

HELICOBACTER PYLORI (CAMPYLOBACTER PYLORI):

II. REVISIÓN DE METODOS DIAGNOSTICOS

Francisco Hernández*, Patricia Rivera**

RESUMEN

Se revisan los métodos diagnósticos para *Helicobacter pylori*, incluyendo el tipo de muestras, los medios de cultivos y las condiciones de incubación. Además, como diagnóstico presuntivo se señalan los métodos de tinción directa de frotis de biopsias, las pruebas de ureasa rápida y las de detección de anhídrido carbónico marcado con radioisótopos tras la administración oral de urea radioactiva. También se menciona la observación de bacilos curvados en cortes histológicos y la evaluación de anticuerpos séricos contra *H. pylori* como métodos de diagnóstico presuntivo para este agente. Como se indicó en la primera parte de esta revisión (14) *Helicobacter pylori* ha cobrado importancia desde su descripción en 1982, despertando interés a nivel mundial, debido a su asociación con la gastritis tipo B y las úlceras pépticas (39). Sin embargo, un escollo importante que debe salvarse en su investigación es el diagnóstico, para lo cual se requieren métodos efectivos y rápidos, que a la vez no tengan un costo elevado. El objetivo de esta revisión es indicar los métodos diagnósticos descritos para este agente, ha-

ciendo énfasis en los utilizados en algunos laboratorios costarricenses. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1989; 10(3):57-62].

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

La muestra ideal para aislar a este agente es la biopsia gástrica a nivel de antro. La combinación de muestras de antro y de cuerpo, y más aún, su maceración previa a la inoculación, aumenta las probabilidades de aislamiento (12). Por otra parte, los raspados de mucosa gástrica o el jugo gástrico no son recomendables para el aislamiento de esta bacteria, pues su nicho ecológico son los espacios intercelulares, manteniéndose unida a las células en contacto muy íntimo (14). Si se requiere transportar las muestras un buen medio es la solución salina fisiológica (5).

Los medios de cultivo recomendados son agar sangre, empleando de un 10 a 15 por ciento de sangre de carnero, caballo o humana, agar chocolate, medio de Skirrow, Thayer y Martin, caldo de Bützler (3, 12, 37) o infusión de cerebro y corazón enriquecido con 10 por ciento de suero de caballo (24). Incluso se han propuesto medios específicos como el *Campylobacter pylori* (7) o el Bello Horizonte (30); este último es un medio diferencial que contiene difeniltetrasolio, cuya reducción

* Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

** Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica.

por la acción bacteriana brinda una tonalidad dorada a la colonia. La incorporación de antibióticos a los medios de cultivo aumenta las probabilidades de aislamiento al eliminar contaminantes (12).

La atmósfera para el crecimiento de esta bacteria debe contener aproximadamente 5 por ciento de O₂, 15 por ciento de CO₂ y un 80 por ciento de N₂. Esto se logra con el sistema de evacuación y reemplazo, o con un sobre generador de H₂ y CO₂ tipo Gas Pak, en una jarra de anaerobiosis sin catalizador. Los platos inoculados deben incubarse a 37 °C durante un período de 3 a 5 días. Las colonias, a los 5 días de incubación, miden aproximadamente un 1 mm de diámetro, son convexas, transparentes, ligeramente beta hemolíticas, catalasa, oxidasa y ureasa positivas (4).

El aislamiento se corrobora mediante un frotis coloreado con la tinción de Gram, utilizando carbol fucsina recién filtrada en vez de safranina. La bacteria se observa como un bacilo gramnegativo, de aspecto curvado en forma de C, con extremos romos. Al microscopio electrónico se aprecia un mechón de 3 a 6 flagelos envainados en uno de los extremos del bacilo (9).

DIAGNOSTICO PRESUNTIVO RAPIDO

El diagnóstico presuntivo puede hacerse mediante varios métodos, cuyo objetivo es poner de manifiesto la bacteria en un tiempo menor del requerido por el cultivo. En orden lógico de realización estos métodos son el frotis por aposición del tejido gástrico, las pruebas de ureasa rápida y finalmente la prueba de la urea marcada con radioisótopos.

Para la tinción directa de frotis de biop-

sia, se hace un frotis por aposición del tejido en una lámina y se tiñe ya sea con el método de Gram (23) o con naranja de acridina (33). En ambas preparaciones se buscan grupos de bacilos curvados, en un caso gramnegativos y en el otro fluorescentes. Ambos métodos han sido evaluados y muestran una buena correlación con respecto al cultivo, cuya sensibilidad y especificidad oscilan entre el 85 y el 100 por ciento (23, 33).

