



FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

AZUL DE METILENO DE HAMA EN COMPARACIÓN CON DOS
COLORACIONES PARA IDENTIFICAR HELICOBACTER PYLORI

Línea de investigación:

Microbiología y parasitología

Tesis para optar el Título de especialista en Histotecnología

Autor:

Ramirez Ubillus, Gian Carlos

Asesor:

Rojas León, Roberto Eugenio

ORCID: 0000-0002-5803-9659

Jurado:

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique

Lagos Castillos, Moraima Angelica

Astete Medrano, Delia Jessica

Lima - Perú

2022

Referencia:

Ramirez, U. (2022). *Azul de metileno de hama en comparación con dos coloraciones para identificar helicobacter pylori* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5903>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

AZUL DE METILENO DE HAMA EN COMPARACIÓN CON DOS COLORACIONES PARA IDENTIFICAR HELICOBACTER PYLORI

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN HISTOTECNOLOGÍA

Autor

Ramirez Ubillus, Gian Carlos

Asesor

Rojas León, Roberto Eugenio
(ORCID: 0000-0002-5803-9659)

Jurado

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique
Lagos Castillos, Moraima Angelica
Astete Medrano, Delia Jessica

Lima – Perú

2022

Dedicatoria

A mis padres por estar siempre a mi lado.

A mis hermanos y familia por su constante apoyo.

A Gissell, por haberme devuelto la confianza e iluminar mi camino nuevamente.

Agradecimientos

A mis maestros, Eduardo Sedano y Ricardo Neira, por las enseñanzas constantes y consejos
en el campo profesional y personal.

A Joel, Virna y a todo el personal del servicio de anatomía patológica del hospital María
Auxiliadora, por haber contribuido en mi formación formidablemente.

Al Mg. Carlos Ricardo Neira Montoya, por su apoyo en la elaboración de las láminas
histológicas; a los anatomopatólogos Mg. Mercedes del Pilar Bravo Taxa, y Mg. Renier
Cesar Cruz Baca, por el apoyo en la lectura de las láminas histológicas; al Dr. Luis Taxa
Rojas, por haber permitido la ejecución de esta investigación en su laboratorio.

A la empresa BIOSIX, por la donación de los colorantes y escaneo de las láminas.

Resumen

Objetivo: Determinar la concordancia interobservador y capacidad diagnóstica del azul de metileno de HAMA (AM-HAMA) en comparación con dos métodos de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori*. **Método:** Estudio transversal que evaluó 99 bloques de parafina de biopsias gástricas almacenadas en un laboratorio privado. Se elaboraron tres cortes por cada bloque, y se aplicaron los métodos de coloración de Hematoxilina-Eosina (HE), GIEMSA, y AM-HAMA. Se calcularon, principalmente, los estadísticos Kappa y la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud. **Resultados:** La coloración AM-HAMA obtuvo la mayor concordancia interobservador (Kappa=0.87) en comparación con los otros dos métodos (HE, Kappa=0.51; GIEMSA, Kappa=0.83). También, obtuvo la mejor sensibilidad, valor predictivo y razón de verosimilitud negativas (97.1%, 98.3%, 0.03, respectivamente), en comparación con los otros dos métodos (HE: 68.6%, 85.1%, 0.32, respectivamente; GIEMSA: 88.6%, 93.9%, 0.12, respectivamente). No obstante, obtuvo la menor especificidad, valor predictivo y razón de verosimilitud positivos (92.2%, 87.2%, 12.45, respectivamente) en comparación con los otros dos métodos (HE: 98.4%, 96%, 42.88, respectivamente; GIEMSA: 96.9%, 93.9%, 28.88, respectivamente). **Conclusiones:** Dada la fiabilidad estadística de este nuevo método, y sus características propias (muy rápido, barato, accesible, y simple en su aplicación), sería el ideal para tomar en cuenta, adicional al de rutina (Hematoxilina-Eosina), en los laboratorios de Histotecnología o de Anatomía Patológica.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, coloraciones azules, técnicas histológicas.

Abstract

Objective: To determine the interobserver agreement and diagnostic capacity of HAMA methylene blue (AM-HAMA) in comparison with two staining methods for the identification of *Helicobacter pylori*. **Method:** Cross-sectional study that evaluated 99 paraffin blocks of gastric biopsies stored in a private laboratory. Three sections were made for each block, and the Hematoxylin-Eosin (HE), GIEMSA, and AM-HAMA staining methods were applied. Mainly, Kappa statistics and sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios were calculated. **Results:** AM-HAMA staining obtained the highest interobserver agreement (Kappa=0.87) compared to the other two methods (HE, Kappa=0.51; GIEMSA, Kappa=0.83). Also, it obtained the best negative sensitivity, predictive value and likelihood ratio (97.1%, 98.3%, 0.03, respectively), compared to the other two methods (HE: 68.6%, 85.1%, 0.32, respectively; GIEMSA: 88.6%, 93.9%, 0.12, respectively). However, it obtained the lowest positive specificity, predictive value and likelihood ratio (92.2%, 87.2%, 12.45, respectively) compared to the other two methods (HE: 98.4%, 96%, 42.88, respectively; GIEMSA: 96.9%, 93.9%, 28.88, respectively). **Conclusions:** Given the statistical reliability of this new method, and its own characteristics (very fast, cheap, accessible, and simple in its application), it would be the ideal one to consider, in addition to the routine one (Hematoxylin-Eosin), in Histotechnology or Pathological Anatomy laboratories.

Keywords: Helicobacter pylori, azure stains, histological techniques.

Índice

I. Introducción	1
1.1. Descripción y Formulación del Problema	2
1.2. Antecedentes	3
1.3. Objetivos	6
- Objetivo General	6
- Objetivos Específicos	6
1.4. Justificación	6
1.5. Hipótesis	8
II. Marco Teórico	9
2.1. Bases Teóricas sobre el Tema de Investigación	9
III. Método	16
3.1. Tipo de Investigación	16
3.2. Ámbito Temporal y Espacial	16
3.3. Variables	16
3.4. Población y Muestra	16
3.5. Instrumentos	18
3.6. Procedimientos	18
3.7. Análisis de Datos	20
3.8. Consideraciones Éticas	21
IV. Resultados	22
V. Discusión de Resultados	32
VI. Conclusiones	37
VII. Recomendaciones	38
VIII. Referencias	39
IX. Anexos	46

I. Introducción

Actualmente, existen diversos métodos para la identificación de *Helicobacter pylori*, los cuales, así como presentan múltiples ventajas, también hay ciertos inconvenientes. Por ese motivo, no se ha establecido un Gold Standard a base de una sola prueba, de hecho, se sugiere aplicar por lo menos dos métodos diagnósticos para llegar a una conclusión sobre la presencia de esta bacteria.

Existen pruebas que son los de elección, no solo por sus altos valores de sensibilidad y especificidad, sino también por la mejor imagen que se genera para esta bacteria, lo que disminuye el tiempo de lectura por parte del experto, como son la inmunohistoquímica y la impregnación argéntica de Warthin-Starry.

No obstante, de qué vale que se tenga una muy buena capacidad diagnóstica, si estos métodos serán muy complicados de poder aplicarlos en la rutina diaria, porque sus desventajas son mayores a los aspectos relevantes, como lo son el presentar reactivos inaccesibles (alto costo) y protocolos de ejecución complejos.

Entonces, esta investigación desarrolló la validación de un método de identificación para *Helicobacter pylori* en base a un nuevo colorante que sobrepasó los inconvenientes de otros métodos de coloración mencionados en el párrafo anterior.

Para ello, se diseñó un estudio transversal que buscó comparar los estadísticos de capacidad diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud) y concordancia interobservador (a través del estadístico Kappa convencional y ajustado) de este nuevo método de coloración con otros dos convencionales en bloques de parafina de biopsias provenientes de un laboratorio privado, llegando a la conclusión que se obtuvo la mejor fiabilidad estadística para esta nueva coloración para la identificación de *Helicobacter pylori*.

1.1. Descripción y formulación del problema

Helicobacter pylori es una bacteria gran negativa, en forma de espiral, y cuya principal afección en el ser humano, es su colonización en el epitelio gástrico (Garg et al., 2012). Esta fue descubierta en 1983 por Warren y Marshall en la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica activa y úlcera péptica (Marshall, 2008).

En general, se estima que más de la mitad de la población mundial se encuentra infectada con esta bacteria (Bamanikar et al., 2018). No obstante, la prevalencia de infección puede variar considerablemente entre diversos grupos poblacionales, siendo los principales factores de riesgo: El nivel socioeconómico, la edad, el estado de fumador, alcoholismo y una dieta con exceso en sal y de carnes ahumadas, asadas o procesadas (González y Rodríguez, 2011).

El diagnóstico de esta infección puede realizarse mediante métodos no invasivos e invasivos. El primero se realiza como método de screening o de tamizaje en diferentes tipos de muestra como sangre, esputo, heces y aliento. Por otro lado, el segundo se utiliza como método confirmatorio, y, para ello, se necesita la realización de endoscopías para la toma de biopsias gástricas (Ramírez y Sánchez, 2009).

En este segundo grupo, se pueden ejecutar diversas pruebas de laboratorio como el test rápido de la ureasa, cultivo, reacción en cadena de la polimerasa, y coloraciones histopatológicas como la Hematoxilina-Eosina, Giemsa, Warthin-Starry, Wayson e inmunohistoquímica (Lee y Kim, 2015).

Siendo el método de coloración Hematoxilina-Eosina, el convencional para cualquier laboratorio de Histotecnología o de anatomía patológica. dado que no solo provee información sobre la presencia de *Helicobacter pylori* (de un color morado pálido), sino también, sobre otras patologías coexistentes, como la presencia de gastritis activa, metaplasia intestinal, displasia, entre otros. En segunda instancia, el de preferencia es el método de coloración de

Giemsa, el cual, provee también información sobre la presencia de esta bacteria (de color azul claro), y también sobre las otras patologías descritas, dado que también está compuesto por una mezcla de colorantes básicos y ácidos, así como la Hematoxilina-Eosina (Batts et al., 2013).

No obstante, tanto para estos dos métodos de coloración, como para otros secundarios (Warthin-Starry, Wayson e inmunohistoquímica), el alto costo, tiempos prolongados de los protocolos de ejecución, complejidad en la aplicación, toxicidad y accesibilidad limitada para algunos de los reactivos que forman parte de estos métodos de coloración, ha generado heterogeneidad para la elección entre uno u otro, independientemente de la fiabilidad estadística de los resultados.

Por los motivos mencionados, esta tesis formuló el siguiente problema:

¿Cuál será la concordancia interobservador y capacidad diagnóstica del azul de metileno de HAMA en comparación con dos métodos de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori* en bloques de parafina de biopsias gástricas?

1.2. Antecedentes

Chi et al., (2020) en el estudio cuyo objetivo fue “Comparar una nueva modificación de la coloración Giemsa con la prueba rápida de la ureasa para la identificación de *Helicobacter pylori*”. Este estudio transversal evaluó 233 bloques de parafina de biopsias gástricas provenientes del departamento de patología del Hospital Mackay, Taipei, Taiwán. Los resultados principales fueron que la tinción de Giemsa modificada obtuvo una mayor detección de *Helicobacter pylori* que la prueba rápida de la ureasa (48,1% vs 43,7%), y que esta nueva modificación, finalmente, presentó una sensibilidad del 91% y una especificidad del 100% en comparación con la prueba rápida de la ureasa. La conclusión fue que esta nueva modificación de la coloración de Giemsa fue comparable con la prueba rápida de la ureasa, con las ventajas de que es más simple y ahorra más tiempo que la tradicional (Chi et al., 2020).

Alkhamiss et al., (2020) en el estudio cuyo objetivo fue “Evaluar un nuevo método de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas”. Este estudio transversal evaluó 49 bloques de parafina de biopsias gástricas provenientes del servicio de anatomía patológica en un hospital de nivel III en Arabia Saudita. El nuevo método (NM) para la identificación de *Helicobacter pylori* (H.P) se basó en la combinación de la tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS) y tinción de Alcian Blue, y se la comparó con la tinción de Giemsa. Los resultados principales fueron que solo 15 biopsias mostraron gastritis activa, mientras que el resto mostró gastritis crónica, y 3 biopsias mostraron metaplasia intestinal. Todos estos fueron detectados por el NM. No obstante, este NM mostró bajos resultados para la detección de H.P, solo un 40% de sensibilidad y un 67,65% de especificidad en comparación con el Giemsa. La conclusión fue que este nuevo método de coloración no presentó los resultados esperados, y por lo tanto, no es recomendable como reemplazo de otros métodos de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori* (Alkhamiss, 2020).

