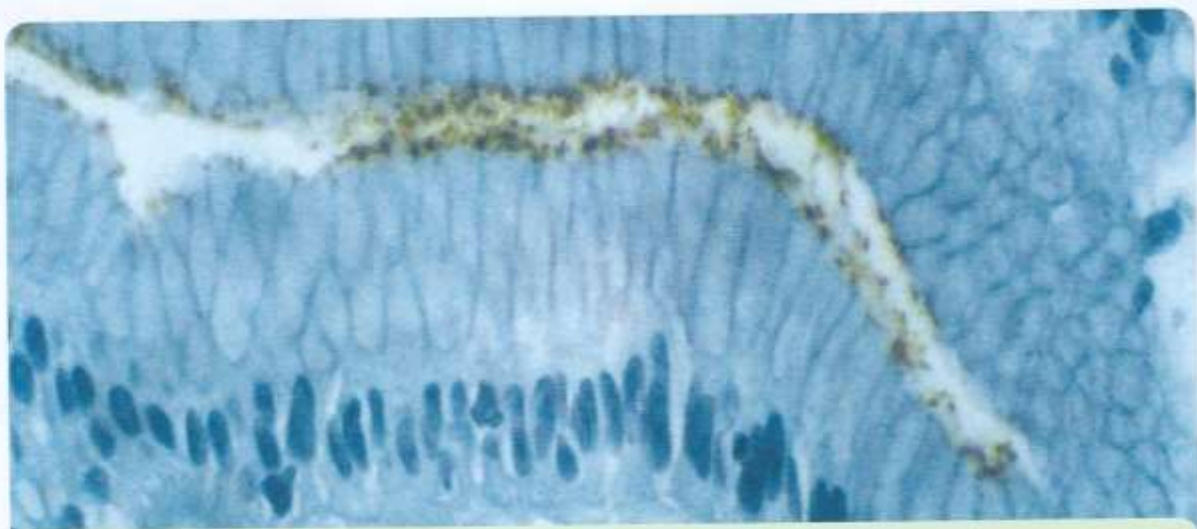


Detecção de *H. pylori* em Anatomia Patológica: comparação de várias técnicas histoquímicas e imunocitoquímica.

Amadeu B. Ferro¹; Inês C. Nerra²; Patrícia A. Mendes; Pedro N. Lopes³
 1- ESTeSL – Lisboa; 2- CDCSA – Lisboa; 3- IPOFG – Lisboa; 4- CHL(S.José) – Lisboa

Correspondência para: Amadeu B. Ferro – e-mail: amadeu.ferro@estel.ipl.pt



A elevada incidência e prevalência do *Helicobacter pylori* na população mundial, representa uma preocupação emergente. É alarmante saber, que esta bactéria para além de promover estes padrões epidemiológicos é igualmente um microorganismo altamente patogénico para os seres humanos. Este facto justifica, a pertinência de estudos que visam a identificação de técnicas, no âmbito da Anatomia Patológica, capazes de detectarem o *H. pylori* de forma perceptível e fiável. Foi objectivo deste trabalho identificar qual das técnicas de detecção do *H. pylori* em biópsias gástricas em estudo promove a melhor qualidade de coloração/imunomarcção, permitindo a melhor identificação do microorganismo.

Foram seleccionadas 40 biópsias gástricas que apresentavam diagnóstico positivo para *H. pylori*. De cada uma foram obtidos seis cortes seriados, aos quais se aplicaram as técnicas em estudo – Hematoxilina-Eosina, Giemsa, Sayeed, Leung, Warthin-Starry e Imunocitoquímica. Os resultados foram quantificados após visualização microscópica das lâminas e consequente classificação através de uma grelha de avaliação construída pelos investigadores, composta pelos critérios: intensidade, contraste e preservação tecidual. Todos os dados foram posteriormente analisados no programa SPSS® 12.0. Os resultados obtidos para os scores médios finais (escala 0 a 32) foram: Sayeed com 16,817; Hematoxilina-Eosina com 17,650; Leung com 23,442; Warthin-Starry com 23,733; Giemsa com 24,383 e a técnica de Imunocitoquímica com 30,108. Com recurso ao teste estatístico OneWay Anova verificou-se que os resultados obtidos para a imunocitoquímica são estatisticamente superiores aos de todas as outras técnicas e que os resultados obtidos para as Técnicas de Giemsa, Warthin-Starry e Leung são estatisticamente superiores aos obtidos para Sayeed e Hematoxilina-Eosina.

