



Jurnal Mikologi Klinik dan Penyakit Menular (JMKPM)

Vol. 2 No. 2 (2023) 17 - 23 | ISSN: 2964-8181 (Media Online)

Perbandingan Pengecatan Hematoxylin & Eosin (H&E), Toluidine Blue, dan Warthin-Starry pada *Helicobacter pylori*

Arthur Pohan. Kawilarang*

Departemen Mikrobiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Abstract

Helicobacter pylori is a gram-negative, spiral-shaped bacterium that can cause chronic ulcers, gastric carcinoma, and lymphoma. This study aims to compare the results of Haematoxylin & Eosin staining, Toluidine Blue staining, and Warthin-Starry staining with samples in the form of gastric biopsies that have been formed into paraffin blocks. The results of this research are a value of +1 for the Haematoxylin & Eosin (H&E) staining, +2 for the Toluidine Blue staining, and +3 for the Warthin-Starry staining. It can be concluded that Warthin-Starry provides the best results compared to other stains but has disadvantages due to its relatively expensive price and complicated procedure.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Haematoxylin & Eosin (H&E), Toluidine Blue, Warthin-Starry.

Abstrak

Helicobacter pylori adalah bakteri gram negatif berbentuk spiral yang dapat menyebabkan gastritis kronis, karsinoma lambung, dan limfoma. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antara hasil pengecatan Haematoxylin & Eosin, pengecatan Toluidine Blue, dan pengecatan Warthin-Starry dengan sampel berupa biopsi lambung yang telah dibentuk menjadi blok paraffin. Hasil dari penelitian ini adalah nilai +1 untuk pengecatan Haematoxylin & Eosin (H&E), nilai +2 untuk pengecatan Toluidine Blue, dan nilai +3 untuk pengecatan Warthin-Starry. Dapat disimpulkan bahwa Warthin-Starry memberikan hasil yang paling baik dibandingkan pengecatan yang lain namun memiliki kekurangan karena harganya yang relatif mahal dan pengerjaan yang rumit.

Kata kunci: *Helicobacter pylori*, Haematoxylin & Eosin (H&E), Toluidine Blue, Warthin-Starry.

*Correspondence: Arthur Pohan Kawilarang. Departemen Mikrobiologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. arthurkawilarang@gmail.com.

Diterima redaksi: 02 Oktober 2023 | Selesai revisi: 23 Oktober 2023 | Diterbitkan online: 13 November 2023

1. Pendahuluan

Helicobacter pylori adalah bakteri gram negatif berbentuk spiral yang dapat menyebabkan gastritis kronis dan dapat mengarah ke penyakit serius, seperti penyakit tukak lambung, karsinoma lambung, dan limfoma.^{1,2,3} *Helicobacter pylori* menginfeksi mukosa lambung sekitar setengah populasi manusia di dunia, dengan 80% dari individu yang terinfeksi tidak mengalami gejala namun mengalami penyakit maag

yang tidak terprediksi.^{1,2} Mayoritas anak yang terinfeksi oleh *H. pylori* tidak menunjukkan gejala.⁴ Apabila pasien yang terinfeksi bergejala, gejalanya bisa berupa gejala gastritis dan tukak lambung seperti sakit perut, mual, muntah, atau *dyspepsia*, gejala lain yang umum adalah sendawa yang berlebihan, kembung, turunnya berat badan, dan *heartburn*.^{5,6} Penularan *Helicobacter pylori* melalui jalur *iatrogenic*, oral-oral, fecal-oral, gastric-oral, ataupun secara



Lisensi

Lisensi Internasional Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0.

seksual, dengan transmisi fecal-oral dan oral-oral menjadi jalur penularan utama bakteri.^{3,7,8,9} Air minum dan makanan yang terkontaminasi oleh *H. pylori* menjadi penyebab penularan, infeksi ini bisa terjadi akibat sanitasi yang buruk, nutrisi yang tidak cukup, dan perbedaan geografis.^{10,11}