Farouk et al., (2018) en el estudio cuyo objetivo fue “Comparar una nueva modificación de la tinción de Warthin Starry con la inmunohistoquímica para la identificación de *Helicobacter pylori*”. Este estudio transversal evaluó 104 bloques de parafina de biopsias gástricas provenientes del Instituto de Ciencias Médicas y Tecnología, Malasia. Los resultados principales fueron que esta nueva modificación de la tinción de Warthin Starry (WS) presentó una menor sensibilidad en comparación con la inmunohistoquímica (IHQ), luego, todos los demás estadísticos fueron comparables. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo fueron, respectivamente, 50%, 92.4%, 79.2%, 76.3%. La conclusión fue que el único parámetro no aceptable para esta nueva modificación de WS sería la sensibilidad. Se identificaron varios factores externos que podrían influir en los resultados. Sin embargo, se necesitaría información suficiente sobre el historial de tratamiento y medicación de los pacientes, así como también otros estudios que puedan corroborar ello (Farouk et al., 2018).

Himani et al., (2013) en el estudio cuyo objetivo fue “Comparar una nueva modificación de la coloración de Gram con diversas coloraciones especiales y la reacción en cada de la polimerasa para la identificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas”. Este estudio transversal evaluó 436 bloques de parafina de biopsias gástricas provenientes del servicio de anatomía patológica de un hospital nivel III, India. Los resultados principales fueron que de los 60 casos positivos por el método de referencia (3 pruebas positivas por diferentes métodos), las tinciones de Warthin-Starry, Hematoxilina-Eosina (H-E) y Giemsa mostraron un 100% de sensibilidad y valor predictivo negativo (VPN), mientras que solo 55 de los 60 fueron confirmados mediante la nueva modificación de la coloración Gram. Finalmente, la especificidad de H-E fue un poco mejor (87,9%) que Warthin-Starry (84,5%) y Giemsa (84,5%). La conclusión fue que en un laboratorio donde no se dispone de una instalación de PCR (que es prácticamente en la mayoría), la aplicación de los diversos métodos de coloración aplicados pueden ser sustitutos adecuados, dado los valores diagnósticos mostrados, incluyendo la nueva modificación de la coloración Gram, con las ventajas de que este último es asequible y simple (Himani et al., 2013).

Trakarnvanich, (2007) en el estudio cuyo objetivo fue “Comparar una nueva coloración en comparación con Giemsa para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas”. Este estudio transversal evaluó 236 bloques de parafina de biopsias gástricas provenientes del servicio de anatomía patológica del hospital general de Bangkok, Tailandia. La nueva coloración fue el azul de metileno al 1%, dado que esa coloración no ha sido probada para la identificación de H.P. anteriormente. Los resultados principales fueron que, ambas tinciones Giemsa (GM) y Azul de metileno (AM) tuvieron 51 casos positivos de HP y 181 negativos. Se encontraron solo 4 casos discordantes, de los cuales, dos solo fueron positivos para GM y negativos para AM; los otros dos restantes, viceversa. Esto generó una concordancia del 98,3% y una discordancia del 1,7%. Entonces, existe una buena concordancia entre ambas (valor

Kappa = 0,951, $p < 0,05$). La conclusión fue que esta coloración de AM puede sustituir a la convencional (GM), con las ventajas de que es más rentable, requiere menos tiempo para su ejecución, y presenta un protocolo más simple (Trakarnvanich, 2007).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar la concordancia interobservador y capacidad diagnóstica del azul de metileno de HAMA en comparación con dos métodos de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori* en bloques de parafina de biopsias gástricas.

1.3.2. Objetivos específicos

Precisar los valores del estadístico Kappa interobservador convencional y ajustado del azul de metileno de HAMA y de los otros dos métodos de coloración (Giemsa y Hematoxilina-Eosina) para la identificación de *Helicobacter pylori* en bloques de parafina de biopsias gástricas.

Calcular los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, y razones de verosimilitud del azul de metileno de HAMA y de los otros dos métodos de coloración (Giemsa y Hematoxilina-Eosina), en comparación con el Gold Standard, para la identificación de *Helicobacter pylori* en bloques de parafina de biopsias gástricas.

Establecer si el reporte de la presencia de *Helicobacter pylori* por alguno de estos métodos de coloración, en comparación con el Gold Standard, es afectado por la presencia/grado de alguna patología gástrica coexistente o zona gástrica evaluada.

1.4. Justificación

La presencia de *Helicobacter pylori* es considerada un factor de progresión dentro del camino causal hacia el cáncer gástrico más común, el cual, es el adenocarcinoma (hasta en el 90% de los pacientes). Su presencia promueve el avance para las siguientes fases: gastritis

crónica sin atrofia, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia gástrica y finalmente, cáncer gástrico (Ramirez, 2021).

En ese sentido, la identificación de esta bacteria es de suma importancia para un tratamiento oportuno. Por ese motivo, los rangos de sensibilidad (S) y especificidad (E) reportados de diferentes métodos de coloración son los siguientes: Hematoxilina-Eosina (S: 44.7% – 83%, E: 75% – 100%); Giemsa (S: 62% – 92.1%, E: 88.8% – 100%); Warthin-Starry (S: 62% – 97%, E: 85.7% – 98%); Inmunohistoquímica (S: 97% – 98.8%, E: 99.2% – 100%) (Ahmad et al., 2011; Ali, 2016; Bamanikar et al., 2018; Farouk et al., 2018; Hartman y Owens, 2012; Kocsmár et al., 2017; Marín et al., 1996; Pranjali y Kalpana, 2015).

De las referencias y datos mostrados en el párrafo anterior, se desprenden las siguientes ventajas y desventajas: Hematoxilina-Eosina, a pesar de que es la que rutinariamente se realiza, puede llegar a presentar una baja sensibilidad; Giemsa, presenta una sensibilidad y especificidad aceptables, asimismo, es una técnica simple (pocos pasos a seguir durante su ejecución), pero los protocolos de ejecución son relativamente extensos (desde 45 minutos hasta 24 horas) dependiendo de la técnica escogida (autor), además de presentar un costo relativamente alto; Warthin-Starry, presenta una muy buena especificidad y una sensibilidad aceptable, pero con una reproducibilidad variable (muchos pasos a seguir durante su ejecución y con protocolos heterogéneos), además de presentar un costo alto; Inmunohistoquímica, presenta una muy buena sensibilidad y especificidad, pero es la prueba más cara de todas dentro de este grupo de comparación, lo que conlleva que en la práctica diaria sea muy infrecuente su aplicación.

Todo esto ha originado que, actualmente, no se considere un único estándar de oro para la identificación de *Helicobacter pylori*. Por ese motivo, el Grupo Europeo para el estudio de *Helicobacter pylori* sugiere que se tome como algoritmo de referencia, por lo menos dos pruebas positivas, y con mayor énfasis, en las invasivas (Malfertheiner et al., 2002). No

obstante, esto no ha sido tomado en cuenta en los estudios anteriormente citados, lo que generaría que los resultados reportados por estas investigaciones probablemente estén sesgados.

Por lo tanto, es necesario un nuevo método de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori* que supere todas estas desventajas, y que, al mismo tiempo, genere resultados comparables con el algoritmo de referencia. En ese sentido, se propone al Azul de Metileno de HAMA, un método de coloración creado por el autor principal de este proyecto de investigación, el cual, estaría al alcance de cualquier laboratorio de Histotecnología o anatomía patológica (su composición consta de azul de metileno, el colorante histológico más barato de todos; y bicarbonato de sodio, el cual, también es barato y bastante accesible, ya que se usa tanto a nivel industrial como doméstico), además de presentar un protocolo de tinción muy rápido (dos segundos).

Adicionalmente, existen reportes de que la procedencia de la biopsia gástrica (Prachasilpchai et al., 2007), y la presencia de patologías coexistentes (como el nivel de actividad inflamatoria) (Boldt et al., 2015; Hartman y Owens, 2012; Kocsmár et al., 2017; Pranjal y Kalpana, 2015), no afectan la identificación de esta bacteria mediante la aplicación de los métodos de coloración Hematoxilina-Eosina y Giemsa. No obstante, no se comparó con el Gold Standard sugerido anteriormente, ni tampoco se ha dilucidado esto para más características gástricas. En ese sentido, la presente investigación también fue utilizada para ampliar esta evidencia científica.

1.5. Hipótesis

La concordancia y capacidad diagnóstica del azul de metileno de HAMA serán iguales o mayores en comparación con dos métodos de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori* en bloques de parafina de biopsias gástricas.

II. Marco Teórico

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Helicobacter pylori*

2.1.1.1. Características. *Helicobacter pylori* es una bacteria de forma espiral, microaerofílica, gramnegativa, que se observa con terminales redondeados en biopsias gástricas, en un medio de cultivo sólido tiene forma de varilla y luego de un cultivo prolongado en medio sólido o líquido predominan las formas cocoides. Se dice que posiblemente las primeras observaciones de esta bacteria se remontan a más de un siglo de antigüedad cuando Giulio Bizzozero describió bacterias en el estómago de perros sanos (Cava y Cobas, 2003).

El patólogo australiano Robin Warren observó la bacteria por primera vez el 11 de junio de 1979 en una preparación de mucosa gástrica con gastritis crónica activa, trabajó con la coloración de Gram y de Warthin-Starry, y consiguió diferenciar las bacterias de las células epiteliales. En 1981, Barry Marshall se une como colaborador en investigación del trabajo de Warren (Pajares y Gisbert, 2006).

En 1983, Robin Warren escribió una publicación inédita donde exponía múltiples casos clínicos en los que aparecía una bacteria con forma de espiral, se le asociaba a gastritis crónica. Posteriormente en 1984, Barry Marshall y Robin Warren escribieron juntos los relatos sobre bacilos curvados o espirales gramnegativos y flagelados encontrados en 58 de 100 pacientes, se creía que se trataba de una nueva especie del género *Campylobacter* (Cava y Cobas, 2003).

Esta nueva bacteria fue incluida en la especie *Campylobacter* de forma provisional, pero difería con los miembros del grupo en: la presencia de múltiples flagelos en uno de los extremos y su gran contenido de enzima ureasa, el contenido de guanina y citosina del ADN bacteriano mostraba una proporción de guanina y citosina de 35-38%, lo cual era más parecido al género *Helicobacter*; y es en 1989, con la base científica de los datos obtenidos a lo largo de

muchas investigaciones, que se publica un artículo donde se exponen los hechos que avalaron el cambio de nombre de *Campylobacter* a *Helicobacter pylori* (Pajares y Gisbert, 2006).

2.1.1.2. Importancia clínica. El papel etiológico de *Helicobacter pylori* en la gastritis y úlcera péptica se debe a que esta bacteria es capaz de sobrevivir a la acidez gástrica a través de la acción de la ureasa, ya que esta enzima convierte la urea del lumen gástrico en dióxido de carbono y amoníaco alcalinizando el medio, estando ya en el lumen gástrico se moviliza a través del mucus y alcanza la superficie apical de las células del epitelio gástrico (Bermúdez et al., 2009).

El mecanismo exacto de transmisión de esta bacteria no es conocido, sin embargo, la vía de contagio más aceptada es de persona a persona por contacto oral-oral, fecal-oral o ambas. En los países menos desarrollados la vía es fundamentalmente fecal-oral, en algunos casos por consumo de agua no potable o contaminada, en los países más desarrollados la vía de contagio más probable es la oral o la gastro-oral (por ejemplo, a través del vómito) (Gisbert y Calvet, 2006).

Todos los individuos infectados por *Helicobacter pylori* son asintomáticos y desarrollan gastritis, una pangastritis o una gastritis de predominio antral. La infección por *Helicobacter pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica debido a que la inflamación que produce es persistente y ocasiona cambios moleculares contribuyendo a la inestabilidad de epitelio (Bermúdez et al., 2009).