Las pruebas de ureasa se basan en poner de manifiesto la ureasa preformada de esta bacteria, la cual es extremadamente activa. Esta enzima es capaz de hidrolizar la urea tan rápidamente, que vira el caldo de urea de Christensen al momento de ser inoculado. Basándose en esta propiedad se han ideado varios métodos de diagnóstico presuntivo, en los cuales se inocula el tejido de la biopsia, intacto o macerado, en una solución de urea del 2 al 6 por ciento, en el caldo de Christensen o en el medio "CLO test". En todo caso se utiliza el rojo de fenol al 0,2 por ciento como indicador de pH (5,6,8,20,22,26,29,31,34,35,38).

La prueba se basa en la hidrólisis bacteriana de la urea, con producción de CO₂ y NH₄, con lo cual se eleva el pH, haciendo virar el indicador de incoloro a rojo, lo que pone en evidencia a la bacteria.

Empleando el método descrito por Ruíz *et al.* (32), pero haciendo la lectura a los 10 minutos, se tiene una sensibilidad y una especificidad del 72 y 83 por ciento respectivamente, y un valor predictivo positivo del 92 por ciento. Sin embargo, el valor predictivo negativo es del 54 por ciento, lo que significa que la prueba es útil para el diagnóstico de los casos positivos, en tanto los negativos requieren su confirmación mediante cultivo (16).

La prueba de urea marcada con radioisótopos es otro de los métodos propuestos; que también se basa en la actividad de la ureasa bacteriana. Consiste en administrar oralmente al paciente una dosis de urea marcada con c^{13} (10, 11) o c^{14} (18), que representa el sustrato para la ureasa bacteriana. Treinta minutos más tarde, si el paciente tiene la bacteria, se detecta el CO_2 marcado con el radioisótopo en su aliento. La ventaja de este método es hacer un diagnóstico no invasivo, sin recurrir a la gastroscopía (10). Sin embargo, una desventaja es que requiere de equipo complejo y costoso (4).

DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO

Las primeras evidencias sobre la presencia de este agente fueron las observaciones histológicas de bacilos curvados similares a *Campylobacter*, realizadas en biopsias de pacientes con gastritis o úlceras pépticas. Tales hallazgos se hicieron en cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina y posteriormente se emplearon otras tinciones como Giemsa, Giménez (19) y Warthin-Starry (27). Uno de los últimos métodos propuestos es una modificación de la tinción de Ziehl Neelsen, que puede realizarse en 5 minutos (13). Independientemente de la tinción utilizada, se observan bacilos curvados localizados en los espacios intercelulares de las glándulas gástricas, principalmente a la altura del antro pilórico. Aunque en casos severos suelen encontrarse grandes cantidades de bacterias, lo recomendable es analizar por lo menos dos biopsias de antro, para reducir las probabilidades de error (27).

El hallazgo de bacterias con morfología similar a *H. pylori* podría señalarse sólo como un método de diagnóstico presuntivo (16); aunque su combinación con un método serológico, por ejemplo inmunoenzimático, lo convierten en una forma de diagnóstico definitivo (1).

Este agente está relacionado fuertemente con la presencia de algún tipo de gastritis inespecífica como las variedades crónica superficial, atrófica simple o complicada con metaplasia intestinal o bien con úlceras pépticas, ya sea gástricas o duodenales. Por lo tanto, en esas patologías es importante buscar este agente (39). Por ejemplo, en una muestra de 92 pacientes costarricenses, se encontró 62 muestras positivas por *H. pylori* mediante cultivo, el 40 por ciento presentaban algún tipo de gastritis, el 21 por ciento úlceras pépticas, el 9 por ciento cuadros malignos y el 3 por ciento eran pacientes sin alteraciones gástricas (15). La comparación del hallazgo de bacterias similares a *H. pylori* en cortes histológicos, con el aislamiento de ese agente, presenta una especificidad y sensibilidad de 71 y 73 por ciento respectivamente (15).

METODOS DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO

La detección de anticuerpos séricos, IgG o IgA, específicos contra *H. pylori* o contra algunas de sus proteínas, brinda otra posibilidad diagnóstica (28, 36). Ello se basa en los niveles altos de anticuerpos específicos contra esta bacteria, encontrados en los pacientes infectados; los que descienden al erradicarse la bacteria (36). Por el contrario, los individuos sanos son seronegativos (28).

Otro factor favorable en el diagnóstico serológico es la similitud antigénica de las diversas cepas estudiadas y que además, no presentan reacciones cruzadas con otras bacterias, incluyendo *Campylobacter jejuni* (17). Los antígenos utilizados son bacterias completas fijadas en formalina al uno por ciento o liofilizadas, bacterias sonicadas, extractos de glicina ácida e incluso la ureasa purificada. Esta última parece ser el mejor antígeno utilizado para fines diagnósticos (2).