Conclui-se que a técnica de Imunocitoquímica representa o método mais indicado, dentro das técnicas em estudo, para identificar o *H. pylori* de forma perceptível e viável. Dentro dos métodos histoquímicos a técnica de Giemsa demonstra ser a mais indicada. Sugere-se para futuros trabalhos realizar um estudo, no qual seria validada uma escala de quantificação para resultados de Imunocitoquímica e para técnicas de Histoquímica, permitindo assim uma maior fiabilidade de comparabilidade entre investigações.

Palavras-chave:

Helicobacter pylori; coloração histoquímica; imunocitoquímica

INTRODUÇÃO

O microorganismo, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), é uma bactéria Gram negativa, hidrofóbica e microaerofílica, que coloniza o epitélio gástrico [2]. Quando visualizada em biópsias gástricas encontra-se normalmente sob a forma de bacilos curvos e espiralados, podendo o seu tamanho variar entre 2.5µm a 3.5µm de comprimento e 0.5µm a 1µm de diâmetro [8]. Esta bactéria apresenta, ainda, uma superfície lisa de pólos arredondados, contendo múltiplos flagelos unipolares [8].

A elevada incidência e prevalência do *Helicobacter pylori* na população mundial, representa uma preocupação iminente. É alarmante saber, que esta bactéria promove níveis tão elevados de infecção, mesmo quando não existem as condições de transmissão que o justifiquem [2]. Por outro lado, a difícil detecção e erradicação da mesma, garantem que o índice de prevalência se mantenha futuramente tão elevado, como o é nos dias de hoje. Actualmente, já foi comprovada a associação da infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de patologias graves do foro gástrico [13]. Estas podem ser desde gastrites agudas, gastrites crónicas, metaplasias intestinais, displasias, até carcinomas gástricos ou linfomas MALT [16]. Associando os padrões epidemiológicos ao facto deste microorganismo ser altamente patogénico para os seres humanos, facilmente se compreende a pertinência de investigações que tenham como campo de estudo, o *H. pylori*.

Detecção do *Helicobacter pylori*

As variadas técnicas que permitem a identificação do *H. pylori*, podem ser agrupadas em dois tipos de métodos: não invasivos e invasivos. Incluem-se neste último as técnicas que requerem a colheita de fragmentos da mucosa gástrica por endoscopia, como, por exemplo, a Histologia [2]. Como todas as outras técnicas de detecção do *H. pylori*, a Histologia apresenta vantagens e desvantagens. Porém, é o único método que estende a sua avaliação para além da identificação do microorganismo, o que se revela extremamente útil quando se quer contextualizar a infecção caracterizando as lesões da mucosa gástrica [2].

Técnicas em Histologia

A avaliação histológica do *H. pylori* pode ser realizada com o recurso a várias técnicas de coloração que o evidenciam. De acordo com a literatura consultada [9,12,14] as técnicas de coloração mais utilizadas serão a Hematoxilina-Eosina (HE), Giemsa, Leung, Sayeed e Warthin-Starry. Existe ainda a técnica imunocitoquímica que recorre a interacções antigénio-anticorpo.

Hematoxilina & eosina

Esta coloração tem por base a atracção de cargas opostas entre os tecidos e as moléculas dos corantes. O *H. pylori*, apesar de fracamente hematoxínófilo, pode ser realmente identificado com a técnica de HE, nomeadamente se existir em grandes quantidades [5]. Assim, obtém-se os seguintes resultados: *H. pylori* corado de roxo claro, núcleos marcados a roxo e citoplasma corado de cor-de-rosa vivo.

Giemsa

A técnica de Giemsa pertence a um grupo de colorações que têm a sua origem na coloração de Romanowsky, que, em 1891, obteve uma solução de Eosina Y e de Azul de Metileno oxidado, que foi inicialmente utilizada para identificar os parasitas da malária. Nesta técnica, o Azul de Metileno cora o *H. pylori* e os núcleos das células de azul escuro, enquanto que a Eosina Y marca o grânulos eosinófilos, os eritrócitos e o citoplasma das células de cor-de-rosa [15].