Se ha relacionado la infección por esta bacteria con el desarrollo del linfoma de MALT así como también se ha sugerido que una explicación de los síntomas en los pacientes con dispepsia funcional e infección por *Helicobacter pylori* puede residir en que existe una liberación de sustancias inflamatorias afectando la función motora proximal del estómago (Bermúdez et al., 2009; M. González y Concepción, 2002).

2.1.1.3. Métodos de identificación.

A. No invasivos. La serología demuestra la exposición al microorganismo por parte del hospedero, tiene sensibilidad y especificidad variable de acuerdo con el kit usado, no detectan infección activa por esta razón no puede utilizarse para monitorizar la terapia. Su mayor utilidad es en estudios poblacionales de prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* (Bermúdez et al., 2009).

Las pruebas de antígeno en deposiciones son técnicas de inmunoensayo enzimático en algunas marcas, en otras son pruebas inmunocromatográficas rápidas. Estas pruebas usan anticuerpos monoclonales o policlonales. Es fácil de implementar en diferentes centros y la toma de muestra puede realizarse en el mismo domicilio del paciente. El antígeno en deposiciones brinda un buen rendimiento diagnóstico para el control de la erradicación de la bacteria postratamiento (Bermúdez et al., 2009).

La prueba de aire aspirado se realiza mediante la ingesta de urea marcada con ^{13}C o ^{14}C ; si la bacteria está presente la enzima ureasa libera CO_2 marcado con el isótopo lo que es medido y comparado con un valor basal. Esta prueba muestra una sensibilidad y especificidad mayor de 90% generalmente. Su ventaja radica en ser una prueba usada para evaluar la erradicación de *Helicobacter pylori* por su gran rendimiento diagnóstico (Bermúdez et al., 2009).

B. Invasivos. La prueba rápida de ureasa es una prueba indirecta, detecta la infección activa por *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica, requiere de una biopsia gástrica la cual se añade a un dispositivo donde se une a la urea presente, se detectan los productos de la hidrólisis, amonio o dióxido de carbono por la acción de la ureasa presente en la bacteria. Un resultado positivo requiere de 10^5 bacterias en la muestra, la velocidad de reacción depende de la carga bacteriana y la temperatura (Bermúdez et al., 2009).

La histología informa la presencia de la bacteria y permite evaluar el grado de evolución mediante la evaluación de muestras de biopsia gástrica a cargo de un patólogo, con la aplicación de algunas tinciones tales como hematoxilina-eosina, Genta, Warthin-Starry de plata y Giemsa. La tinción de Giemsa modificada es más barata y reproducible, podría tener una buena especificidad. El protocolo de Sydney modificado el cual se usa como estándar para reportar la gastritis incluye 2 biopsias de antro, 1 de ángulo y 2 de cuerpo gástrico. La sensibilidad puede disminuir por el uso de inhibidores de bomba de protones (Bermúdez et al., 2009).

El cultivo se puede realizar a partir de biopsias gástricas, el microorganismo requiere de un ambiente microaerofílico. Permite estudiar la susceptibilidad antibiótica, facilita la guía para el tratamiento (Bermúdez et al., 2009).

La más usada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite la detección de la bacteria, evaluar genes patógenos y específicos para la resistencia a antimicrobianos. Una ventaja es que se puede extraer la muestra de la biopsia utilizada para la prueba rápida de ureasa. Algunos estudios han demostrado su sensibilidad en un 100% y especificidad de 98% (Bermúdez et al., 2009).

2.1.2. Concordancia y el coeficiente kappa

La concordancia es definida como el grado en que dos o más observadores o métodos coinciden en el reporte del mismo fenómeno. Este concepto es relevante cuando se desea conocer si mediante un método nuevo, diferente al convencional, se consiguen resultados equivalentes, con el fin último de que uno y otro puedan ser reemplazados o intercambiados, dado por características propias como la rapidez para su ejecución, menor costo o es más seguro para el paciente, entre otros motivos (McHugh, 2012).

En una investigación donde se está midiendo la concordancia, se produce un efecto de controlar la variación en la característica observada mientras se determina el grado de acuerdo entre 2 o más observadores, o métodos. Es probable que el acuerdo se dé por efecto del azar,

propriadamente, y bajo esta premisa, se han creado métodos estadísticos que estiman el grado de acuerdo posterior al control del efecto del azar, siendo el más importante, el estadístico Kappa o Kappa de Cohen, debido a que, con mayor frecuencia, los diversos estudios pretenden estudiar fenómenos que se expresan de forma cualitativa (McHugh, 2012).

Jacob Cohen desarrolló la estadística clave para medir la confiabilidad entre evaluadores. En 1960, este investigador señaló que es probable que exista algún nivel de acuerdo entre las personas que recolectan algún tipo de información cuando no saben la respuesta correcta, pero esto sería simplemente por el azar, o lo que sería lo mismo, por estar adivinando. En ese sentido, presentó la hipótesis de que un cierto número de suposiciones sería congruente, y que las medidas estadísticas de confiabilidad deberían reportar ese acuerdo aleatorio, y, es por ello, que desarrolló el estadístico Kappa como una herramienta para controlar ese factor de concordancia aleatoria o ajustar el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada (McHugh, 2012).

El estadístico Kappa de Cohen es simbolizada por la letra griega minúscula “ κ ”; es una medida estadística importante y útil para pruebas de confiabilidad entre evaluadores o intraevaluadores. Este es un valor estandarizado que puede oscilar entre -1 y +1, donde 0 representa la cantidad de acuerdo que se puede presentar del azar, y 1 representa el acuerdo perfecto. La interpretación más adecuada tomando en cuenta estos valores, es la siguiente (McHugh, 2012):

- Valor de Kappa entre 0 – 0.20, ningún nivel de acuerdo o concordancia.
- Valor de Kappa entre 0.21 – 0.39, concordancia mínima.
- Valor de Kappa entre 0.40 – 0.59, concordancia débil.
- Valor de Kappa entre 0.60 – 0.79, concordancia moderada.
- Valor de Kappa entre 0.80 – 0.90, concordancia fuerte.
- Valor de Kappa por encima de 0.90, concordancia casi perfecta.

2.1.3. Capacidad diagnóstica

Una prueba diagnóstica se refiere a cualquier método para obtener información adicional del estado de salud del paciente. El tipo de información adquirida mediante la utilización de una prueba diagnóstica no sólo incluye a la presencia o ausencia de una determinada enfermedad, sino que también a la estratificación de una enfermedad conocida o bien a establecer la existencia de determinada condición, no necesariamente patológica (Bossuyt et al., 2003).

Los resultados obtenidos con la prueba diagnóstica en evaluación se comparan con los de un estándar de referencia en un mismo grupo de pacientes. El estándar de referencia, también llamado “estándar de oro”, corresponde, en resumen, a la mejor manera disponible y ampliamente aceptada para establecer la presencia o ausencia de determinada condición. Este puede ser un único examen, o bien, una combinación de métodos (estándar de oro compuesto). El término exactitud se refiere precisamente a la concordancia entre los resultados de la prueba diagnóstica con el estándar de referencia (Bossuyt et al., 2003).

La utilidad de las pruebas diagnósticas generalmente se describe y/o cuantifica en términos de su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y likelihood ratios (razones de verosimilitud) positivo y negativo. La sensibilidad corresponde a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con la condición o enfermedad por la prueba diagnóstica. En otras palabras, la proporción de verdaderos positivos correctamente identificados por la prueba, con respecto al total de individuos enfermos según el estándar de referencia (Altman y Bland, 1994).

Por otro lado, la especificidad corresponde a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con ausencia de la condición o enfermedad por la prueba diagnóstica en estudio. Vale decir, es la proporción de verdaderos negativos que fueron correctamente identificados

por la prueba, con respecto al total de individuos sanos según el estándar de referencia (Altman y Bland, 1994).

La sensibilidad y la especificidad son medidas importantes de la exactitud diagnóstica de una prueba, pero no pueden ser usadas para estimar la probabilidad de enfermedad en un paciente individual. Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) proporcionan estimaciones de la probabilidad de la enfermedad. En otras palabras, es la probabilidad de que la prueba diagnóstica entregue el diagnóstico correcto, si esta resulta positiva o negativa (Bravo y Cruz, 2015).

El valor predictivo positivo corresponde a la probabilidad condicional de que el paciente tenga la enfermedad, dado que la prueba resultó positiva. Expresado de otra manera, es la proporción de pacientes con la prueba diagnóstica positiva que efectivamente tienen la condición. En contraste, el valor predictivo negativo es la probabilidad condicional de que el paciente no tenga la enfermedad, dado que la prueba diagnóstica resultó negativa. En otras palabras, es la probabilidad de que el individuo no tenga la condición en estudio luego de que la prueba es negativa (Bravo y Cruz, 2015).

La razón de verosimilitud es la probabilidad de que el resultado mediante un método se espere en una persona con una enfermedad, en comparación con la probabilidad de que el mismo resultado se espere en una persona con otra enfermedad. La razón de verosimilitud positiva se calcula dividiendo la sensibilidad entre la cantidad de falsos positivos (1-especificidad). Por otro lado, la razón de verosimilitud negativa se calcula dividiendo la cantidad de falsos negativos entre la especificidad (Vizcaíno, 2017).

III. Método

3.1. Tipo de investigación

Estudio cuantitativo y observacional de corte transversal, debido a que el investigador no manipuló las variables, y se realizó la medición de estas una sola vez en el tiempo (Hernández et al., 2014).

3.2. Ámbito temporal y espacial

El presente plan de tesis se ejecutó desde diciembre del 2021 a enero del 2022 en el laboratorio Oncológico Taxa, ubicado en la Calle Montegrande 109, distrito de Santiago de Surco, provincia y departamento de Lima, Perú.

3.3. Variables

Definiciones y otras características de las variables en el anexo A (cuadro de operacionalización de variables).

3.4. Población y muestra

La población estuvo conformada por todos los bloques de parafina de biopsias gástricas provenientes del 2020, y almacenados en el Laboratorio Oncológico Taxa. Esta fue una cantidad de 725 bloques.

Al ser el primer estudio en evaluar este nuevo método de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori*, primero, se realizó una prueba piloto con 50 muestras asignadas mediante un muestreo aleatorio simple a partir de la población de estudio (referencias recomiendan entre 30 y 50 muestras para una prueba piloto) (Díaz, 2020; Mora et al., 2015). Se elaboraron tres láminas histológicas por cada bloque de parafina, y en cada una se aplicó un solo método de coloración diferente (Azul de metileno de HAMA, Hematoxilina-Eosina, o Giemsa). Se entregaron estas láminas a dos expertos, quienes realizaron la lectura correspondiente de forma independiente. Posterior a ello, se elaboraron las tablas de contingencia (anexo B) para el nuevo método propuesto en comparación con el Gold Standard

sugerido por el Grupo Europeo para el estudio de *Helicobacter pylori* (se consideró como caso a quienes tuvieron por lo menos dos pruebas positivas, y como no caso, a quienes tuvieron cualquier otro tipo de resultado diferente a lo anterior); obteniéndose un coeficiente Kappa interobservador de 0.87, clasificaciones positivas por el observador 1 de 40% y por el observador 2 de 38%, sensibilidad de 94.4%, especificidad de 90.6% y prevalencia de 94.4%.

Finalmente, mediante estos datos, se calcularon los dos tamaños de muestra respectivos en base al objetivo principal de esta investigación (anexo C), y se seleccionó la mayor de ellas como muestra final para abordar la presente investigación (n=99). Se consideró un nivel confianza del 95%, una precisión para ese Kappa esperado de 0.1 y una precisión para la sensibilidad y especificidad esperadas de 10%; al no existir precedentes, se consideraron estas precisiones en base al valor convencional de 0.1 o 10% que suele asignarse para estudios descriptivos (Duffau, 1999).

Posterior a la obtención de este tamaño de muestra final, se realizó también un muestreo aleatorio simple a partir de la población de estudio. Se escogió el muestreo aleatorio simple debido a que se analizaron datos recolectados que se encontraron adecuadamente enlistados (software del laboratorio), de tal manera, que cada bloque tuvo la misma probabilidad de ser escogido.

