrero-Espinoza^{2,b},
Carlota P. Flores-Arrascue^{3,c}, Alfredo S. Chiclayo-Padilla^{4,d}

RESUMEN

Objetivo. Estandarizar un nuevo protocolo de inmunohistoquímica para identificar *Helicobacter pylori*, en biopsias gástricas. **Material y Métodos:** el trabajo se realizó en tres fases. La primera fase hace uso de anticuerpos policlonales de conejo Anti-*H. pylori* como anticuerpo primario para la marcación de dicha bacteria, además de un polímero EnVision FLEX/HRP para la marcación en biopsias gástricas. En la segunda se modificó el contraste de la inmunotinción con los colorantes Hematoxilina de Harris y Eosina Y, con la finalidad de apreciar con más claridad la citomorfología del tejido gástrico a examinar y a los posibles cambios histológicos pre malignos. Por último se procedió a valorar los resultados frente a la tinción Hematoxilina y Eosina (H&E). **Resultados y Discusión:** Demostramos que al realizar el nuevo protocolo de inmunohistoquímica facilita la identificación de *H. pylori* y a su vez permite evaluar los cambios citomorfológicos en las biopsias gástricas. El establecimiento de este protocolo permitirá estudiar adecuadamente la asociación de la infección por *H. pylori* y los cambios histológicos pre-malignos en el tejido gástrico.

Palabras Clave: Inmunohistoquímica; *Helicobacter pylori*; gastritis; cambios histológicos pre malignos. **Fuente:** DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective. Standardize a new immunohistochemical protocol to identify *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. **Materials and Methods:** the work was carried out in three phases. The first phase makes use of polyclonal rabbit Anti-*H. pylori* antibodies as a primary antibody for the labeling of said bacteria, in addition to an EnVision FLEX / HRP polymer for labeling in gastric

biopsies. In the second, the immunostaining contrast was modified with the Harris Hematoxylin and Eosin Y dyes, in order to more clearly appreciate the cytomorphology of the gastric tissue to be examined and the possible pre-malignant histological changes. Finally, the results were evaluated against Hematoxylin and Eosin (H&E) staining. **Results and Discussion:** We show that by carrying out the new immunohistochemistry protocol, it facilitates the identification of *H. pylori* and, in turn, allows the evaluation of cytomorphological changes in gastric biopsies. The establishment of this protocol will allow an adequate study of the association of *H. pylori* infection and pre-malignant histological changes in gastric tissue.

Keywords: Immunohistochemistry; *Helicobacter pylori*; gastritis; pre-malignant histological changes (**Source:** DeCS-BIREME).

1. Laboratorio de Inmunohistoquímica. Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
 2. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo. Universidad de Chiclayo, Chiclayo, Perú.
 3. Servicio de Inmunohistoquímica. Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
 4. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- a. Biólogo – Microbiólogo y Parasitólogo, Especialista en Microbiología Clínica.
b. Médico residente en Anatomía Patológica.
c. MSc. Microbiología Clínica y Especialista en Inmunohistoquímica.
d. Médico Especialista en Anatomía Patológica.

INTRODUCCIÓN

Según la Asociación Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1994 clasificaron a la bacteria *Helicobacter pylori* como carcinógeno del grupo 1 (Carcinógeno para el ser humano)⁽¹⁾. Los estudios que llevaron a esta clasificación iniciaron cuando Robín Warren y Barry Marshall detectaron que *H. pylori* se encontraba en casi todos los pacientes con inflamación gástrica, úlcera duodenal o gástrica; y lo propusieron como etiología de estas enfermedades⁽²⁾. En todas las personas infectadas esta bacteria produce gastritis crónica⁽³⁾; sin embargo a pesar de que la infección afecta del 20% al 95% de la población adulta⁽⁴⁾, en la mayoría de los casos cursa como una gastritis asintomática y en menos del 20% de los casos de la infección habrá manifestaciones clínicas, dadas por enfermedad por úlcera péptica en 15%-18% de los casos y en menor proporción, cáncer gástrico y linfoma MALT gástrico, con alrededor de 2 - 3% y menos del 1% de los casos, respectivamente⁽⁵⁾.

Se considera que el adenocarcinoma gástrico tipo intestinal usualmente es precedido por una secuencia de eventos histológicos que comienzan con la gastritis crónica difusa y que eventualmente llevan a atrofia gástrica, metaplasia intestinal gástrica y displasia, secuencia en la que además estaría implicado la infección por el *H. pylori* tanto en la inducción de la inflamación gástrica como con la progresión del desarrollo de los cambios neoplásicos⁽⁶⁾. Entre las lesiones que forman parte de esta secuencia carcinogénica, la metaplasia intestinal gástrica proporciona una interesante área de investigación, dado que es considerado además como un factor de riesgo predictor independiente de subsecuente desarrollo de malignidad gástrica, en especial en sujetos infectados por *H. pylori*. Además la metaplasia intestinal está asociada a la infección por *H. pylori* y el reflujo biliar, aunque el *H. pylori* está implicado como la principal causa de metaplasia⁽⁷⁾.