Entre las pruebas serológicas más empleadas están las inmunoenzimáticas y las de fijación de complemento. Incluso se vende comercialmente un juego de reactivos para una prueba inmunoenzimática para detectar inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) anti *H. pylori* con fines diagnósticos.

CONCLUSION

Para cortar el ciclo de infección de un determinado agente es indispensable su identificación, no solo en los pacientes afectados sino también en los posibles portadores sanos e incluso en otros nichos anatómicos diferentes de aquel en el cual se manifiesta la enfermedad; además, deben identificarse las posibles vías de diseminación. En algunos casos, esto obliga a la puesta en marcha de métodos capaces de detectar cantidades ínfimas de antígenos. En el caso de *Helicobacter pylori* han habido importantes avances, como por ejemplo, la descripción reciente de una prueba de hibridización de ácidos nucleicos para la identificación de esta bacteria en especímenes pobremente positivos (25). Además, está la gama de métodos diagnósticos señalados en esta revisión, algunos de los cuales son relativamente simples y se utilizan en Costa Rica.

Por otra parte, el diagnóstico apropiado de este agente es indispensable para establecer un tratamiento antimicrobiano, en los pacientes que padecen gastritis o úlceras pépticas asociadas. Por este motivo es impostergable la puesta en práctica, e idealmente en forma rutinaria, de los métodos para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

The diagnostic methodology for Helicobacter pylori is reviewed, including the type of sample, culture media, and incubation conditions. As presumptive diagnostic methods, the use of biopsy smears stained with Gram or acridine orange, rapid urease tests, and radioisotope labelled urea breath test are cited. Histologic visualization of curved shaped bacteria, and evaluation of antibodies against H. pylori are used for its presumptive diagnosis.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, L. P., Holck, S., and Poulsen C.O. *Campylobacter pylori* detected by indirect immunohistochemical technique. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 1988; 96:559-564.
2. Bolton, F. J. and Hutchinson, D. N. Evaluation of three *Campylobacter pylori* antigens for screening sera from patients undergoing endoscopy. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42:723-726.
3. Buck, G. E. and Smith, J. S. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25:597-599.
4. Buck, G. E. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3:1-12.
5. Coudron, P. E. and Kirby, D. F. Comparison of rapid urease tests, staining techniques, and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:1527-1530.

6. Das, S.S., Bain, L.A., Karim, Q. N., Coelho, L. G. and Baron, J. H. Rapid diagnosis of *Campylobacter pyloridis* infections. *J. Clin. Pathol.* 1987; 40:701-702.
7. Dent, J.C., and McNulty, C.A.M. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1988; 7:555-558.
8. Dent, J. C., McNulty, C. A. M. Uff, J. S., Gear, M. W. G. and Wilkinson, S. P. *Campylobacter pylori* urease: A new serological test. *Lancet.* 1988; 1:1002.
9. Geis, G., Leying, H. Suerbaum, S. Mai, U. and Opperkuch, W. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 436-431.
10. Graham, D. Y., Klein, P. D., Evans, Jr. D. J., Evans, D. G. Alpert, L. C., Operkun, A. R. and Boutton, T. W. Alpert, L. C., Operkun, A. R. and Boutton, T. W. *Campylobacter pylori* detected by the ^{13}C urea breath test. *Lancet*, 1987; 1:1134-1177.
11. Grahn, D. Y., Klein, P. D., Operkun, A. R., Boutton, T. W. Effect of age on the frequency of active *Campylobacter pylori* infection diagnosed by the ^{13}C urea breath test in normal subjects and patients with peptic ulcer disease. *J. Infect. Dis.* 1988; 157:777-780.
12. Goodwin, C.S., Blincow, E.D., Warren, J.R., Waters, T. E. Sanderson, C.R. and Easton, L. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* 1985; 38:1127-1131.
13. Hawkins, J. A. and Gubbay, N. Cold Ziehl-Neelsen stain for *Campylobacter* in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 1989;42; 1309.
14. Hernández, F. y Rivera, P. *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) Un nuevo agente infeccioso relacionado con gastritis y úlceras pépticas. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1989; 10. En prensa.
15. Hernández, F., Rivera, P., Sigarán, M., Aguilar-Ortiz, M, Miranda, J., Rodríguez-Jenkins, O. and Murillo, M. The first cases of *Helicobacter pylori* reported from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1990 En prensa.
16. Hernández, F., Rivera, P, and Sigarán, M. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Comparison of an urease test, histological visualization of curved bacteria and culture. *Rev. Inst. Med. Sao Paulo.* 1990 En prensa.
17. Hook, J., Blomberg, B., Danielson, D. and Kosume, T. Detection of antibody responses in rabbits hyperimmunized with *Campylobacter pylori* *APMIS.* 1989: 97:56-60.
18. Marshal B. J. and Surveyor, T. Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *J. Nucl. Med.* 1988; 29:11-16.
19. McMullen, L., Walker, M.M., Baint, L.A., Karim, K. N. and Baron, J. H. Histological identification of *Campylobacter* using Gimenez Technique in gastric antral mucosa. *J. Clin. Pathol.* 1987: 40:464-465.
20. McNulty, C. A. M., and Wise, R. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *Lancet.* 1985; 1:1443-1444.
21. McNulty, C. A. M., and Wise, R. Rapid diagnosis of *Campylobacter pyloridis* gastritis. *Lancet.* 1987; 1:387.
22. McNulty, C. A. M., and Dent, J. C. Rapid identification of *Campylobacter pylori* (*C. pyloridis*) by preformed enzymes. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25:1683-1686.
23. Montgomery, E.A., Martin, D. F. and Peura, D. A. Rapid diagnosis of *Campylobacter pylori* by Gram's stain. *Am J. Clin. Path.* 1988; 90:606-609.
24. Morgan, D. R., Freedman, R., Depew, C. E and Kraft, W. G. Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25:2123-2125.
25. Morotomi, M., Hoshina, S., Green, P. Neu, H. C. LoGerfo, P. Watanabe, I. and Mutain, M. Oligonucleotide probe for detection and identification of *Campylobacter pylori* *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:2652-2655.
26. Morris, A., McIntyre, D., Rose, T. and Nicholson, G. Rapid diagnosis of *Campylo-*