Los cálculos de tamaño de muestra y muestreos se realizaron mediante el software EPIDAT versión 4.2.

Criterios de inclusión

- Bloques de parafina registrados en el software del servicio y durante el período especificado.

Criterios de exclusión

- Bloques de parafina que no se encuentren presentes en el archivador del laboratorio.

- Bloques de parafina deteriorados o que no cuenten con tejido remanente, es decir, no aptos para realizar las nuevas secciones a estudiar.

- Bloques de parafina con identificación dudosa o inadecuada (rótulo no coincide con el registro virtual del software del laboratorio o no es legible).

- Más de un bloque de parafina por zona de procedencia de la biopsia gástrica y de la misma persona (se consideraría la primera dada por el muestro aleatorio, para evitar la repetición de información, y así proveer de mayor variabilidad a los resultados del presente estudio).

3.5. Instrumentos

Se utilizó una ficha de recolección de datos (anexo D). No se abordó la validación, debido a que este tipo de instrumento no aplica para ello.

3.6. Procedimientos

Esta investigación, previo a recolectar los datos, fue aprobado por la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villareal (anexo E) y por el jefe del Laboratorio Oncológico Taxa (anexo F).

Este proceso consistió, primero, en la ejecución de una prueba piloto mediante 50 muestras como se comentó en la sección de población y muestra. Se elaboraron tres láminas histológicas por cada bloque de parafina, y en cada una se aplicó un solo método de coloración diferente (Azul de metileno de HAMA, Hematoxilina-Eosina, o Giemsa). Los protocolos realizados se encuentran en el anexo G.

Un par de días previo a la lectura de las láminas para la prueba piloto, el investigador principal entregó a los observadores (dos anatompatólogos, solicitud de participación en el anexo H) diversos casos positivos y negativos por los tres métodos de coloración; estos seleccionaron, en concordancia, un control positivo (positivo por los tres métodos) y negativo de *Helicobacter pylori* (negativo por los tres métodos), los cuales utilizaron para un

entrenamiento previo. Esta acción se realizó con el fin de disminuir la probabilidad de reporte de falsos positivos o negativos, principalmente, por el riesgo de no saber reconocer a esta bacteria bajo esta nueva coloración.

Luego de estos días, se retiraron las láminas controles, y se procedió con la lectura oficial. Se entregaron al azar estas láminas a los anatomopatólogos, los cuales, las observaron de forma independiente (lugares y momentos distintos), y llenaron la información sobre los códigos de las láminas y la presencia de esta bacteria en la ficha de recolección de datos. Después, la información sobre las demás características gástricas (presencia de metaplasia intestinal, atrofia, displasia, etc.) fue tomada directamente del diagnóstico histopatológica provista por el software del laboratorio, y apuntado en la ficha de recolección por el investigador principal.

El algoritmo de codificación de las láminas fue creado por el investigador de este estudio, y consistió en un número que representa el tipo de método utilizado (a la Hematoxilina-Eosina se le consideró como 1, al Giemsa como 2, y al Azul de Metileno de HAMA como 3) multiplicado por 2; seguido del orden del bloque proveniente de lista de los seleccionados, y finalmente, seguido de la suma de 1, 2, y 3 a estos números anteriores, respectivamente. Esto se realizó de tal forma que el observador no logre identificar qué caso corresponde a un determinado método de coloración, y así, disminuir la influencia de corroborar lecturas por métodos distintos. Por ejemplo, el caso 1 presentó los códigos de 2122, 4143, y 6164 para los métodos de Hematoxilina-Eosina, Giemsa, y Azul de Metileno de HAMA, respectivamente.

Los observadores contaron con 6 y 5 años de experiencia profesional como anatomopatólogos. Además, ambos contaron con estudios adicionales, como una subespecialidad en patología oncológica. Adicionalmente, el observador con más años de experiencia contó también con una maestría en Medicina con mención en Anatomía Patológica; por todas estas condiciones, solo las observaciones dadas por este experto fueron consideradas

para los cálculos de la capacidad diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud).

Finalmente, la información provista en las fichas de recolección de datos fue tipeada en una base de datos en Excel, e importada posteriormente al software estadístico.

3.7. Análisis de datos

Se utilizó el software estadístico STATA 17.0 (número de serie: 301709027730), y los valores p menores a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos. Para la descripción de las variables cualitativas, se utilizaron las frecuencias relativas y absolutas.

El estadístico Kappa interobservador convencional fue provisto por el mismo software. El cual se categorizó convencionalmente en (McHugh, 2012):

- Valor de Kappa entre 0 – 0.20, ningún nivel de acuerdo o concordancia.
- Valor de Kappa entre 0.21 – 0.39, concordancia mínima.
- Valor de Kappa entre 0.40 – 0.59, concordancia débil.
- Valor de Kappa entre 0.60 – 0.79, concordancia moderada.
- Valor de Kappa entre 0.80 – 0.90, concordancia fuerte.
- Valor de Kappa por encima de 0.90, concordancia casi perfecta.

El Kappa ajustado (PABAK), mediante el siguiente cálculo:

- $PABAK = 2p_0 - 1$; $p_0 = a+d/N$; a: negatividad por ambos observadores, d: positividad por ambos observadores.

A partir de las tablas de contingencia provistas por el mismo software, se realizaron los siguientes cálculos de la sensibilidad (S), especificidad (E), valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN), y razones de verosimilitud positivo y negativo (RVP y RVN):

- $S = VP/(FN+VP)$; VP: verdaderos positivos, FN: falsos negativos.
- $E = VN/(FP+VN)$; VN: verdaderos negativos, FP: falsos positivos.
- $VPP = VP/(FP+VP)$.

$$- \text{VPN} = \text{VN}/(\text{FN}+\text{VN}).$$

$$- \text{RVP} = \text{S}/(1-\text{E}).$$

$$- \text{RVN} = (1-\text{S})/\text{E}.$$

Finalmente, la evaluación sobre si el reporte de la presencia de *Helicobacter pylori* por alguno de estos métodos de coloración, en comparación con el Gold Standard, es afectado por la presencia/grado de alguna patología gástrica coexistente o zona gástrica evaluada, se realizó, primero, mediante la prueba exacta de Fisher. Luego, en el caso de discrepancias con el Gold Standard, se confirmó ello mediante la aplicación de Modelos Lineales Generalizados (GLM) con familia de distribución binomial (dado la variable presencia de *Helicobacter pylori*, la cual, es dicotómica), función enlace log (para estimar razones de prevalencia), y con la opción de coeficientes exponenciados (para generar una interpretación directa de estas razones de prevalencia, en lugar de los logaritmos).

3.8. Consideraciones éticas

El presente proyecto de investigación no utilizó consentimientos informados debido a que no necesitará la participación de sujetos humanos.

La recolección de los datos solo abarcó información relevante a las variables involucradas en este estudio, esto mediante el uso de la ficha de recolección de datos. Por lo tanto, el esquema de esta ficha evitó incluir datos personales que puedan afectar la confidencialidad, como: nombres del paciente, dirección, teléfonos o algún otro tipo de información personal que permita identificar al paciente.

IV. Resultados

4.1. Flujograma de los muestreos

Durante la ejecución del muestreo para la prueba piloto (n=50), a partir de la población de estudio (N=725), se excluyeron 6 bloques de parafina en total: 3 muestras que no se encontraron en el archivador, y 3 muestras que tuvieron superficies muy desgastadas. No hubo exclusión de bloques de parafina por los dos últimos criterios establecidos (identificación dudosa o inadecuada, y más de un bloque de parafina que provenga de la misma persona y de la misma región gástrica).

Durante la ejecución del muestreo final de este estudio (n=99), a partir de la población de estudio (N=725), se excluyeron 13 bloques de parafina en total: 8 muestras que no se encontraron en el archivador, y 5 muestras que tuvieron superficies muy desgastadas. No hubo exclusión de bloques de parafina por los dos últimos criterios establecidos (identificación dudosa o inadecuada, y más de un bloque de parafina que provenga de la misma persona y de la misma región gástrica).

4.2. Descripción de los resultados

Mediante la **tabla 1**, se puede observar que las prevalencias de *Helicobacter pylori* establecida por los métodos HE, GIEMSA, AM-HAMA, y GS, fueron 25.2%, 33.3%, 39.4%, y 35.4%, respectivamente.

Además, las prevalencias de hiperplasia foveolar, folículos linfoides, metaplasia intestinal, atrofia, y displasia gástrica, fueron 4%, 15.1%, 11.1%, 6.1%, 3%, respectivamente.

Adicionalmente, predominaron características como el daño mucinoso de tipo parcial focal (40.4%), zona del antro gástrico (57.6%), la infiltración superficial (52.5%), y la actividad moderada (39.4%) de la gastritis crónica.

Finalmente, la mejora en la cantidad y calidad de la observación de bacilos en un mismo campo, según cada método de coloración, se presenta en la **figura 1**.

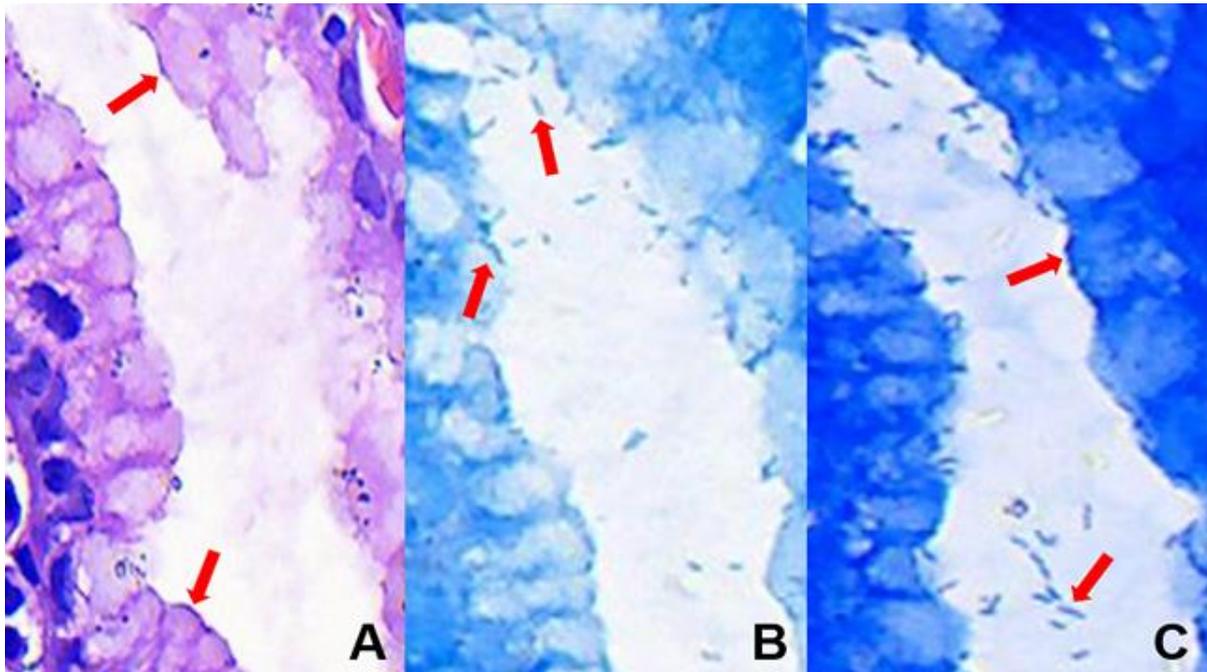
Tabla 1. Descripción de la muestra estudiada (n=99).