El diagnóstico de *H. pylori* no es fácil de lograr debido a las dificultades en acceder a su nicho ecológico y la fragilidad de su naturaleza. Su detección continuará siendo tema de gran interés debido a los riesgos asociados a su presencia. Poder lograrlo implica del conocimiento combinado, esfuerzos e investigación por parte de un grupo multidisciplinario que incluye personal de laboratorio, microbiólogos, patólogos, médicos generales, médicos internistas y gastroenterólogos⁽⁸⁾.

La importancia que representa la detección precisa de la *H. pylori* es esencial para correcto manejo del paciente y es particularmente importante confirmar la erradicación de las bacterias después del tratamiento. La bacteria en forma de espiral se puede ver en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, pero se

detectan más fácilmente con colorantes especiales tales como Giemsa o la tinción de plata de Warthin-Starry. Ninguna de estas tinciones es específica para el organismo y todo puede ser difícil de interpretar debido a la tinción no específica de moco, la interpretación óptima de estas tinciones requiere un cuidadoso examen de las secciones a gran aumento⁽⁸⁾. Más recientemente, inmunohistoquímica, hibridación in situ y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han propuesto como métodos de detección alternativos altamente específicos⁽⁸⁾.

Sin embargo, la necesidad de usar tinciones especiales o métodos inmunohistoquímicos ha sido debatida en años recientes. Wang et al confirmaron que las tinciones especiales, específicamente las inmunohistoquímicas, no son costo-efectivas o necesarias, por el contrario deberían usarse para gastritis inexplicada y pacientes previamente tratados con probable baja densidad del microorganismo⁽⁹⁾. Por otro lado Smith y cols. hace unos años en un estudio retrospectivo en 200 muestras de mucosa gástrica tomadas de forma consecutiva, valoraron la tinción H&E frente a la inmunohistoquímica, con lo cual corroboraron que *H. pylori* es fácilmente observado en la mayoría de casos en que se utiliza hematoxilina-eosina con una sensibilidad de 91% y especificada de 98%, teniendo como resultados que para la inmunohistoquímica 32 fueron positivas para *H. pylori*, mientras que 29 casos fueron positivos con la tinción H&E, llegando a la conclusión que es más conveniente y menos costosa usar la tinción H&E para identificar *H. pylori* en biopsias gástricas⁽¹⁰⁾. Por último hay que considerar aunque las técnicas inmunohistoquímicas aumentan tanto la especificidad como la sensibilidad en el diagnóstico de la infección, pero ninguna de estas técnicas, en la actualidad, es lo suficientemente específica como para obtener un diagnóstico en tiempo real de la infección por *H. pylori*⁽¹¹⁾.

Se sabe que la técnica de inmunohistoquímica, permite la realización de estudios retrospectivos para recuperar diagnósticos de enfermedad de interés epidemiológico con altos niveles de sensibilidad y especificidad, próximos al 100%⁽¹²⁾. Además la principal ventaja de la inmunohistoquímica sobre otras técnicas es que se conservan las relaciones entre los distintos componentes en estudio y sobre todo que permite la identificación celular⁽¹³⁾.

Malfetheriner et al, sugieren que la mayoría de los casos de infección por *H. pylori* pueden diagnosticarse a partir de biopsias gástricas utilizando solo tinción histoquímica. En casos de gastritis crónica (activa) en la que no se detecta *H. pylori* por histoquímica, las pruebas inmunohistoquímicas de *H. pylori* se pueden utilizar como prueba auxiliar^(14,15). En el caso de histología normal, no se debe realizar tinción inmunohistoquímica⁽¹⁴⁾. Un argumento para el uso de

inmunohistoquímica (IHC) es que puede acortar el tiempo requerido para la búsqueda de la bacteria, especialmente en casos con un bajo nivel de organismos. Sin embargo, el procedimiento de tinción con IHC es más costoso que las tinciones histoquímicas y no está disponible en todos los laboratorios. Algunos estudios apoyan el uso de IHC de forma rutinaria, ya que se ha demostrado que la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) es 42-99% sensible y 100% específica en comparación con IHC, mientras que otros estudios no lo hacen, ya que encontraron sensibilidad/especificidad de IHC para ser 97/98% y 90/100%, en comparación con las tinciones de Giemsa y H&E, respectivamente⁽¹⁴⁾.