Segundo Cairns [1] a grande desvantagem desta técnica é apresentar pouco contraste entre o microorganismo e o tecido.

Leung

A técnica de Leung foi apresentada como um método rápido de coloração de *H. pylori* por Gibbon, Leung & Vartanian [10]. Esta técnica baseia-se essencialmente na aplicação de dois corantes, o Amarelo de Alciano e o Azul de Toluidina. Após aplicação da coloração obtém-se um corte histológico em que se podem observar as bactérias a azul, o fundo a azul claro e as mucinas a amarelo.

A grande vantagem desta técnica reside nas cores que utiliza. Dado que, as bactérias se localizam prefe-

rencialmente na zona do muco e que este se encontra corado de amarelo, facilmente a marcação azul que identifica estes microorganismos sobressai. Mediante a literatura consultada, esta é uma das técnicas mais indicadas para a identificação histológica do *H. pylori* [12].

Sayeed

A técnica de Sayeed é bastante similar à técnica de PAS [5], pois ambas têm como reagentes o ácido periódico, o reagente de Schiff e a Hematoxilina de Harris. A principal diferença reside na adição do Azul de Metileno ao protocolo da técnica de Sayeed. Desta forma, é possível distinguir o *H. pylori* a azul brilhante, as mucinas a magenta e os núcleos a roxo. Numa primeira análise, esta coloração reúne um padrão de cores que poderá promover uma boa visualização do microorganismo e conseqüentemente facilitar a sua identificação. No entanto, a sensibilidade e rapidez de reacção do Azul de Metileno provoca por vezes algumas contrariedades, pela sobrecoloração das estruturas [5].

Warthin-Starry

Em 1920, Aldred Scott Warthin e Allen Chronister Starry, demonstraram, através de uma impregnação argéntica, espiroquetas nos tecidos [18]. Esta técnica, que teve por nome Warthin-Starry, conheceu mais tarde outra aplicação, tendo sido utilizada por um dos primeiros cientistas a descrever o *H. pylori*, dado que se constatou que permite uma boa observação destes microorganismos [2].

A técnica de Warthin-Starry baseia-se na deposição de sais de prata que, após a sua conversão em forma metálica, permitem a visualização da estrutura pretendida. Caso a amostra seja positiva para *H. pylori*, esta bactéria, assinalada a preto, irá sobressair no meio das estruturas tecidulares marcadas a amarelo pálido e a castanho claro [4]. No entanto, existe a possibilidade da própria técnica conferir uma aparência granular aos organismos, o que pode ser confundido com precipitado de prata [15]. Além destes factores, o Warthin-Starry é dispendioso, moroso e prejudicial para o meio ambiente. Por fim, apresenta uma marcação que desvanece com o tempo, exigindo observação imediata

das lâminas ou, em alternativa, o seu armazenamento em local frio e escuro [5].

Imunocitoquímica

A Imunocitoquímica (ICQ) é uma metodologia utilizada para diagnóstico em cortes histológicos, cujo mecanismo se baseia nas reacções antigénio-anticorpo. Neste trabalho foi utilizado o soro policlonal Rabbit anti-*Helicobacter Pylori* (diluição 1/500) da DaKoCytomation (B0471) com recurso ao método de recuperação antigénica por calor, utilizando-se uma panela de pressão (2 minutos) em conjunto com o tampão bórico 0,02M a pH 7.0 [11]. Foi aplicada a técnica do polímero indirecto com peroxidase/DAB – *LabVision Corporation* TL-060-HL.

O crescente uso desta técnica de detecção do microorganismo, está relacionado com o facto de promover uma elevada intensidade de marcação, pelo que demonstra melhorar o rácio de identificação da bactéria após tratamento, mesmo quando a histoquímica e a cultura apresentam resultados falsos-negativos [6]. Outra vantagem que a ICQ apresenta reside no reconhecimento das denominadas formas cocóides do *Helicobacter pylori* [3]. Assim sendo, tendo por base estes fundamentos teóricos, que indicam a obtenção de uns bons resultados pela marcação ICQ, justifica-se a sua comparação com as técnicas em estudo, já fundamentadas anteriormente.