Características	N (%)
Presencia de HP mediante HE	
No	74 (74.8)
Sí	25 (25.2)
Presencia de HP mediante GIEMSA	
No	66 (66.7)
Sí	33 (33.3)
Presencia de HP mediante AM-HAMA	
No	60 (60.6)
Sí	39 (39.4)
Presencia de HP mediante el GS	
No	64 (64.6)
Sí	35 (35.4)
Presencia de hiperplasia foveolar	
No	95 (96.0)
Sí	4 (4.0)
Infiltración de la gastritis crónica	
Superficial	52 (52.5)
Profunda	47 (47.5)
Actividad de la gastritis crónica	
Ausente	30 (30.3)
Leve	30 (30.3)
Moderada	39 (39.4)
Presencia de folículos linfoides	
No	84 (84.9)
Sí	15 (15.1)
Daño mucinoso	
Ausente	17 (17.2)

Parcial focal	40 (40.4)
Parcial multifocal	36 (36.4)
Total focal	2 (2.0)
Total multifocal	4 (4.0)
Presencia de metaplasia intestinal	
No	88 (88.9)
Sí	11 (11.1)
Presencia de atrofia gástrica	
No	93 (93.9)
Sí	6 (6.1)
Presencia de displasia gástrica	
No	96 (97.0)
Sí	3 (3.0)
Zona gástrica evaluada	
Cuerpo	42 (42.4)
Antro	57 (57.6)

Nota. HP: *Helicobacter pylori*. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA. GS: Gold Standard.

Figura 1. Comparación entre los métodos de coloración.



Nota. A: Hematoxilina-Eosina. B: Giemsa. C: Azul de Metileno de HAMA. Lo señalado por las flechas en rojo representan al *Helicobacter pylori* (40x).

4.3. Concordancia y capacidad diagnóstica

A partir de la información provenientes de las tablas de contingencia (**tablas 2 y 3**), se obtuvo los siguientes valores de concordancia y capacidad diagnóstica (**tabla 4**):

- El método de coloración AM-HAMA obtuvo la mayor concordancia interobservador (Kappa=0.87, concordancia fuerte) en comparación con los otros dos métodos (HE, Kappa=0.51, concordancia débil; GIEMSA, Kappa=0.83, concordancia fuerte). También, este mismo método fue el menos afectado por la prevalencia de la enfermedad y sesgo de los observadores (Kappa ajustado=0.88) en comparación con los otros dos métodos (HE, Kappa ajustado=0.66; GIEMSA, Kappa ajustado=0.86).

- El método de coloración AM-HAMA obtuvo la mayor sensibilidad (97.1%) en comparación con los otros dos métodos (HE, 68.6%; GIEMSA, 88.6%). No obstante, este

mismo método obtuvo la menor especificidad (92.2%) en comparación con los otros dos métodos (HE, 98.4%; GIEMSA, 96.9%).

- El método de coloración HE obtuvo el mayor valor predictivo positivo (96%) en comparación con los otros dos métodos (GIEMSA, 93.9%; AM-HAMA, 87.2%). En contraste, este mismo método obtuvo el menor valor predictivo negativo (85.1%) en comparación con los otros dos métodos (GIEMSA, 93.9%; AM-HAMA, 98.3%).

- El método de coloración HE obtuvo la mayor razón de verosimilitud positiva (42.88) en comparación con los otros dos métodos (GIEMSA, 28.58; AM-HAMA, 12.45). Por otro lado, el método de coloración AM-HAMA obtuvo la menor razón de verosimilitud negativa (0.03) en comparación con los otros dos métodos (HE, 0.32; GIEMSA, 0.12).

Tabla 2. Resultados cada método de coloración utilizado según cada observador para la identificación de *Helicobacter pylori* (n=99).

HE – OBS 2	HE – OBS 1	
	No	Sí
No	68	11
Sí	6	14
GIEMSA – OBS 2	GIEMSA – OBS 1	
	No	Sí
No	66	7
Sí	0	26
AM-HAMA – OBS 2	AM-HAMA – OBS 1	
	No	Sí
No	59	5
Sí	1	34

Nota. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA. OBS 1: Observador 1. OBS 2: Observador 2.

Tabla 3. Resultados de cada método de coloración utilizado en comparación con el Gold Standard para la identificación de *Helicobacter pylori* (n=99).

Método de coloración	Gold Standard	
	No (n=64)	Sí (n=35)
HE		
No	63	11
Sí	1	24
GIEMSA		
No	62	4
Sí	2	31
AM-HAMA		
No	59	1
Sí	5	34

Nota. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Tabla 4. Concordancia interobservador y capacidad diagnóstica de cada método de coloración.

Estadístico	HE	GIEMSA	AM-HAMA
Kappa/ES/p	0.51/0.0995/<0.001	0.83/0.0991/<0.001	0.87/0.1001/<0.001
Kappa ajustado/IP/IS	0.66/0.55/0.05	0.86/0.40/0.07	0.88/0.25/0.04
Sensibilidad	68.6%	88.6%	97.1%
Especificidad	98.4%	96.9%	92.2%
Valor predictivo positivo	96%	93.9%	87.2%
Valor predictivo negativo	85.1%	93.9%	98.3%
Razón de verosimilitud positiva	42.88	28.58	12.45
Razón de verosimilitud negativa	0.32	0.12	0.03

Nota. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA. ES: Error estándar del estadístico Kappa. p: Valor p de la prueba de hipótesis para el estadístico Kappa. IP: Índice de prevalencia. IS: Índice de sesgo.

4.4. Métodos de coloración en comparación con el Gold Standard, según patología coexistente y zona gástrica evaluada

En un primero momento, se determinó que solo el reporte de *Helicobacter pylori* mediante el método de coloración HE es afectado por la presencia de folículos linfoides, ya que, este método fue el único que no coincidió con el Gold Standard en el reporte de la significancia estadística (**tabla 5**). Mediante GIEMSA ($p=0.034$), AM-HAMA ($p=0.008$) y el Gold Standard ($p=0.002$), en los casos con folículos linfoides, la presencia de *Helicobacter pylori* fue significativamente más frecuente en comparación con la ausencia; mientras que con HE no se encontraron diferencias significativas ($p=0.053$). No obstante, el análisis de regresión (**tabla 6**) confirmó que este método de coloración sí coincidió con el Gold Standard, ya que, en los casos con folículos linfoides, la presencia de *Helicobacter pylori* fue mayor (2.6 veces) a la ausencia ($p=0.040$).

Adicionalmente, se determinó que solo el reporte de *Helicobacter pylori* mediante el método de coloración GIEMSA es afectado por el tipo de daño mucinoso, ya que, este método fue el único que no coincidió con el Gold Standard en el reporte de la significancia estadística (**tabla 7**). Mediante HE ($p=0.021$), AM-HAMA ($p=0.001$) y el Gold Standard ($p=0.018$), la presencia de *Helicobacter pylori* fue significativamente más frecuente en comparación con la ausencia, según el tipo de daño de mucinoso; mientras que con GIEMSA no se encontraron diferencias significativas ($p=0.063$). Posteriormente, el análisis de regresión confirmó que solo para los casos con daño mucinoso de tipo parcial multifocal, este método de coloración coincidió con el Gold Standard en el reporte de la significancia estadística, ya que, la presencia de *Helicobacter pylori* fue mayor (1.6 veces) a la ausencia ($p=0.006$) (**tabla 8**). Por otro lado, en los casos con daño mucinoso de tipo parcial focal, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.078$) (**tabla 9**).

En el resto de las patologías coexistentes (hiperplasia foveolar, infiltración y actividad de la gastritis crónica, metaplasia intestinal, atrofia y displasia gástrica) y zona gástrica evaluada, todos los métodos de coloración coincidieron en el reporte de la significancia estadística del Gold Standard (anexo I).

Tabla 5. Análisis entre la presencia de folículos linfoides y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Folículos linfoides		p†
	No (n=84) n (%)	Sí (n=15) n (%)	
HE			
No	66 (89.2)	8 (10.8)	0.053
Sí	18 (72.0)	7 (28.0)	
GIEMSA			
No	60 (90.9)	6 (9.1)	0.034
Sí	24 (72.7)	9 (27.3)	
AM-HAMA			
No	56 (93.3)	4 (6.7)	0.008
Sí	28 (71.8)	11 (28.2)	
Gold Standard			
No	60 (93.8)	4 (6.2)	0.002
Sí	24 (68.6)	11 (31.4)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Tabla 6. Análisis de regresión entre la presencia de folículos linfoides y la identificación de *Helicobacter pylori* por Hematoxilina-Eosina.

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	RP	IC 95%	p
HE			
No	Ref.		
Sí	2.6	1.05 – 6.42	0.040

Nota. HE: Hematoxilina-Eosina. RP: Razón de prevalencias. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Tabla 7. Análisis entre el tipo de daño mucinoso y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Daño mucinoso					p†
	Ausente (n=17)	Parcial focal (n=40)	Parcial multifocal (n=36)	Total focal (n=2)	Total multifocal (n=4)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
HE						
No	15 (20.3)	34 (45.9)	20 (27.0)	2 (2.7)	3 (4.1)	0.021
Sí	2 (8.0)	6 (24.0)	16 (64.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	
GIEMSA						
No	15 (22.7)	28 (42.4)	19 (28.8)	2 (3.0)	2 (3.0)	0.063
Sí	2 (6.1)	12 (36.3)	17 (51.5)	0 (0.0)	2 (6.1)	
AM-HAMA						
No	16 (26.7)	26 (43.3)	14 (23.4)	2 (3.3)	2 (3.3)	0.001
Sí	1 (2.6)	14 (35.9)	22 (56.4)	0 (0.0)	2 (5.1)	
Gold Standard						
No	15 (23.4)	28 (43.8)	17 (26.6)	2 (3.1)	2 (3.1)	0.018
Sí	2 (5.7)	12 (34.3)	19 (54.3)	0 (0.0)	2 (5.7)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Tabla 8. Análisis de regresión entre el daño mucinoso de tipo parcial multifocal y la identificación de *Helicobacter pylori* por GIEMSA.

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	RP	IC 95%	p
GIEMSA			
No	Ref.		
Sí	1.6	1.14 – 2.24	0.006

Nota. RP: Razón de prevalencias. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Tabla 9. Análisis de regresión entre el daño mucinoso de tipo parcial focal y la identificación de *Helicobacter pylori* por GIEMSA.

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	RP	IC 95%	p
GIEMSA			
No	Ref.		
Sí	1.3	0.97 – 1.79	0.078

Nota. RP: Razón de prevalencias. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

V. Discusión de Resultados

Con respecto a los valores de concordancia interobservador de los diferentes métodos de coloración evaluados, primero, los reportados por el método de HE (Kappa=0.51), coinciden con diversas investigaciones que reportaron valores en el rango de concordancia débil (0.40 – 0.59) (El-Zimaity et al., 1996; Guarner et al., 1999; Tepes et al., 1999; Toro, 2010). No obstante, difiere con los estudios de Chen (Chen et al., 1999) y de Vásquez (Vásquez, 2008), los cuales, reportaron estadísticos Kappa=0.76 y Kappa=0.62 (ambos representan concordancias moderadas), respectivamente. La diferencia con el primero podría deberse a la población que enroló, el cual, estuvo conformada por pacientes que ya presentaban la infección por *Helicobacter pylori*, con el fin de poder realizar seguimiento, y comparar esta concordancia interobservador pre y postratamiento. En ese sentido, esta característica de la población estaría influenciando la prevalencia de la enfermedad, y, por ende, también el estadístico Kappa. La diferencia con el segundo podría deberse a que ese estudio, de forma literal, manifestó que un 20% de las láminas evaluadas, se recolorearon. Entonces, dado que se trató de forma parcial un grupo de láminas, esto generaría un sesgo de medición, el cual, estaría afectando al reporte de la presencia de esta bacteria, y, por ende, también al estadístico Kappa.

Lo encontrado en esta investigación sobre la concordancia para el método de coloración Giemsa (Kappa=0.83, concordancia fuerte), discrepa con el total de estudios que evaluaron la concordancia interobservador para este método, el de Toro (Toro, 2010) y de Rotimi (Rotimi et al., 2000), los cuales, reportaron estadísticos Kappa=0.64 y Kappa=0.73 (ambos representan concordancias moderadas), respectivamente. La diferencia con el primero podría deberse a que se realizó un cálculo de tamaño muestra solo para la capacidad diagnóstica (en este caso, utilizando la sensibilidad encontrada en una prueba piloto), pero no para la concordancia; además, esta prueba piloto fue realizada con 15 muestras, y esta cantidad es menor a la recomendada por las referencias mencionadas en la sección de población y muestra. Entonces,

todo ello generaría que la precisión estadística del estimado Kappa podría no ser la adecuada. La diferencia con el segundo podría deberse a que ese mismo estudio declaró que, en los casos donde hubo desacuerdo por ambos observadores, se observaron estas láminas en un microscopio de doble cabezal, con el fin de llegar a un consenso en el reporte. En ese sentido, al no existir una observación independiente, y al igual que en el caso anterior, los resultados estarían sesgados por el trato parcial dado a un grupo de láminas (sesgo de medición).