Los casos negativos por las tinciones histológicas son típicamente aquellos con un bajo nivel de *H. pylori*, mientras que las muestras sin gastritis crónica (activa o inactiva) son negativas para el organismo incluso cuando se usa IHC. Por lo tanto, el uso de IHC podría restringirse a casos con gastritis crónica (activa o inactiva), gastritis atrófica (metaplasia intestinal extensa) o en biopsias de seguimiento después del tratamiento de erradicación de *H. pylori*, cuando no se identifican organismos mediante el uso de tinciones histoquímicas⁽¹⁴⁾.

La densidad de *H. pylori* también puede ser baja y desigual, o el organismo puede aparecer como formas cocoides en pacientes que reciben IBP^(14,15).

Estudios comparativos muestran que la inmunohistoquímica presenta una elevada sensibilidad y especificidad como lo demostró Shimizu et al tras obtener los siguientes resultados, por tinción H&E fueron positivos para *H. pylori* el 70% de los casos antes del tratamiento y el 21% después del tratamiento, y mediante la inmunohistoquímica se obtuvo el 85% y 41% respectivamente⁽¹⁶⁾. Por otro lado Jonkers et al en 1997 en un estudio realizado sobre 40 biopsias gástricas, determinaron que la sensibilidad de la inmunohistoquímica hacia *H. pylori* fue del 83,8 +/- 11,1% y la especificidad del 90,0 +/- 0,0%⁽¹⁷⁾.

De igual forma Ashton-Key et. al., demostraron la alta eficiencia de la inmunohistoquímica al detectar 25 casos positivos para *H. pylori* a través de anticuerpos policlonales en los cortes histológicos de un total de 38 biopsias, (15/26 muestras de biopsia con gastritis crónica, 7/7 con linfoma MALT y 3/ 5 secciones gastrectomía). A diferencia de los 14 casos positivos teñidas con hematoxilina y eosina (10/26 muestras de biopsia con gastritis crónica, 4/7 muestras de biopsia con linfoma MALT, 0/5 secciones de muestras de gastrectomía). Siendo incluso superior al PCR por el que sólo se logró identificar *H. pylori* en 17 casos (12/26 muestras de biopsia con gastritis crónica, 5/7 linfomas de MALT y secciones de gastrectomía 0/5)⁽⁸⁾.

Actualmente en la investigación de la infección por *H.*

pylori y su asociación con cambios histológicos pre-malignos y cáncer gástrico se usan diversas técnicas tintoriales así como inmunohistoquímica y PCR, lo que hace que este tipo de investigaciones sea multidisciplinaria y a la vez se necesite de una elevada capacitación y experiencia a la hora de identificar la bacteria; la falta de técnicas más específicas y la poca experiencia han llevado en muchos casos a reportes erróneos de su presencia o ausencia a la hora de diagnosticar la infección por *H. pylori* en biopsias gástricas o para comprobar la efectividad del tratamiento.

Es por ello que el presente trabajo de investigación tiene como objetivo estandarizar un nuevo protocolo de inmunohistoquímica, con el fin de mejorar el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en biopsias gástricas, al modificar y mejorar el contraste de la inmunotinción, lo cual no solo nos permitirá apreciar la concentración y dispersión exacta de la bacteria en el tejido gástrico, sino también los cambios histológicos pre malignos que se puedan presentar junto a la infección por *H. pylori*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras:

Se seleccionaron 35 tacos de biopsias gástricas del banco de biopsias del servicio de Anatomía Patológica, previo permiso otorgado por el comité de investigación del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo.

Cortes histológicos de las biopsias gástricas:

El taco de parafina, previamente codificado, fue colocado y alineado en el portabloque del micrótomó. El micraje del corte fue regulado en 2 micras. Se usó una cuchilla de primer uso nueva. Luego se desgastó el taco, hasta que la superficie quedó homogénea, y se obtuvo los cortes histológicos de las biopsias de 2 micras.

Los cortes histológicos fueron colocados en un recipiente con agua, para facilitar la extensión del tejido en las láminas portaobjetos con carga. Cada lámina portaobjetos fue rotulada con el código asignado y el anticuerpo. Estas láminas fueron secadas en una estufa a 60°C.

Desparafinado químico:

Las láminas portaobjetos con los cortes histológicos de las biopsias gástricas fueron desparafinadas utilizando xileno mediante cuatro inmersiones separadas de 5 minutos. Luego se hidrataron con un porcentaje decreciente de alcohol (100%, 90%, 80% y 70%). Cada 5 minutos respectivamente.