Objectivos

Todos os factos referidos anteriormente justificam a constante procura de técnicas de detecção do *H. pylori*, nomeadamente em Anatomia Patológica, capazes de identificar o microorganismo de forma perceptível e fiável. É fulcral o desenvolvimento destas técnicas, uma vez que constituem o ponto de partida para a erradicação da bactéria e de certo modo, as patologias a ela associadas.

Assim, foi decidido realizar um estudo que conta com o objectivo geral:

- Investigar a utilização das técnicas de detecção do *H. pylori* em biópsias gástricas.

Foi também constituído o seguinte objectivo específico:

- Identificar qual das técnicas de detecção do *H. pylori* em biópsias gástricas em estudo, promove a melhor qualidade de coloração/imunomarcação, permitindo a melhor identificação do microorganismo.

MATERIAL E MÉTODOS

No contexto deste estudo de caso com vertente experimental, denominaram-se de variáveis independentes as técnicas de histoquímica (H&E, Giemsa modificado, Leung, Sayeed e Warthin-Starry) e de imunohistoquímica (marcação anti-*H. pylori*). De acordo com a sua natureza, são igualmente classificadas como sendo qualitativas e nominais, dado que se referem a categorias não quantificáveis. A variável dependente, no estudo em causa, corresponde à qualidade final da coloração/imunomarcação. Para a materialização desta variável composta concorrem os parâmetros de intensidade, contraste e preservação tecidular. Pelo facto desta variável promover dados observáveis e quantificáveis, será classificada como sendo quantitativa, contínua e de intervalo.

Procedimentos

A selecção do material histológico (biópsias gástricas) necessário para o estudo teve por base as existências dos anos de 2004 e de 2005, tendo sido escolhidos os 40 casos que apresentavam maior presença de *H. pylori*. Foi realizado o corte histológico de cada caso com uma espessura entre 2 a 3µm recorrendo a um micrótopo de corrediça (Leica SM200R).

As colorações foram realizadas segundo os protocolos recolhidos nos Serviços de Anatomia Patológica do Hospital de São José e do Hospital de Santa Maria. De modo geral, esta etapa foi realizada em método manual, com excepção de três técnicas, a técnica de H&E, a técnica de Giemsa e a técnica de ICQ. Optou-se por realizar as duas primeiras técnicas no aparelho de coloração (Leica Autostainer XL) por ser já procedimento habitual no Hospital onde decorreu a fase empírica. A técnica de Imunocitoquímica foi executada numa câmara de incubação especial (ThermoShandon Sequenza), de modo a diminuir a

discrepância entre os tempos de aplicação dos soros entre as várias lâminas. No final de cada técnica, as lâminas foram montadas num aparelho de montagem de lâminas (Mícron CT M6).

Instrumentalização

A medição das variáveis consiste em aplicar regras precisas na elaboração dos métodos e instrumentos para medir características ou atributos. No presente estudo, o objectivo é quantificar cada um dos parâmetros (intensidade, contraste, preservação tecidular) que contribuem para a variável dependente, tendo-se optado pela utilização de uma escala diferencial semântica que permite a obtenção de resultados sob a forma de dados quantitativos em escala de intervalo. Na falta de definições objectivas de cada um dos parâmetros em análise os investigadores decidiram formulá-los sob a forma de construtos que são conceitos especialmente inventados pelo investigador ou adaptados por ele, com um objectivo científico preciso.

Assim temos:

1. Intensidade – Capacidade de promover a visualização do *H. pylori* de forma evidente e distintiva das estruturas tecidulares envolventes. Para a medição do parâmetro intensidade aplicou-se uma escala que apresentava 5 unidades de avaliação, posteriormente ordenadas de 0-4 pontos. Foram apenas etiquetados os extremos, de modo que o zero significará a ausência de intensidade e o quatro o máximo do fenómeno. A Figura 1 esquematiza o instrumento de medida utilizado na avaliação desta propriedade.



Fig. 1: Escala da intensidade

2. Contraste – Capacidade de uma segunda cor facultar a visualização mais evidente do *H. pylori*, quando de outra forma não existiria. A medição desta propriedade efectuou-se através de uma metodologia equivalente à anteriormente descrita.

3. Preservação Tecidular – Capacidade de preservação dos seguintes achados: arquitectura tecidular;

detalhe citoplasmático; detalhe nuclear e limites celulares bem definidos [9]. A medição desta propriedade efectuou-se através de uma metodologia equivalente às anteriormente descritas.