Además, todas estas diferencias planteadas serían adicionales al hecho de que, ninguno de estos estudios previos ajustó por la prevalencia de la enfermedad y el sesgo entre los observadores. Por ende, los valores Kappa reportados podrían estar sesgados, ya que, al no haber reporte del Kappa ajustado, no se puede reconocer qué métodos de coloración estarían siendo más afectados por estos factores. Por otro lado, el estadístico Kappa interobservador del nuevo método de coloración propuesto, AM-HAMA, fue el mejor en comparación con el Giemsa y HE; y no solamente ello, presentó una variación de solo 0.1 con respecto a su valor ajustado. Todo ello sugeriría que este método podría utilizarse, prácticamente, en cualquier población de biopsias gástricas e indiferente a la elección de los anatomopatólogos (ya que fue el que menos se vio afectado por estos factores).

Con respecto a los valores de capacidad diagnóstica de los diferentes métodos de coloración evaluados, primero, los reportados por el método de HE (S=68.6%, E=98.4%, VPP=96%, VPN=85.1%, RVP=42.8, RVN=0.32), son similares a los encontrados por Allahverdiyev (Allahverdiyev et al., 2015) (S=65%, E=100%, VPP=100%, VPN=74%), pero difieren de Ali (Ali, 2016) (S=81.2%, E=100%, VPP=100%, VPN=63.4, RVP=infinito, RVN=0.19); todo ello en comparación con investigaciones que sí aplicaron el GS recomendado por el Grupo Europeo para el estudio de *Helicobacter pylori*.

Esta diferencia podría deberse a dos aspectos; primero, no se realizó un cálculo de tamaño de muestra considerando estimados de capacidad diagnóstica provenientes de

referencias o una prueba piloto, por lo tanto, la potencia estadística podría no ser la adecuada; segundo, la prevalencia de esa investigación (75.5%) fue más del doble de la encontrada en este estudio (35.4%), la cual, es una característica que afecta a los cálculos de la capacidad diagnóstica, específicamente, a los valores predictivos.

De igual forma, en comparación con investigaciones que no aplicaron el GS definido por este estudio, sino que consideraron como suficiente, solo un método invasivo para confirmar la presencia de esta bacteria, se pudo observar una mayor diferencia en estos valores representativos de la capacidad diagnóstica en relación con lo encontrado en esta tesis, especialmente para los valores predictivos (Ahmad et al., 2011; Bamanikar et al., 2018; Fakhrjou et al., 2011; Hartman y Owens, 2012; Himani et al., 2013; Pranjal y Kalpana, 2015; Redéen et al., 2011; Soto et al., 2013) (S= 69.7% – 100%, E=74.3% – 100%, VPP=50% – 100%, VPN=36.4% – 100%).

Lo encontrado en esta investigación sobre los valores de capacidad diagnóstica para el método de coloración Giemsa, también difieren con el total de estudios que evaluaron esta capacidad diagnóstica para este método de coloración, especialmente para los valores predictivos (Ahmad et al., 2011; Bamanikar et al., 2018; Hartman y Owens, 2012; Himani et al., 2013; Kocsmár et al., 2017; Pranjal y Kalpana, 2015) (S= 62% – 100%, E=84.5% – 100%, VPP=59.1% – 100%, VPN=75% – 100%). A pesar de que la diferencia del rango de los reportes es menor en comparación con los encontrados bajo el método de coloración HE (la cual, sería explicado porque el método de coloración Giemsa permite una mejor visualización de esta bacteria), de igual manera, esta discrepancia con respecto a lo reportado en esta tesis se debería a que todos estos estudios solo consideraron como referencia a un solo método invasivo.

En ese sentido, para evitar esta heterogeneidad en resultados, se reafirma la importancia de que los laboratorios de Histotecnología, consideren como una herramienta clave (aparte de

la calidad en la selección de los observadores y de los métodos de coloración disponibles), la aplicación del GS sugerido por el Grupo Europeo para el estudio de *Helicobacter pylori*.

En contraste, el método de coloración AM-HAMA, presentó los mejores valores de sensibilidad, valor predictivo y razón de verosimilitud negativos. Esto podría ser explicado por las mismas características del método, el cual, ha sido diseñado exclusivamente para apoyar en la identificación de esta bacteria (a diferencia de los otros métodos que tienen objetivos adicionales, como la descripción morfológica). Este se basa en intensificar el color (de forma análoga con el carbol fucsina para el *Mycobacterium tuberculosis*), dado por el medio alcalino (bicarbonato de sodio en su preparación) que permite la formación de azules (Lillie y Conn, 1969), teniendo como consecuencia la mejora del reconocimiento de esta bacteria.

Por otro lado, y precisamente, esta intensidad del color también podría sugestionar al observador, y calificar como positivo a una muestra que no lo es; esto explicaría la menor especificidad (aunque relativamente considerable también, ya que fue más del 90%) en comparación con los otros métodos de coloración. Esto, nuevamente, vuelve a reafirmar el hecho de que no existe un método único que sea perfecto, y que es clave la consideración de por lo menos dos métodos de coloración, como referencia.

Finalmente, con respecto a la evaluación sobre si el reporte de la presencia de *Helicobacter pylori* por alguno de estos métodos de coloración depende de la zona gástrica evaluada o la presencia/grado de alguna patología gástrica coexistente, este estudio halló que solo el método de coloración Giemsa no sería el adecuado para la identificación de *Helicobacter pylori* en los casos con daño mucinoso de tipo parcial, ya que, mientras que el GS encontró diferencias significativas en el reporte de la presencia de esta bacteria, el método de Giemsa no lo hizo. En ese sentido, habría una mayor probabilidad de error en reportar un caso como positivo cuando lo no es, y viceversa, mediante este método de coloración cuando esté presente esta patología coexistente.

Adicionalmente, solo tres estudios han realizado también esta evaluación; Boldt (Boldt et al., 2015) y Kocsmár (Kocsmár et al., 2017) lo realizaron en muestras con diferentes grados de actividad inflamatoria, y Prachasilpchai (Prachasilpchai et al., 2007) lo hizo en diferentes zonas gástricas. Todos indicaron lo mismo que esta tesis, sobre que el reporte de esta bacteria mediante HE coincide con el reporte de Giemsa. No obstante, no tuvieron un diseño para evaluar ello propiamente (la potencia estadística pudo no ser la adecuada), y no se realizó la comparación con el GS utilizado en este estudio, sino solo entre estos mismos métodos de coloración.

Como fortalezas, primero, esta es la primera investigación en el mundo en diseñar un estudio que tome en cuenta el nivel de confianza y potencia estadística de la muestra a recolectar para la evaluación de la concordancia interobservador y capacidad diagnóstica un método de coloración para la identificación de *Helicobacter pylori*, lo que genera una mayor credibilidad a los resultados. Adicionalmente, se amplió la evidencia científica sobre si el reporte de la presencia de *Helicobacter pylori* por alguno de estos métodos de coloración depende de la zona gástrica evaluada o la presencia/grado de alguna patología gástrica coexistente (ya que se evaluaron más características gástricas).

Como potencial limitación, los resultados encontrados en la evaluación de lo mencionado en la última sección del párrafo anterior, podrían ser totalmente cuestionables, dado que esta investigación no diseñó una muestra propiamente para ello (para ese objetivo, se realizó más una exploración dado la casi nula evidencia científica), y la validez externa de esos resultados podría verse reducida debido a que se evaluó en una institución de salud privada, en la que habría una mayor probabilidad de encontrar niveles más leves de severidad de las patologías coexistentes, lo que se corroboraría con las bajas prevalencias encontradas de metaplasia intestinal, atrofia y displasia gástrica.

VI. Conclusiones

- La concordancia interobservador del Azul de Metileno de HAMA fue superior al del Giemsa y Hematoxilina-Eosina.
- La sensibilidad, valor predictivo y razón de verosimilitud negativos del Azul de Metileno de HAMA fueron superiores al del Giemsa y Hematoxilina-Eosina. No obstante, la especificidad, valor predictivo y razón de verosimilitud positivos fueron inferiores.
- Solo para el Giemsa, y en los casos con daño mucinoso de tipo parcial, no sería recomendable su aplicación para determinar la presencia de *Helicobacter pylori*.
- Finalmente, dado las características propias (muy rápido, barato, accesible, y simple en su aplicación), además de la fiabilidad estadística mostrada, este nuevo método sería el ideal para tomar en cuenta, adicional al de rutina (Hematoxilina-Eosina), en los laboratorios de Histotecnología o de Anatomía Patológica.

VII. Recomendaciones

- Al ser este el primer estudio para este nuevo método de coloración se sugiere replicar lo evaluado sobre la concordancia y capacidad diagnóstica, con el fin de corroborar los resultados encontrados.
- Se sugiere ejecutar estudios donde ahora, se evalúe el desempeño del algoritmo utilizando la coloración de Hematoxilina-Eosina más el Azul de Metileno de HAMA, como rutina para la identificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas, ya que, mientras el AM-HAMA obtuvo la mayor sensibilidad, el HE obtuvo la mayor especificidad, en ese sentido, ambos se podrían complementar idóneamente.
- Diseñar investigaciones que exclusivamente se enfoquen en evaluar si el reporte de la presencia de *Helicobacter pylori* por alguno de estos métodos de coloración, depende de la zona gástrica o la presencia/grado de alguna patología gástrica coexistente. Además, de realizar esto en instituciones de salud privadas y públicas, con el mejor de potenciar la validez externa.
- Finalmente, se recomienda no utilizar azul de metileno únicamente (sin la forma de preparación con el bicarbonato de sodio), debido a que, por experiencias del investigador, se generarían un solo tono de azul de baja intensidad, lo que no permitiría la rápida identificación del *Helicobacter pylori*.

VIII. Referencias

- Ahmad, F., Jaffar, R., y Khan, I. (2011). Helicobacter pylori detection in chronic gastritis: A comparison of staining methods. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*, 23(2), 112-114.
- Ali, A. (2016). Evaluation of Endoscopy Based H. pylori Diagnostic Techniques in Iraqi Patients with upper Gastrointestinal Disorders. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(22), 1-10. <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i22/85384>
- Alkhamiss, A. (2020). Evaluation of Better Staining Method among Hematoxylin and Eosin, Giemsa and Periodic Acid Schiff-Alcian Blue for the Detection of Helicobacter pylori in Gastric Biopsies. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 27(5), 53-61. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.5.6>
- Allahverdiyev, A., Bagirova, M., Caliskan, R., Tokman, H., Aliyeva, H., Unal, G., Oztel, O. N., Abamor, E., Toptas, H., Yuksel, P., Kalayci, F., Aslan, M., Erzin, Y., Bal, K., y Kocazeybek, B. (2015). Isolation and diagnosis of Helicobacter pylori by a new method: Microcapillary culture. *World Journal of Gastroenterology*, 21(9), 2622-2628. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i9.2622>
- Altman, D., y Bland, J. (1994). Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 308(6943), 1552. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6943.1552>
- Bamanikar, S., Khandelwal, A., y Shah, K. (2018). Detection of Helicobacter Pylori in Gastric Biopsies of Patients with Chronic Gastritis: Histopathological and Immunohistochemical Study. *International Journal of Health Sciences and Research*, 8(3), 39-47.
- Batts, K., Ketover, S., Kakar, S., Krasinskas, A., Mitchell, K., Wilcox, R., Westerhoff, M., Rank, J., Gibson, J., Mattia, A., Cummings, O., Davison, J., Naini, B., Dry, S., Yantiss, R., y Rodger C. (2013). Appropriate use of special stains for identifying Helicobacter