Protocolo de Inmunohistoquímica modificado:

Pretratamiento:

Para el pretratamiento se siguieron las especificaciones

según Dako 2015, fabricante del kit de detección:

Se preparó una solución de trabajo diluyendo la solución recuperadora de antígeno EnVision™ Flex (50x) concentrada, 1:50 en agua destilada o desionizada. Luego se llenaron los tanques del PT - Link con cantidad suficiente (1.5 L) de solución de trabajo para cubrir las secciones de tejido. El PT-Link fue precalentado a 65 °C durante 10 min previos. Posteriormente se sumergieron los RACKS con los cortes histológicos adheridos a las láminas portaobjetos en la solución recuperadora de antígeno EnVision™ Flex (solución de trabajo) pre calentada, en los tanques del PT - Link e incubar durante 1h 30 minutos a 97° C. Lo que permitió optimizar la desparafinación y recuperar el epítipo simultáneamente, con ayuda del equipo PT - Link y la solución recuperadora de antígeno EnVision™ Flex (Tris/EDTA buffer, pH 9). (La enzima recuperadora es de naturaleza termoestable por lo que soporta temperaturas de hasta 99°C). Luego se dejó enfriar las secciones en el PT - Link hasta que la temperatura llegase a 65°C⁽¹⁸⁾.

Se retiró cada Rack con las láminas del tanque del PT - Link y fueron sumergidas inmediatamente en un tanque con Tampón de Lavado EnVision™ FLEX, diluida (20x) a temperatura ambiente. Durante 5 minutos⁽¹⁸⁾.

Finalmente las láminas con el tejido fijado fueron remarcadas con el lapicero Dako de tal forma que se delimitó el área de dispersión en base al tamaño del tejido, colocándolas en cámara húmeda y luego se procedió con la inmunotinción. Las secciones no deben secarse durante el tratamiento o durante el procedimiento de la inmunohistoquímica⁽¹⁸⁾.

Procedimiento de Inmunotinción modificado:

Se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena con el peróxido de hidrogeno (Peroxidase Blocking Reagent Ready-to-use de Dako Citomation) 95:5, agregándose 50uL sobre el tejido fijado en las láminas portaobjetos con carga durante 5 minutos fuera de la luz y en cámara húmeda. Luego se lavaron dos veces cada 3 min con solución buffer (Tampón de Lavado EnVision™ FLEX), diluida (20x). Acto seguido fueron aplicados 50uL el anticuerpo primario: Policlonal Rabbit Anti-*Helicobacter pylori*, durante 20 min a temperatura ambiente. Lavándose dos veces cada 3 minutos con Solución buffer (Tampón de Lavado EnVision™ FLEX), diluida (20x). Posteriormente fueron agregados 50uL de polímero (Polímero marcado EnVision™ FLEX/HRP) por 20 minutos. Las láminas portaobjetos fueron lavadas nuevamente dos veces cada 3 minutos con Solución buffer (Tampón de Lavado EnVision™ FLEX), diluida (20x). Y finalmente se agregó el cromógeno (EnVision™ FLEX DAB + Chromogen) 50ul en cada lámina por 10 minutos. Enjuagándose con solución buffer (Tampón de Lavado EnVision™ FLEX).

Contraste modificado:

Luego de realizarse la inmunotinción a los cortes histológicos de biopsias gástricas, estos fueron sumergidos en Hematoxilina de Harris por 1 minuto, luego se enjuagaron con agua corriente, para ser sumergidas en carbonato de litio al 3% por 30 segundos, volviéndose a enjuagar en agua corriente para eliminar el exceso de reactivo y se introdujeron en eosina durante 1 minuto; para eliminar el exceso de colorante se lavó dos veces cada 5 minutos las láminas portaobjetos con agua destilada. Finalmente los cortes histológicos fueron secados a 60 °C por 20 minutos en una estufa para eliminar el excedente de agua y ser aclaradas en xilol, mediante dos inmersiones de 5 minutos.

El montaje se realizó con resina y los cortes histológicos fueron evaluados a 10X y luego 40X en el microscopio.

RESULTADOS

En esta investigación hemos estandarizado un nuevo protocolo de inmunohistoquímica y a la vez hemos comparado los resultados obtenidos con los de la tinción hematoxilina y eosina (H&E), ya que es el método diagnóstico de la infección por *H. pylori* en biopsias gástricas realizado en el servicio de anatomía patológica.

Al aplicar el nuevo protocolo de inmunohistoquímica para identificar *H. pylori* de biopsias gástricas, se obtuvo un mejor performance en el reporte de la infección por esta bacteria en los pacientes con gastritis crónica, siendo exacta al definir la distribución y concentración de *H. pylori* de color marrón, como se observa en la figura 1. Así mismo se determinó con precisión el patrón de distribución de la bacteria tales como intracelular, adherente-apical, libre en la mucosa gástrica y/o en la luz de las glándulas gástricas.