Optou-se por atribuir factores de ponderação a cada um dos parâmetros, de modo a diferenciar a sua importância no fenómeno em estudo. Relativamente à intensidade, esta consiste na propriedade mais indicativa quando se pretende distinguir uma boa técnica de uma má técnica de coloração/marcação. Assim sendo, no final da avaliação de cada lâmina, acerca deste parâmetro, multiplicou-se o *score* obtido, pelo factor de ponderação 4. Em relação ao parâmetro contraste foi decidido atribuir o factor de ponderação 3, uma vez que foi considerado menos importante do que a intensidade para definição da qualidade de uma técnica. Apesar de um bom contraste permitir a rápida e fácil visualização do microorganismo, nunca é tão significativo como uma boa intensidade do microorganismo. Finalmente em relação ao parâmetro preservação tecidual foi atribuído o factor de ponderação 1. Considerou-se que este não apresentava o mesmo grau de importância que os anteriormente dis-

cutidos, dado que o objectivo principal pretende a identificação correcta do microorganismo.

Desta forma obteve-se a seguinte fórmula final:

$$\text{Score final} = 4 \cdot (\text{intensidade}) + 3 \cdot (\text{contraste}) + (\text{preservação tecidual})$$

Posteriormente cada caso foi avaliado quanto à intensidade, contraste e preservação tecidual nas seis técnicas em estudo – H&E, Giemsa, Sayeed, Leung, WS e ICQ – por três observadores independentes. No final calculou-se a média de cada *score* atribuído pelos investigadores e aplicou-se o respectivo factor de ponderação, sendo em seguida aplicadas as metodologias estatísticas consideradas apropriadas, tendo sempre como base o nível de significância $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

Depois de aplicadas as técnicas em estudo as lâminas obtidas (Fig. 2) foram avaliadas pelo painel de observadores independentes.