- pylori: Recommendations from the Rodger C. Haggitt Gastrointestinal Pathology Society. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(11), e12-22. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000097>
- Bermúdez, L., Torres, E., y Rodríguez, B. (2009). Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 48(1), 1-14.
- Boldt, M., Pereira, R., y Barbosa, A. (2015). Histological identification of *H. pylori* stained by hematoxylin-eosin and Giemsa: Review for quality control. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 51(2), 108-112. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150019>
- Bossuyt, P., Reitsma, J., Bruns, D., Gatsonis, C., Glasziou, P., Irwig, L., Moher, D., Rennie, D., de Vet, H., y Lijmer, J. (2003). The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: Explanation and elaboration. *Annals of Internal Medicine*, 138(1), W1-12. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00012-w1>
- Bravo, S., y Cruz, J. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista chilena de radiología*, 21(4), 158-164. <https://doi.org/10.4067/S0717-93082015000400007>
- Cava, F., y Cobas, G. (2003). Dos décadas de *Helicobacter pylori*. *Vaccimonitor*, 12(1), 1-10.
- Chen, X., Van der Hulst, R., Bruno, M., Van der Ende, A., Xiao, S., Tytgat, G., y Ten, F. (1999). Interobserver variation in the histopathological scoring of *Helicobacter pylori* related gastritis. *Journal of Clinical Pathology*, 52(8), 612-615. <https://doi.org/10.1136/jcp.52.8.612>
- Chi, F., Chen, C., Chou, C., Kao, T., Cheng, A., Lee, A., y Kuo, C. (2020). A time-saving-modified Giemsa stain is a better diagnostic method of *Helicobacter pylori* infection compared with the rapid urease test. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(4), 1-5. <https://doi.org/10.1002/jcla.23110>

- Díaz, G. (2020). Metodología del estudio piloto. *Revista chilena de radiología*, 26(3), 100-104.
<https://doi.org/10.4067/S0717-93082020000300100>
- Duffau T., (1999). Tamaño muestral en estudios biomédicos. *Revista chilena de pediatría*, 70(4), 314-324. <https://doi.org/10.4067/S0370-41061999000400009>
- El-Zimaity, H., Graham, D., Al-Assi, M., Malaty, H., Karttunen, T., Graham, D., Huberman, R., y Genta, R. (1996). Interobserver variation in the histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. *Human Pathology*, 27(1), 35-41.
[https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(96\)90135-5](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(96)90135-5)
- Fakhrjou, A., Somi, M., Fattahi, E., Koohbanani, S., y Shadravan, S. (2011). Rapid urease test, touch cytology and histopathologic assessment in determining infection by *Helicobacter pylori* in outpatient setting. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 14(12), 698-702. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.698.702>
- Farouk, W., Hassan, N., Ismail, T., Daud, I., y Mohammed, F. (2018). Warthin-Starry Staining for the Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsies. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 25(4), 92-99. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.4.9>
- Garg, B., Sandhu, V., Sood, N., Sood, A., y Malhotra, V. (2012). Histopathological analysis of chronic gastritis and correlation of pathological features with each other and with endoscopic findings. *Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 63(3), 172-178. <https://doi.org/10.5114/pjp.2012.31501>
- Gisbert, J., y Calvet, X. (2006). Generalidades sobre *Helicobacter pylori*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(12), 962-962.
- González, L., y Rodríguez, B. (2011). Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 50(4), 441-452.
- González, M., y Concepción, L. (2002). *Helicobacter pylori* y dispepsia, un problema de salud comunitario. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(3), 207-212.

- Guarner, J., Herrera, R., Mohar, A., Sanchez, L., Halperin, D., Ley, C., y Parsonnet, J. (1999). Interobserver variability in application of the revised Sydney classification for gastritis. *Human Pathology*, 30(12), 1431-1434. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(99\)90164-8](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(99)90164-8)
- Hartman, D., y Owens, S. (2012). Are Routine Ancillary Stains Required to Diagnose Helicobacter Infection in Gastric Biopsy Specimens?: An Institutional Quality Assurance Review. *American Journal of Clinical Pathology*, 137(2), 255-260. <https://doi.org/10.1309/AJCPD8FFBJ5LSLTE>
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). Concepción o elección del diseño de investigación. En *Metodología de la Investigación* (Quinta edición, p. 137-144).
- Himani, P., Patel, J., Agravat, H., Patel, S., y Thakkar, M. (2013). Identification of Helicobacter pylori by different conventional staining techniques and its comparison with polymerase chain reaction. *Saudi Medical Journal*, 34(9), 942-948.
- Kocsmár, É., Szirtes, I., Kramer, Z., Sziujártó, A., Bene, L., Buzás, G., Kenessey, I., Bronsert, P., Csanadi, A., Lutz, L., Werner, M., Wellner, U., Kiss, A., Schaff, Z., y Lotz, G. (2017). Sensitivity of Helicobacter pylori detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity. *Helicobacter*, 22(4), 1-9. <https://doi.org/10.1111/hel.12387>
- Lee, J., y Kim, N. (2015). Diagnosis of Helicobacter pylori by invasive test: Histology. *Annals of Translational Medicine*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.11.03>
- Lillie, R., y Conn, H. (1969). Neutral Stains. En *H. J. Conn's Biological Stains: A Handbook on the Nature and Uses of the Dyes Employed in the Biological Laboratory* (Eighth edition, p. 430).

- Malfertheiner, P., Mégraud, F., O'Morain, C., Hungin, A., Jones, R., Axon, A., Graham, D., y Tytgat, G. (2002). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(2), 167-180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2002.01169.x>
- Marín, R., Salas, P., Mena, F., y Sierra, R. (1996). Identificación histológica de *Helicobacter pylori* por los métodos de tinción de Warthins-Stary y Giménez en biopsias gástricas. *Rev. méd. Costa Rica Centroam*, 63(537), 147-151.
- Marshall, B. (2008). *Helicobacter pylori*—A Nobel pursuit? *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De Gastroenterologie*, 22(11), 895-896. <https://doi.org/10.1155/2008/459810>
- McHugh, M. (2012). Interrater reliability: The kappa statistic. *Biochemia Medica*, 22(3), 276-282.
- Mora, E., Carrasco, A., Muñoz, V., Salinas, R., Huerta, S., Noriega, E., y Landeros, E.. (2015). Características de la prueba piloto: Revisión de artículos publicados en enfermería. *Revista de Enfermería Neurológica*, 14(3), 169-175. <https://doi.org/10.37976/enfermeria.v14i3.212>
- Pajares, J., y Gisbert, J. (2006). *Helicobacter pylori*: Su descubrimiento e importancia en la medicina. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(10), 770-785.
- Prachasilpchai, W., Nuanualsuwan, S., Chatsuwana, T., Techangamsuwan, S., Wangnaitam, S., y Sailasuta, A. (2007). Diagnosis of *Helicobacter* spp. Infection in canine stomach. *Journal of Veterinary Science*, 8(2), 139-145. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.2.139>
- Pranjali, R., y Kalpana, M. (2015). Histological Identification of *Helicobacter pylori*: Comparison of staining methods. *International Journal of Medical Research and Review*, 3(10), 1167-1173. <https://doi.org/10.17511/ijmrr.2015.i10.211>

- Ramírez, A., y Sánchez, R. (2009). *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 -2008): Epidemiología, microbiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 29(2), 158-170.
- Ramirez, G. (2021). *Tipos histoquímicos de metaplasia intestinal y su relación con la displasia gástrica en diagnósticos histopatológicos de biopsias gástricas con metaplasia intestinal* [Tesis]. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Redéen, S., Petersson, F., Törnkrantz, E., Levander, H., Mårdh, E., y Borch, K. (2011). Reliability of Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology Research and Practice*, 2011, 940650. <https://doi.org/10.1155/2011/940650>
- Rotimi, O., Cairns, A., Gray, S., Moayyedi, P., y Dixon, M. (2000). Histological identification of *Helicobacter pylori*: Comparison of staining methods. *Journal of Clinical Pathology*, 53(10), 756-759. <https://doi.org/10.1136/jcp.53.10.756>
- Soto, J., Rodríguez González, B., Moreno Guerra, A., y Chao González, L. (2013). Evaluación de la utilidad de diferentes métodos para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(1), 102-110.
- Tepes, B., Ferlan, V., Jutersek, A., Kavcic, B., y Zaletel, L. (1999). Interobserver agreement in the assessment of gastritis reversibility after *Helicobacter pylori* eradication. *Histopathology*, 34(2), 124-133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1999.00604.x>
- Toro, M. (2010). *Comparación de las tinciones Hematoxilina-Eosina y Giemsa para la identificación de Helicobacter pylori en muestras de biopsia gástrica de pacientes del hospital IESS Riobamba entre octubre y diciembre del 2009* [Tesis]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Trakarnvanich, V. (2007). Methylene blue staining of gastric tissue for the identification of *Helicobacter pylori*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(1), 78-81.

Vásquez, A. (2008). *Variabilidad interobservador en la identificación de Helicobacter pylori en biopsias gástricas* [Tesis]. Universidad Nacional de Trujillo.

Vizcaíno, G. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y Laboratorio*, 23(7-8), 365-386. <https://doi.org/10.36384/01232576.34>

IX. Anexos

Anexo A: Cuadro de operación de variables

VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR
Presencia de <i>Helicobacter pylori</i>	Medido mediante la observación de la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> en la lámina histológica observada y apuntado en una ficha de recolección de datos	Variable unidimensional	Cualitativa	Nominal	Sí No
Método de coloración empleado	Medido según la observación del código de prueba, el cual identifica qué láminas histológicas fueron tratadas por un determinado protocolo, y apuntado mediante una ficha de recolección de datos	Variable unidimensional	Cualitativa	Nominal	Azul de Metileno de HAMA Hematoxilina-Eosina GIEMSA
Diagnóstico histopatológico	Medido según la observación del registro (software del laboratorio) del diagnóstico realizado, y apuntado mediante una ficha de recolección de datos	Variable unidimensional	Cualitativa	Nominal	Registro del diagnóstico histopatológica de las diversas características gástricas evaluadas
Zona de procedencia de la biopsia gástrica	Medido según la observación del registro (software del laboratorio) del tipo de muestra de la cual proviene el bloque de parafina empleado, y apuntado mediante una ficha de recolección de datos	Variable unidimensional	Cualitativa	Nominal	Cuerpo Antro

Anexo B: Tablas de contingencia de la prueba piloto

Anexo 2.1. Resultados del nuevo método de coloración según cada observador para la identificación de *Helicobacter pylori* (n=50).

AM-HAMA – OBS 2	AM-HAMA – OBS 1	
	No	Sí
No	29	1
Sí	2	18

Nota. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA. OBS 1: Observador 1. OBS 2: Observador 2.

Anexo 2.2. Resultados del nuevo método de coloración en comparación con el Gold Standard para la identificación de *Helicobacter pylori* (n=50).

Método de coloración	Gold Standard	
	No (n=32)	Sí (n=18)
AM-HAMA		
No	29	1
Sí	3	17

Nota. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo C: Cálculos de tamaños de muestra – Software Epidat 4.2.

[1] Tamaños de muestra. Concordancia:**Datos:**

Kappa esperado:	0,870
Clasificaciones(+) observador 1:	40,000%
Clasificaciones(+) observador 2:	38,000%
Nivel de confianza:	95,0%

Resultados:

Precisión	Tamaño de la muestra
0,100	99

[2] Tamaños de muestra. Pruebas diagnósticas:**Datos:**

Sensibilidad esperada:	94,400%
Especificidad esperada:	90,600%
Prevalencia de la enfermedad:	36,000%
Nivel de confianza:	95,0%

Resultados:

Precisión (%)	Tamaño de la muestra
10,000	57

Anexo D: Ficha de recolección de datos.

1. Código de la lámina histológica:
2. Zona de procedencia de la biopsia gástrica:
3. Diagnóstico de la biopsia gástrica:
4. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i>: a) Sí b) No

Anexo E: Aprobación por la Facultad de Tecnología Médica – UNFV.



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Facultad de Tecnología Médica

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

"OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO"

El Agustino, 02 de diciembre de 2021.

OFICIO N°1383-2021-OGGE-FTM-UNFV

Magister
ROBERTO EUGENIO ROJAS LEON
Docente de la Facultad de Tecnología Médica
Presente.-

Es grato dirigirme a usted saludándolo cordialmente, para hacer de conocimiento que ha sido designado **ASESOR DE LA TESIS** titulada: **AZUL DE METILENO DE HAMA EN COMPARACIÓN CON DOS COLORACIONES PARA IDENTIFICAR *Helicobacter pylori***, presentado por la Lic. **GIAN CARLOS RAMIREZ UBILLUS**, para obtener el Título de **ESPECIALISTA en HISTOTECNOLOGIA**.