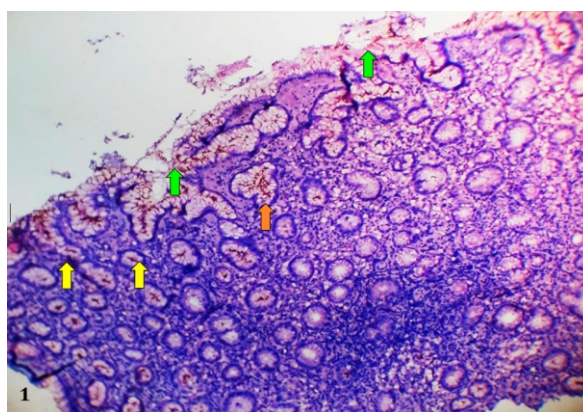


Figura 1

Vista panorámica (10X) de la Inmunomarcación de *H. pylori* (color marrón), además se aprecia su amplia distribución tanto en la mucosa gástrica superficial (↑), faveolas y criptas gástricas (↑) y en la luz de las glándulas gástricas (↑).

La tinción H&E realizada a las biopsias gástricas, no define exactamente la concentración de *H. pylori*, siendo muchas veces confundida con tinción inespecífica de moco, dando resultados falsamente positivos. Sin embargo es de gran utilidad para la descripción del tejido gástrico, así como para el diagnóstico de gastritis crónica, atrofia, metaplasia y displasia. En la figura 2, se aprecia que la tinción H&E de *H. pylori* no define exactamente la forma de la bacteria, observándose difusa y poco clara, por lo cual fácilmente se podría confundir con tinción inespecífica de moco o con detritus, dificultando el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, a la vez se necesita de mucha experiencia y de realizar observaciones a mayor aumento 100X, para poder realizar un diagnóstico adecuado. Por el contrario con el nuevo protocolo de inmunohistoquímica, la identificación de *H. pylori* es mucho más fácil y objetiva, como observamos en la figura 3, permitiéndonos observarla dentro de las criptas, faveolas y de las glándulas gástricas, siendo de gran ayuda para diagnosticar la infección.

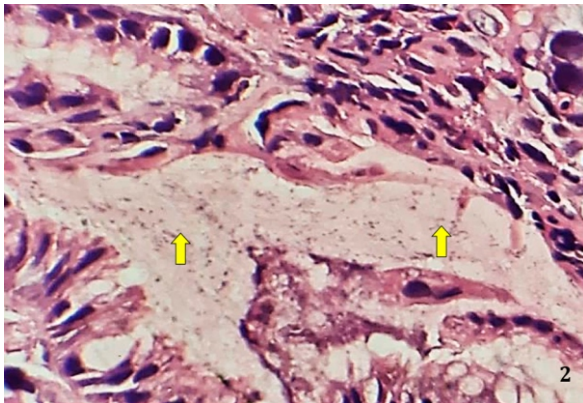


Figura 2

Vista panorámica de Tinción H&E a 40X, con Zoom x2, para poder observar con mejor detalle la tinción de *H. pylori* (↑) dentro de una faveola gástrica.

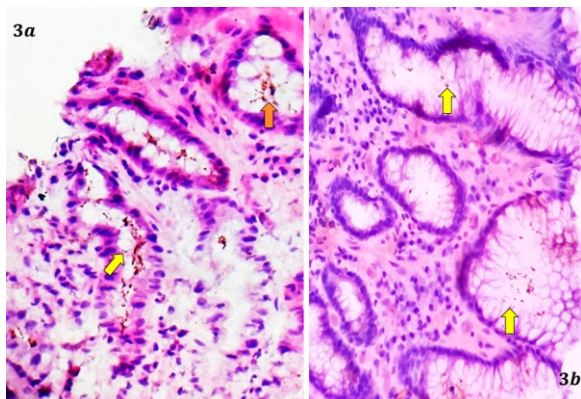


Figura 3

Identificación de *H. pylori* (color marrón) (3a - 40X) (3b - 10X) por inmunohistoquímica, obsérvese la colonización dentro de las glándulas gástricas (↑) y de las faveolas del tejido gástrico (↑).