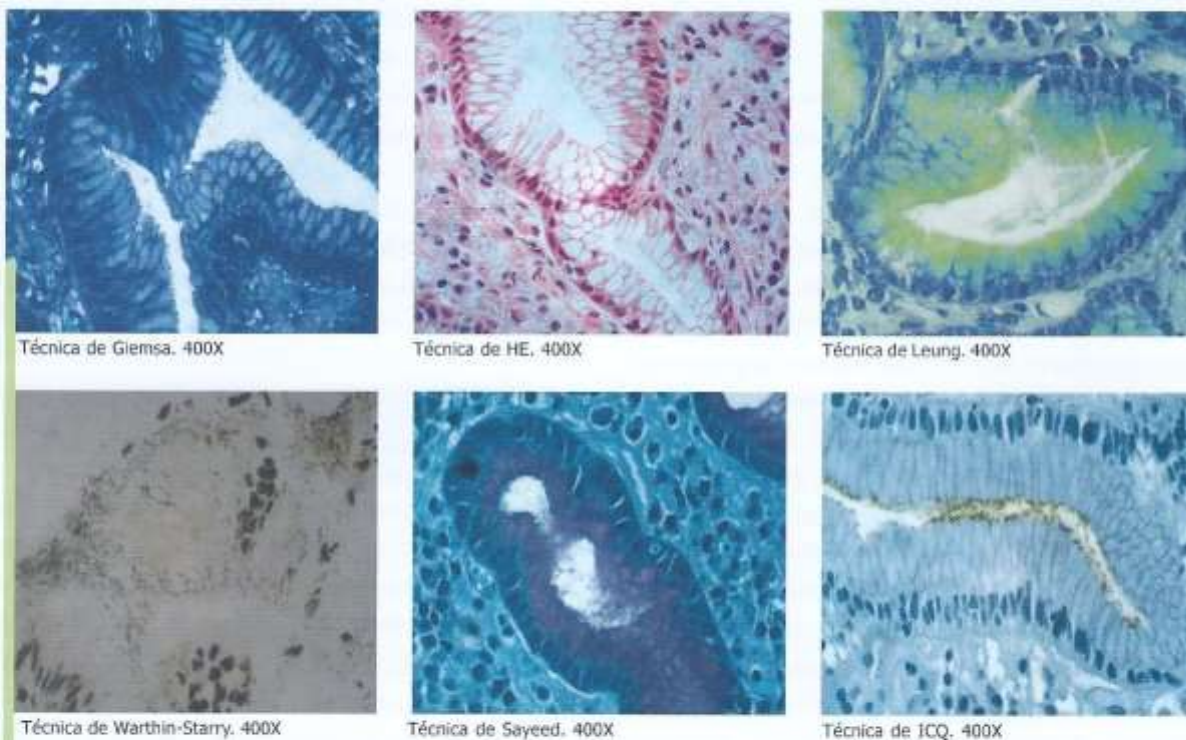


Fig. 2: Exemplos de imagens microscópicas obtidas após aplicação das diferentes técnicas.

Os resultados obtidos para os "scores" finais, foram classificados numa escala de 33 unidades numeradas de 0 (mínimo) a 32 (máximo). Assim, localizam-se por ordem crescente: a técnica de Sayeed com 16,817; a técnica de H&E com 17,650; a técnica de Leung com 23,442; a técnica de Warthin-Starry com 23,733; a técnica de Giemsa com 24,383; e a técnica de ICQ com 30,108 (Fig. 3).

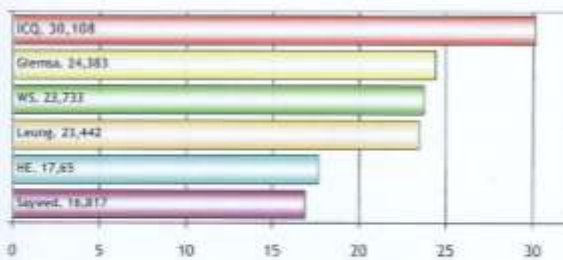


Fig. 3: Valores médios dos scores finais.

Em termos de dispersão de resultados podemos verificar que a técnica de ICQ foi aquela que apresentou maior homogeneidade de resultados, uma vez que os seus scores extremos são muito próximos, sendo o seu máximo 31,667 e o seu mínimo 27,666. Esta técnica apresenta ainda uma ligeira assimetria negativa ou enviesada à direita, como se pode observar pela localização da mediana no respectivo diagrama de caixas. As técnicas de Giemsa e H&E apresentam, igualmente, alguma assimetria negativa ou enviesada à direita, porém no que concerne à dispersão dos resultados, ambas demonstram maior discrepância que a ICQ, tal como se pode comprovar pelos seus extremos (29,000 de máximo e 20,000 de mínimo para o Giemsa, e 24,333 de máximo e 13,333 de mínimo para a H&E). Finalmente pode-se observar que as colorações de Leung, Warthin-Starry e Sayeed foram aquelas que tiveram maiores dispersões nos resultados obtidos. Estes resultados são justificados pelos valores dos respectivos extremos máximos e mínimos, sendo eles, 29,667 e 15,000 para o Leung, 29,000 e 14,666 para o Warthin-Starry, e 25,000 e 9,667 para o Sayeed. Relativamente à simetria dos dados, o Leung e o Warthin-Starry apresentam ligeira assimetria negativa ou enviesada à direita, enquanto que o Sayeed apresenta ter uma caixa de bigodes simétrica (Fig. 4).

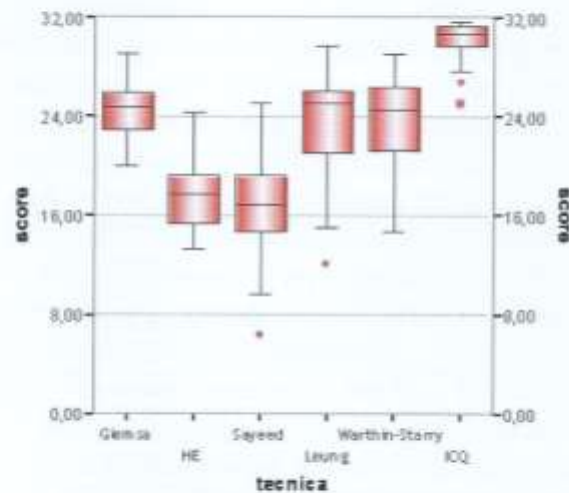


Fig. 4: Diagrama de Caixas para os "scores" finais de cada técnica.