bacter pyloridis infection. *Lancet*. 1986; 1:149.

27. Morris, A. Ali, M. R., Brown, P., Lane, M. and Patton, K. *Campylobacter pylori* infection in biopsy specimens of gastric antrum: Laboratory diagnosis and estimation of sampling error. *J. Clin. Pathol.* 1989; 42:727-732.
28. Musgrove, C. Bolton, F. J. Krypczyk, A.M., Temperley, J.M. Cairns, S. A., Owen, W. G. and Hutchinson, D. N. *Campylobacter pylori*: clinical, histological, and serological studies. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41 :1316-1321.
29. Owen, R. J., Martín, S. R. and Borman, P. Rapid urea hydrolysis by gastric *Campylobacter* *Lancet* 1985; 1:111.
30. Queiroz, D. M. M., Mendes, E. N. and Rocha, G. A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 2378-2379.
31. Riard, P., Hostein, J., Croize, J., Bourguignon, G. LeMarc'Hadour, F., Faure, H. and Fournet, J. Le *Campylobacter pylori*: valeur diagnostique de l'urease test pratique en salle d'endoscopie. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1989; 13:8-13.
32. Ruíz, B., Aileen, J., Stavros, D. and Correa, P. One minute test for *Campylobacter pylori*. *Amer. J. Gastroenterol.* 1989; 84:202.
33. Sodervik, H. J., Raisanen, S., Apaja-Sarkkinen, M. Kairaluoma, M. I. Microabscesse in gastric biopsies shown by acridine orange staining. *Scand. J. Infect. Dis.* 1988; 20:553-557.
34. Vaira, D., Holton, J., Ciarns, S., Polydorou, A., Falzon, M., Dowsett, J. and Salmon, P.R. Four hour rapid urease test (RUT) for detection of *Campylobacter pylori* is it reliable enough to start treatment? *J. Clin. Pathol.* 1988; 41:335-336.
35. Vaira, D., Holton, J., Cairns, S., Polydorou, A., Falzon, M., Dowsett, J. and Salmon, P. Urease tests for *Campylobacter pylori* care in interpretation. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41:812-813.
36. Van Bohemen, Ch. G., Langerber, L. M., Rauws, E. A. J., Oudbier, J., Weterings, E. and Zanen, H. C. Rapidly decreased serum IgG to *Campylobacter pylori* following elimination of *Campylobacter* in histohogical chronic biopsy *Campylobacter*-positive gastritis. *Immunol. Lett.* 1989; 20:59-62.
37. Westblom, T. U.; E. Madan; B. R. Midkiff; V. W. Adkins, & M A. Sukik, 1988. Failure of *Campylobacter pylori* to grow in commercial blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 26:1029-1030.
38. Westblom, T. U., Madan; E., Kemp, J. and Sukik, M. A. Evaluation of a rapid urease test to detect *Campylobacter pylori* infection. *J. Clin Microbiol.* 1988; 26:1393-1394.
39. Yardley, J. H. & Paull, G. *Campylobacter pylori*: A newly recognized agent in the gastrointestinal tract. *Amor. J. Surg. Pathol.* 1988; 12:89-99.