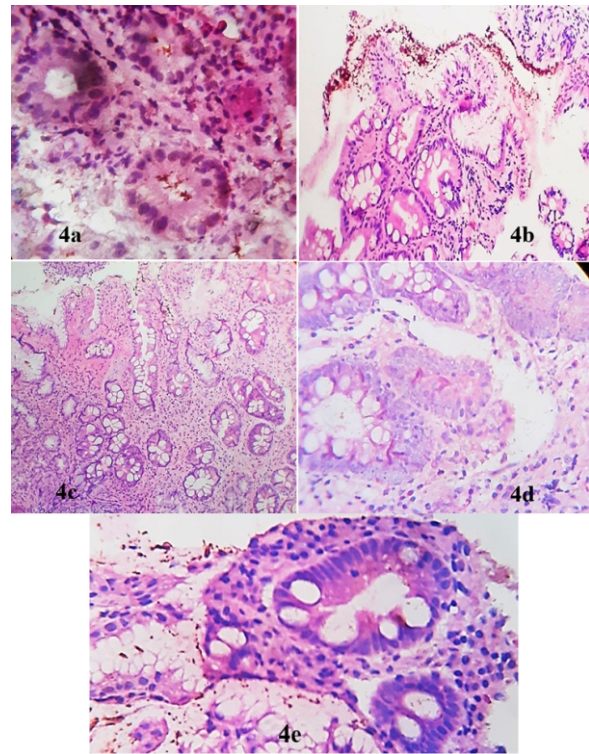


Figura 4

Se aprecian cambios histológicos en el tejido gástrico, además la presencia de *H. pylori* (color marrón). 4a. Vista de tejido gástrico (40X) con cambios celulares reactivos, nótese los núcleos hipercromáticos y ligeramente aumentados, así como empezando a migrar hacia la luz de la glándula gástrica. 4b. Vista a 10X de tejido gástrico con metaplasia intestinal completa e incompleta. 4c. vista 10X de Metaplasia Intestinal completa e incompleta. 4d. Displasia de bajo grado (40X) se aprecia incremento de la relación núcleo-citoplasma, hipercromasia y pérdida de la polaridad del núcleo. 4e. Metaplasia intestinal incompleta con presencia de *H. pylori*.

En efecto el nuevo protocolo de inmunohistoquímica también permitió describir las características del tejido gástrico, pudiéndose realizar el diagnóstico de gastritis crónica asociada a cambios histológicos premalignos como metaplasia, cambios celulares reactivos y displasia (figura 4). Además tiene las ventajas que brindan tanto de la tinción H&E como de la inmunohistoquímica convencional, aumentando en gran medida su utilidad para el diagnóstico, pues también es altamente sensible y específico (tabla 2).

Tabla 1. Resultados de la Infección por *H. pylori*

Resultados	Tinción H&E	New IHQ
Negativo	14	13
Positivo +	6	1
Positivo ++	10	5
Positivo +++	5	16

Así mismo se determinó la especificidad que fue 92,85% ($\pm 8,5\%$ IC95%) y la sensibilidad que fue 95,23% ($\pm 7,0$ IC95%) (Tabla 2), en función a los resultados obtenidos por tinción H&E. La mayoría de las biopsias 22/35 resultaron positivas para *H. pylori* (tabla 1) usando el nuevo protocolo de Inmunohistoquímica, también se determinó el valor de probabilidad al 95% de confianza fue 0,002 ($p < 0,05$), en función de los resultados de 3 cruces positivas para *H. pylori*. Lo cual nos indica que los resultados obtenidos con el nuevo protocolo tiene una elevada significancia al diagnosticar la infección por *H. pylori* en las biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica, contribuyendo con un adecuado diagnóstico de esta infección.

Tabla 2. Determinación de la sensibilidad y especificidad.

New - IHQ	Tinción H&E		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	20	1	22
Negativos	1	13	13
Total	21	14	35

Sensibilidad: $(20/21) \times 100 = 95,23\%$ ($\pm 7,0$ IC 95%)
Especificidad: $(13/14) \times 100 = 92,85\%$ ($\pm 8,5$ IC al 95%)
 $p < 0,05$

DISCUSIÓN

En nuestro país la gastritis crónica causada por *H. pylori* es altamente prevalente superando el 40% en todos los estratos socioeconómicos, es de considerar que existan técnicas que permitan un óptimo y preciso diagnóstico de esta bacteria en el tejido gástrico antes y después del tratamiento, es por esto que se estandarizó este nuevo protocolo de inmunohistoquímica, el cual demostró tener una sensibilidad del 95,23% y una especificidad del 92,85%, la cual es superior a muchas técnicas tintoriales y técnicas no invasivas, además nos permite determinar claramente la distribución y la concentración de la bacteria en el moco gástrico, las faveolas, y en la luz de las glándulas gástricas. A diferencia de Ashton-Key et. al.⁽⁶⁾ que consideran que *H. pylori* puede verse en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, en esta investigación realizada la coloración de la bacteria no pudo verse con claridad por lo cual se tuvo que recurrir a observación con objetivos de alto aumento como el de inmersión (100X) para evitar las confusiones con la tinción inespecífica de moco y detritus, como también lo había propuesto Ashton-Key et. al.⁽⁶⁾, al mismo tiempo mencionó que las coloraciones especiales tales como Giemsa o la tinción de plata de Warthin-Starry detectan más fácilmente la presencia de *H. pylori*, sin embargo lo que observamos en los laboratorios de Anatomopatológica e histoquímica es que estas tinciones son complejas de realizar y a la vez necesitan reactivos controlados y/o peligrosos para la salud como la tinción de plata de

Warthin-Starry, por otro lado estas técnicas también al igual que la tinción de H&E, no marcan específicamente a la bacteria y tienden a deteriorarse con el tiempo impidiendo una reevaluación. A diferencia de nuestro protocolo de inmunohistoquímica que marca de manera específica y duradera a *H. pylori*, gracias a la utilización de anticuerpos policlonales de conejo específicos contra antígenos termoestables que solo presenta *H. pylori*.