A aplicação do teste One-Way-ANOVA apresentou um nível de significância de 0.000. Este valor indica que existem diferenças estatisticamente relevantes entre as médias dos "scores" finais, nas técnicas em estudo. Os valores obtidos com a aplicação do teste *post-hoc* HSD de Tukey (Tabela I) destacados a negrito permitem constatar que as técnicas apresentam as seguintes relações:

- Os resultados obtidos para a ICQ são estatisticamente superiores aos de todas as outras técnicas.
- Os resultados obtidos para as Técnicas de Giemsa, Warthin-Starry e Leung são estatisticamente superiores aos obtidos para Sayeed e HE.
- Não existem diferenças estatisticamente relevantes entre Giemsa, Warthin-Starry e Leung.
- Não existem diferenças estatisticamente relevantes entre HE e Sayeed.

DISCUSSÃO

Através da análise dos resultados, verifica-se que a ICQ é a técnica em estudo que apresenta o *score* médio, mais elevado. Por outro lado, esta é também, a técnica que demonstra menor dispersão dos dados. Tal facto permite constatar que a ICQ promove resultados pouco discrepantes entre si.

Técnica (I)	Técnica (J)	Diferença de Médias (I - J)	Valor P
Giemsa	H&E	6,733	0,000
	Sayeed	7,566	0,000
	Leung	0,941	0,753
	Warthin-Starry	0,650	0,937
	ICQ	-5,724	0,000
H&E	Giemsa	-6,733	0,000
	Sayeed	0,833	0,836
	Leung	-5,791	0,000
	Warthin-Starry	-6,083	0,000
	ICQ	-12,458	0,000
Sayeed	Giemsa	-7,566	0,000
	H&E	-0,833	0,836
	Leung	-6,625	0,000
	Warthin-Starry	-6,916	0,000
	ICQ	-13,291	0,000
Leung	Giemsa	-0,941	0,753
	H&E	5,791	0,000
	Sayeed	6,625	0,000
	Warthin-Starry	-0,291	0,998
	ICQ	-6,666	0,000
Warthin-Starry	Giemsa	-0,650	0,937
	H&E	6,083	0,000
	Sayeed	6,916	0,000
	Leung	0,291	0,998
	ICQ	-6,374	0,000
ICQ	Giemsa	5,724	0,000
	H&E	12,458	0,000
	Sayeed	13,291	0,000
	Leung	6,666	0,000
	Warthin-Starry	6,374	0,000

Tabela I: Teste *post-hoc* HSD Tukey, relativamente às técnicas em estudo.

Assim, esta demonstra ser a técnica com maior consistência de resultados e a mais indicada para identificar o microorganismo nos casos em estudo.

A seguir à ICQ, parece haver um grupo de técnicas histoquímicas (Giemsa, Warthin-Starry e Leung), que garantem a detecção do *H. pylori* com a mesma fiabilidade. Apesar de inferiores à ICQ, o referido grupo não deixa de apresentar "scores" médios bastantes superiores ao valor central da escala de avaliação (16,000).

Por último, encontram-se as colorações de H&E e de Sayeed, como sendo as menos indicadas, das técnicas em estudo, para identificar o microorganismo em questão. No entanto, estas também constituem uma

opção válida para detectar o *H. pylori*, uma vez que os seus "scores" médios se situam acima do valor central da escala já referida.

Apesar de existirem alguns estudos sobre este assunto, não foi identificado qualquer trabalho que comparasse as mesmas técnicas de histoquímica e de imunocitoquímica, que aqui é proposto relacionar. Este seu carácter inovador representa um dos factores que justifica a relevância da presente investigação.

Os resultados obtidos neste trabalho encontram eco na literatura consultada, uma vez que, segundo alguns autores [2,6], o Giemsa constitui a técnica histoquímica de eleição neste âmbito e a ICQ o método de maior fiabilidade. Ainda relativamente a este

parâmetro, ressalva-se que as técnicas de Warthin-Starry e de Leung parecem constituir duas boas alternativas.