Asimismo, que de acuerdo a la R.R. N°2900-2018-CU-UNFV de fecha 25.06.2018 en el artículo 49°, que a la letra dice: De aprobarse, se otorga al egresado, bachiller, titulado o maestro un plazo de hasta un año calendario para su presentación y posterior sustentación.

El desarrollo de la Tesis debe de estar de acuerdo a la Guía de presentación de trabajos de investigación, remitido por el VRIN con OFICIO MULTIPLE N° 009-2021-ORC-BC-VRIN-UNFV, que se adjunta

Una vez revisado y con las correcciones hechas, usted procederá a firmar el Informe Final de la Asesoría de Tesis. A fin de que continúe el trámite.

Agradeciendo su apoyo y colaboración, sea oportuna la ocasión para expresar mi especial deferencia y estima.

Atentamente



Mg. **Morpina Angélica Lagos Castillo**
Jefa

Oficina de Grados y Gestión del Egresado

Adj. Plan de Tesis digital
Anexo II
Modelo de caratula
Guía de presentación de trabajos de Investigación
MALC/ivonne

Jr. Río Chepén N° 290 – El Agustino
Teléfono: 7480888 – IP 8605 Telefax: 3627477

Anexo F: Aprobación por el jefe del Laboratorio Oncológico Taxa.



Lima, 05 de enero del 2022

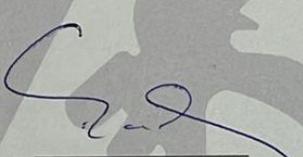
Mg. Gian Carlos Ramirez Ubillus,

De mi mayor consideración:

Yo, Dr. Luis Taxa Rojas, gerente general del Laboratorio Oncológico Taxa (RUC: 20600082443, Dirección: Calle Monte Grande Nro. 109, Int. 506), tengo a bien dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y, asimismo, informarle que APRUEBO su plan de investigación "Azul de metileno de HAMA en comparación con dos coloraciones para identificar *Helicobacter pylori*" de la segunda especialidad en Histotecnología - UNFV.

En ese sentido, autorizo que pueda recolectar la información pertinente que permita la ejecución del mismo.

Sin otro particular, agradezco su atención.



Dr. Luis Taxa Rojas

Lab. Oncológico Taxa
Dr. Luis M. Taxa Rojas
GERENTE GENERAL

Anexo G: Protocolos de los métodos de coloración.

- A partir de los bloques seleccionados, se realizaron cortes a 3 micras (láminas pavonadas convencionales, sin ningún tipo de aditivo adicional), y se colocaron estas láminas en una estufa a 85°C durante 20 minutos. Luego, se desparafinó mediante dos cambios en Xilol durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, se hidrató mediante dos cambios en alcohol absoluto (5 minutos cada uno) y dos cambios en alcohol de 96° (cambios rápidos – entre 2 y 3 segundos), y se procedió a colorear mediante cada uno de los métodos.

*En el caso del método de coloración Hematoxilina-Eosina:

- Las láminas se colocaron en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos, y se lavaron en agua corriente durante 1 minuto. Después, se diferenciaron con alcohol ácido durante 5 segundos, y se lavaron en agua corriente durante 30 segundos. Posteriormente, se realizó el azulamiento mediante agua amoniacal durante 1 minuto, y se lavaron en agua corriente durante 30 segundos.

- Finalmente, las láminas se colocaron en Eosina Yellowish-Floxina durante 10 segundos, y se lavaron en agua corriente durante 15 segundos.

- Se deshidrató brevemente mediante dos cambios en alcohol de 96° y dos cambios en alcohol absoluto (cambios rápidos – entre 2 y 3 segundos).

- Se secaron las láminas mediante el uso de un ventilador, y se montó en bálsamo de Canadá sintético.

*En el caso del método de coloración Giemsa (Modificación de Wolbach):

- Las láminas se colocaron dentro de un coplin con 40 ml de la Solución de trabajo de Giemsa (mezcla de 1,25 ml de la solución madre de Giemsa, 1.50 ml de alcohol metílico, agua destilada hasta 50 mL) durante 2 horas. La solución madre se preparó de la siguiente forma: 1 gramo de

Giemsa en polvo, 66 mL de glicerina, y 66 mL de alcohol metílico. Finalmente, se lavaron las láminas en agua corriente durante 1 minuto.

- Se deshidrató brevemente mediante dos cambios en alcohol de 96° y dos cambios en alcohol absoluto (cambios rápidos – entre 2 y 3 segundos).

- Se secaron las láminas mediante el uso de un ventilador, y se montó en bálsamo de Canadá sintético.

*En el caso del método de coloración de este nuevo colorante:

El nombre de adquisición para este nuevo colorante es “Gissell’s Stain”. Se patentó ello a través de BIOSIX, empresa peruana distribuidora de productos y equipos para anatomía patológica.

Una vez obtenido este colorante, se realizaron los siguientes pasos:

- Mediante el uso de una pipeta de Pasteur de plástico, se agregaron de 1 a 2 dos gotas de este colorante al tejido, lo suficiente como para cubrir su extensión, durante 2 segundos.

- Se secaron las láminas mediante el uso de un ventilador (un par de minutos) o al medio ambiente (aproximadamente 10 minutos), una vez seco, se montó en bálsamo de Canadá sintético.

Anexo H: Solicitudes de participación de los observadores

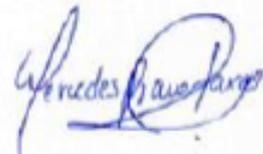
Lima, 05 de enero del 2022

Mg. Gian Carlos Ramirez Ubillus,

De mi mayor consideración:

Yo, Mercedes del Pilar Bravo Taxa, médico anatomopatólogo, con número de colegiatura 60950, tengo a bien dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y, asimismo, informarle que ACEPTO participar como evaluador de las láminas histológicas para la prueba piloto y ejecución final de su trabajo de investigación "Azul de metileno de HAMA en comparación con dos coloraciones para identificar *Helicobacter pylori*".

Sin otro particular, agradezco su atención.



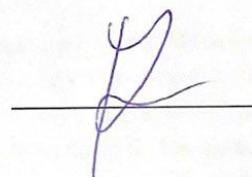
Lima, 28 de enero del 2022

Mg. Gian Carlos Ramirez Ubillus,

De mi mayor consideración:

Yo, Renier Cesar Cruz Baca, médico anatomopatólogo, con número de colegiatura 48704, tengo a bien dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y, asimismo, informarle que ACEPTO participar como evaluador de las láminas histológicas para la prueba piloto y ejecución final de su trabajo de investigación "Azul de metileno de HAMA en comparación con dos coloraciones para identificar *Helicobacter pylori*".

Sin otro particular, agradezco su atención.



Anexo I: Coincidencia de la significancia estadística de los resultados provistos por los métodos de coloración, en comparación con el Gold Standard, según patología coexistente y zona gástrica evaluada.

Anexo 9.1. *Análisis entre la presencia de hiperplasia foveolar y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).*

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Hiperplasia foveolar		p†
	No (n=95) n (%)	Sí (n=4) n (%)	
HE			
No	70 (94.6)	4 (5.4)	0.569
Sí	25 (100.0)	0 (0.0)	
GIEMSA			
No	64 (97.0)	2 (3.0)	0.599
Sí	31 (93.9)	2 (6.1)	
AM-HAMA			
No	57 (95.0)	3 (5.0)	1.000
Sí	38 (97.4)	1 (2.6)	
Gold Standard			
No	61 (95.3)	3 (4.7)	1.000
Sí	34 (97.1)	1 (2.9)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo 9.2. *Análisis entre la infiltración de la gastritis crónica y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).*

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Grado de infiltración		p†
	Superficial	Profunda	
	(n=52) n (%)	(n=47) n (%)	
HE			
No	41 (55.4)	33 (44.6)	0.361
Sí	11 (44.0)	14 (56.0)	
GIEMSA			
No	37 (56.1)	29 (43.9)	0.394
Sí	15 (45.4)	18 (54.6)	
AM-HAMA			
No	34 (56.7)	26 (43.3)	0.410
Sí	18 (46.1)	21 (53.9)	
Gold Standard			
No	38 (59.4)	26 (40.6)	0.092
Sí	14 (40.0)	21 (60.0)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo 9.3. *Análisis entre la actividad de la gastritis crónica y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).*

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Nivel de actividad			p†
	Ausente	Leve	Moderada	
	(n=30) n (%)	(n=30) n (%)	(n=39) n (%)	
HE				
No	29 (39.2)	25 (33.8)	20 (27.0)	<0.001
Sí	1 (4.0)	5 (20.0)	19 (76.0)	
GIEMSA				
No	30 (45.4)	18 (27.3)	18 (27.3)	<0.001
Sí	0 (0.0)	12 (36.4)	21 (63.4)	
AM-HAMA				
No	30 (50.0)	16 (26.7)	14 (23.3)	<0.001
Sí	0 (0.0)	14 (35.9)	25 (64.1)	
Gold Standard				
No	30 (46.9)	18 (28.1)	16 (25.0)	<0.001
Sí	0 (0.0)	12 (34.3)	23 (65.7)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo 9.4. *Análisis entre la presencia de metaplasia intestinal y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).*

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Metaplasia intestinal		p†
	No (n=88) n (%)	Sí (n=11) n (%)	
HE			
No	65 (87.8)	9 (12.2)	0.725
Sí	23 (92.0)	2 (8.0)	
GIEMSA			
No	58 (87.9)	8 (12.1)	0.747
Sí	30 (90.9)	3 (9.1)	
AM-HAMA			
No	54 (90.0)	6 (10.0)	0.748
Sí	34 (87.2)	5 (12.8)	
Gold Standard			
No	57 (89.1)	7 (10.9)	1.000
Sí	31 (88.6)	4 (11.4)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo 9.5. *Análisis entre la presencia de atrofia gástrica y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).*

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Atrofia gástrica		p†
	No (n=93) n (%)	Sí (n=6) n (%)	
HE			
No	68 (91.9)	6 (8.1)	0.333
Sí	25 (100.0)	0 (0.0)	
GIEMSA			
No	61 (92.4)	5 (7.6)	0.660
Sí	32 (97.0)	3 (3.0)	
AM-HAMA			
No	55 (91.7)	5 (8.3)	0.398
Sí	38 (97.4)	1 (2.6)	
Gold Standard			
No	59 (92.2)	5 (7.8)	0.419
Sí	34 (97.1)	1 (2.9)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo 9.6. *Análisis entre la presencia de displasia gástrica y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).*

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Displasia gástrica		p†
	No (n=96) n (%)	Sí (n=3) n (%)	
HE			
No	72 (97.3)	2 (2.7)	1.000
Sí	24 (96.0)	1 (4.0)	
GIEMSA			
No	64 (97.0)	2 (3.0)	1.000
Sí	32 (97.0)	1 (3.0)	
AM-HAMA			
No	59 (98.3)	1 (1.7)	0.560
Sí	37 (94.9)	2 (5.1)	
Gold Standard			
No	63 (98.4)	1 (1.6)	0.285
Sí	33 (94.3)	2 (5.7)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.

Anexo 9.7. Análisis entre la zona gástrica evaluada y los métodos de coloración utilizados, incluyendo el Gold Standard (n=99).

Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	Zona gástrica		p†
	Cuerpo (n=42)	Antro (n=57)	
	n (%)	n (%)	
HE			
No	31 (41.9)	43 (58.1)	1.000
Sí	11 (44.0)	14 (56.0)	
GIEMSA			
No	26 (39.4)	40 (60.6)	0.399
Sí	16 (48.5)	17 (51.5)	
AM-HAMA			
No	23 (38.3)	37 (61.7)	0.405
Sí	19 (48.7)	20 (51.3)	
Gold Standard			
No	24 (37.5)	40 (62.5)	0.206
Sí	18 (51.4)	17 (48.6)	

Nota. †Prueba exacta de Fisher de 2 colas. HE: Hematoxilina-Eosina. AM-HAMA: Azul de metileno de HAMA.