En este contexto, esta técnica no solo ayuda a diferenciar claramente la ubicación, distribución y concentración del microorganismo, sino también permite describir el tejido gástrico y los cambios pre-malignos como metaplasia, cambios reactivos celulares y displasia. Según lo descrito por Sánchez-Cuén et. al.⁽⁷⁾ en 2016, la infección de *H. pylori* está implicada en la secuencia de cambios pre malignos como Metaplasia y displasia, en efecto hemos observamos la presencia de *H. pylori* en tejido gástrico con metaplasia, cambios celulares reactivos y displasia, considerando de tal manera que la infección por *H. pylori* es un factor importante para la aparición de estos cambios pre-malignos como también lo menciona Chacaltana et. al.⁽⁶⁾ en 2012, afirmando que la infección por *H. pylori* es la principal causa de metaplasia intestinal. Contribuyendo con un adecuado diagnóstico de los pacientes con gastritis. Estas ventajas las adquiere claramente al mejorar el contraste de fondo terminada la Inmunomarcación.

En los últimos años el uso de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de la infección por *H. pylori* ha sido debatido constantemente debido a los costos-beneficios o si son necesarias, como lo mencionó Wang et. al.⁽⁹⁾ en 2014, agregando que solo deberían usarse para casos de gastritis inexplicadas o en pacientes previamente tratados con baja densidad del microorganismo. Sin embargo al comparar tanto las concentraciones de 3 cruces (+++) obtenidos por Tinción H&E como por el nuevo protocolo de inmunohistoquímica se obtuvo a través de la evaluación de test de hipótesis para dos proporciones independientes que el uso del nuevo protocolo de inmunohistoquímica es significativo ($p = 0,002$) (95% de confianza), y puede ser usado para el correcto diagnóstico de la infección de este microorganismo.

Por otro lado el nuevo protocolo de inmunohistoquímica tiene una sensibilidad de 95,23% siendo superior a la sensibilidad de la tinción H&E obtenida por Smith y cols que fue solo del 91%, de la misma manera el número de biopsias positivas fue mayor que el obtenido por la tinción H&E. A diferencia de la recomendación dada por Smith y cols, el uso de este nuevo protocolo estandarizado de inmunohistoquímica es de gran ayuda y de vital importancia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* en biopsias gástricas, además como una de sus ventajas, podremos visualizar las

características histológicas del tejido gástrico estudiado así como los cambios pre-malignos que estos puedan presentar.

En relación a los estudios realizados por Shimizu et. al.¹⁶ en el cual encontró gran diferencia en porcentajes de los resultados positivos para la infección por *H. pylori* en biopsias gástricas que obtuvo tras comparar la tinción H&E (70% positivos) con la Inmunohistoquímica (84% positivos), en esta investigación tal margen es minoritario, pues solo realizamos estudios sobre 35 biopsias, y observamos que en 22/35 biopsias fueron positivas para *H. pylori* usando el nuevo protocolo de inmunohistoquímica, mientras que 21/35 fueron positiva usando la tinción H&E. Por el contrario si nos basamos en el reporte semicuantitativo de la concentración de *H. pylori*, si obtenemos diferencias significativas al obtener que 17/35 biopsias presentaron 3 cruces (+++/++) de positividad para *H. pylori* usando el nuevo protocolo, a diferencia de solo 5/35 biopsias con 3 cruces (+++/++) obtenidos por Tinción H&E. De igual forma Ashton-Key et. al.⁽⁸⁾, demostraron la alta eficiencia de la inmunohistoquímica al detectar 25/38 positivos para infección por *H. pylori*.

En contraste con los datos obtenidos por Jonkerst et. al.⁽¹⁷⁾ en un estudio realizado sobre 40 biopsias gástricas, en el cual determinaron que la sensibilidad de la inmunohistoquímica hacia *H. pylori* fue del 83,8 +/- 11,1% y la especificidad del 90%, este nuevo protocolo estandarizado de inmunohistoquímica obtuvo un 95,23% ($\pm 7,0$ IC95%) de sensibilidad y un 92,5% ($\pm 8,5$ IC95%) de especificidad, siendo superiores sutilmente a los determinados Jonkers et. al.

El nuevo protocolo de inmunohistoquímica estandarizado, es de gran utilidad e importancia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, debido a su elevada sensibilidad y especificidad como prueba diagnóstica. Además nos permite observar los cambios histológicos pre-malignos que se puedan presentar junto a dicha infección.