O presente estudo apresentou algumas limitações na sua execução. Apesar de não ter sido possível ultrapassá-las, serão aqui explicitadas, para que em futuros trabalhos, possam ser superadas. Deste modo, surgiu como principal limitação desta pesquisa:

- As escalas de medidas não estão validadas podendo estar mais sujeitas a alguma subjectividade de aplicação por parte dos avaliadores;
- Paralelamente, é possível sugerir algumas ideias para futuros trabalhos, cujo âmbito de estudo esteja relacionado com este:
 - Realizar um estudo, no qual seriam investigados os resultados das seis técnicas aqui contempladas, em biópsias gástricas com intensa, moderada e fraca quantidade de *H. pylori*. Só assim, será possível concluir quanto à aplicabilidade das técnicas em causa, em amostras tecidulares com menores quantidades de microorganismo.
 - Validar uma escala de quantificação para resultados de ICQ e para técnicas de Histoquímica.

Agradecimentos

Poucas coisas são mais repugnantes do que a ingrati-dão. A realização deste trabalho, nunca teria sido conseguida sem o apoio de algumas individualidades e instituições. Assim, gostaríamos de agradecer:

- À Técnica Coordenadora Manuela Bordalo, e aos Técnicos Lic. Mário Matos, Pedro Rodrigues, Ana Rute Fernandes e José Ruivo, do Hospital de Santa Maria, pelas respectivas colaborações e cedência do protocolo de imunocitoquímica;
- À Técnica Coordenadora Lic. Ana Maria Teixeira e à Directora de Serviço Dra. Fernanda Cabrita do Centro Hospitalar de Lisboa, zona central (S. José), pela cedência do espaço e condições materiais do laboratório;
- Ao Técnico Lic. José Marques, do Hospital Militar Principal, pelo seu apoio incondicional.

Pela sua destacada contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa endereçamos um **agradecimento especial** ao Dr. Mário Coluna e ao Bacharel Fernando Freire, da empresa Labometer, pela cedência do soro anti-*H. pylori*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cairns A, Dixon M, Gray S, Rotimi O. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. *Journal Of Clinical Pathology* 2000; 53: 756-759.
2. Carneiro F, Figueiredo C, Nogueira A, Nogueira C. *Helicobacter pylori*: a bactéria e o diagnóstico da infecção. *micron* 1998; 2: 12-17.
3. Carneiro J, Junqueira L. *Histologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
4. Carson F. *Histotechnology: a self-instructional Text*. 2ª ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists; 1997.
5. Cunha M, Melanda A, Pereira J. *Helicobacter pylori*: uma bactéria fotogénica. *micron* 2000; 7: 14-18.
6. Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry*. New York: Churchill Livingstone; 2002.
7. Espinosa M, Rojas G, Vidal Y. *Helicobacter Pylori*. Documento inédito. http://www.microbiologia.org.mx/microbionsentina/CAPITULO_15/capitulo15.pdf (14 jul 2005)
8. Ferreira W, Sousa J. *Microbiologia*. 1ª ed. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas Lda; 2000.
9. Filipe M, Lake B. *Histochemistry in pathology*. 2ª ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.
10. Leung J, Gibbon K, Vartanian R. Rapid staining method for *helicobacter pylori* in gastric biopsies. *J. Histotechnol* 1996; 19: 131-132.
11. Polak J, Noorden S. *Introduction to immunocytochemistry*. 2ª ed. New York: BIOS Scientific Publishers; 1997.
12. Rhatigan-Drexler K. A comparison of staining methods for *helicobacter pylori*. *HistoLogic* 1999; 30: 3-8.
13. Rubin E, Farber J. *Pathology*. 3ª ed. Lippincott – Raver; 1999.
14. Siebert R, Stirling J. Romanovsky techniques. <http://home.primus.com.au/royellis/ST%5CROMTECH.htm> (14 jul 2005)
15. Vacca L. *Laboratory manual of histochemistry*. Lippincott: Williams & Wilkins; 1985.
16. Wabinga H. Comparison of immunohistochemical and modified giemsa stains for demonstration of *helicobacter pylori* infection in an african population. *African Health Sciences* 2002; 2(2), 52-55.
17. Worku M, Sidebotham R, Walker M, Keshavarz T, Karim Q. The relationship between *helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology* 1999; 145, 2803 – 2811.
18. Autor Desconhecido. Warthin-Starry stain. Documento inédito. http://www.fasthealth.com/dictionary/w/Warthin-Starry_stain.php (14 jul 2005)