Conflictos de interés: Los autores niegan conflictos de interés.

Financiamiento: Autofinanciado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HSU-PING, LAI K, HSU P, LO G, YU H, CHEN W et al. *Helicobacter pylori* Infection and the risk of gastric malignancy. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102:725-730. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324128>.
2. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis (Letter). *Lancet.* 1983, 1:1273.
3. Martínez, L., Márquez, Y., Rodríguez, B., Reyes, O., Mora, S. Presencia del gen *cagA* y de la citotoxina *vacA* del *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos. *Cuba. Rev Cub Med Mil* 2016. vol.45 no.4.
4. Toro, C., García-Samaniego, J., Casada, I., Rubio, M. y Baquero, M. Relevancia clínica de las proteínas *CagA* y *VacA* y de los factores del huésped en el desarrollo de úlcera péptica en pacientes infectados por *Helicobacter pylori*. *Rev. Clínica España.* 2003, 203(9):430-3.
5. Frías Ordoñez, Juan Sebastián, & Otero Regino, William. Aspectos prácticos en métodos diagnósticos para la infección por *Helicobacter pylori*: una revisión narrativa. *Revista de Gastroenterología del Perú.* 2017; 37(3), 246-253. Recuperado en 23 de marzo de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292017000300009&lng=es&tlng=e.
6. Chacaltana A., Soriano C., Frisancho O. Factores de Riesgo Asociados a Metaplasia Intestinal Gástrica en Pacientes sin Enfermedad Gastroduodenal Significativa. ¿Está Siempre Asociada la Infección por *Helicobacter Pylori*?. *Rev. Gastroenterol. Perú.* 2012; 32-1: 50-57. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v32n1/a07v32n1.pdf>
7. Sánchez-Cuén JA, Irineo-Cabrales AB, Bernal-Magaña G, Peraza-Garay FJ. Regresión de la metaplasia intestinal gástrica tras la erradicación de la infección por *Helicobacter pylori* en un hospital de México. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2016; 108(12):770-775. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v108n12/es_ori_ginal2.pdf.
8. Ashton-Key, M., Diss, T., Isaacson, P. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol.* 1996; 49:107-111. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC500340/>
9. Wang, X., Zhang, S., Abreo, F., Thomas, J. The role of routine immunohistochemistry for *Helicobacter pylori* in gastric biopsy. *Ann Diagn Pathol.* 2010; 14(4):256-9. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637430>.
10. Smith, S., Snow, A., Perry, R., Qasem, S. *Helicobacter pylori*: to stain or not to stain?. *Am J Clin. Pathol.* 2012; 137(5): 733-8. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523211>.
11. Tonkic, A., Tonkic, M., Megraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2012; 17(Suppl. 1): 1-8. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/229581>

- [48.](#)
12. Jurado, G., Montoya-Flórez, L., Betancur, C., Pedraza-Ordoñez, F. Uso de la inmunohistoquímica como herramienta epidemiológica para el diagnóstico de rabia bovina a partir de casos no conclusivos. *Rev. MVZ Córdoba*. 2012; 17(2): 3065-3070.
 13. Martín-Lacave, I., García-Caballero, T. Atlas de Inmunohistoquímica. Caracterización de células, tejidos y órganos normales. España. Ed Diaz de Santos. 2012
 14. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA en nombre del Grupo de estudio europeo de Helicobacter y Microbiota y el panel de consenso, et al. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report *Rev. Gut*. 2017; 66: 6-30. Recuperado el 29 de marzo de 2020, de <https://gut.bmj.com/content/66/1/6>.
 15. Mentis, A., Lehours, P., Mégraud, F. Epidemiology and Diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. 2015; 20 (Suppl. 1): 1-7. Recuperado el 29 de marzo de 2020, de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/hel.12250>.
 16. Shimizu T, Akatmatsy T, Ota H & Katsuyama T. Inmunohistochemical detection of Helicobacter pylori in the surface mucous gel layer and its clinical pathological significance. *Rev. Helicobacter*. 1996; 1(4):197-206. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1523-5378.1996.tb00040.x>
 17. Jonkerst, D., Stobberingh, E., De Bruine, A., Arends, J.W., Stockbrügger, R. Evaluation of immunohistochemistry for the detection of Helicobacter pylori in gastric mucosal biopsies. *J Infect*. 1997; 35:1149-54. Recuperado el 23 de marzo de 2020 de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016344539791611X?via%3Dihub#!>
 18. Dako Denmark A/S. (2015). EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link). Quinta Edición. Recuperado de: <https://docplayer.es/87436104-Envision-flex-mouse-high-ph-link.html>.

Correspondencia

Mejía-Parra, Jhoao
 Correo: Jhoao.mejia@gmail.com

Revisión de pares

Recibido: 18/08/2020
 Aceptado: 15/09/2020