Faktor virulensi *Helicobacter pylori* dalam menginfeksi tubuh *host* ada bermacam-macam yaitu enzim urease, flagella, Cag A, dan Vac A. Enzim urease berperan penting dalam menetralkan HCL pada lambung yang bersifat asam dengan cara menghidrolisis urea menjadi CO₂ dan NH₃, ammonia yang bersifat basa akan menetralkan pH lambung yang asam sehingga membuat bakteri *H. pylori* dapat bertahan hidup.^{12,13} *Helicobacter pylori* mempunyai *unipolar flagella* yang akan membantu bakteri bergerak menembus lapisan pelindung *mucus* dan akan menuju ke sel epitelial lambung, *H. pylori* melakukan ini untuk menghindari dari lingkungan lambung yang asam ke area dengan kondisi yang sesuai.^{1,14,15,16} *Helicobacter pylori* memproduksi adhesin yang akan berinteraksi dengan reseptor sel epitel dan akan menempel, inflamasi akan terjadi apabila terdapat infeksi yang berkepanjangan.^{1,14,17} Produksi urease dan motilitas adalah cara bertahan hidup yang penting bagi *H. pylori*.¹⁴ *Helicobacter pylori* memproduksi beberapa *toxin* namun Cag A (*Cytotoxin-associated gene A*) dan Vac A (*Vacuolating cytotoxin A*) adalah *toxin* yang berperan penting dalam merusak jaringan *host*.¹

Ada dua macam cara untuk mendiagnosis infeksi *H. pylori*, yaitu dengan pemeriksaan invasif dan non-invasif. Pemeriksaan non-invasif seperti pemeriksaan antigen, pemeriksaan antibodi, dan *Urea Breath Test* (UBT), pemeriksaan antigen dan UBT memiliki sensitivitas dan spesifitas yang sama dengan pemeriksaan invasif.^{1,18} Pemeriksaan Invasif untuk mendiagnosis infeksi *H. pylori* yaitu dengan

melakukan biopsi jaringan, jaringan yang didapatkan kemudian dilakukan pemeriksaan seperti kultur, histopathologi, ELISA, *Rapid Urease Tests* (RUT), *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH).¹ Kultur *Helicobacter pylori* memiliki spesifitas sebesar 100% tapi memiliki sensitivitas yang rendah (<80%) karena sangat bergantung pada media transport dan media kultur khusus.² Pemeriksaan histologi adalah pemeriksaan awal untuk mendiagnosis *H. pylori* dengan cara mengamati reaksi inflamasi dan keberadaan bakteri pada jaringan, peradangan mikroskopis lambung selalu terlihat pada infeksi *H. pylori*.^{1,19} Pewarnaan histologi yang sering digunakan untuk mendeteksi *H. pylori* adalah Haematoxylin & Eosin (H&E), Giemsa, Toluidine Blue, dan Immunohistokimia.^{1,20,21} Pewarnaan H&E memiliki sensitivitas dan spesifitas rendah untuk mengamati bakteri, oleh karena itu diperlukan pengecatan lain apabila bentukan bakteri tidak terlihat, pewarnaan khusus seperti *modified* Giemsa, pewarnaan Warthin-Starry, pewarnaan Genta, dan pewarnaan IHC menaikkan spesifitas sampai 100%.^{1,22} *Helicobacter pylori* dikaitkan dengan berbagai penyakit lambung seperti gastroenteritis, tukak gastroduodenal, dan karsinoma lambung apabila tidak ditangani dengan benar.²³ Oleh karena itu, diperlukan pemeriksaan yang efektif dan efisien untuk mendiagnosis dan mengobati penyebabnya agar tidak memperparah penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antara hasil pengecatan H&E, pengecatan Toluidine Blue, dan pengecatan Warthin-Starry dengan sampel berupa biopsi lambung untuk menentukan pemeriksaan utama diagnosis *Helicobacter pylori*.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan antara pewarnaan Haematoxylin & Eosin (H&E), pewarnaan Toluidine Blue, dan pewarnaan Warthin-Starry pada

bakteri *Helicobacter pylori*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Medis Sudarma Surabaya yang berspesialisasi di bidang mikrobiologi klinik. Sampel penelitian berupa biopsi lambung pada pasien yang mengalami gastritis. Jaringan hasil biopsi diawetkan dengan formalin lalu dilakukan *processing* dan *embedding* sehingga diperoleh blok paraffin. Blok paraffin yang ada kemudian dipotong dengan mikrotom dengan ukuran 3 - 5 μ kemudian dilekatkan pada *slide* yang sudah dilapisi oleh larutan 3-aminopropyltriethoxy-silane (AES). *Slide* kemudian dideparafinisasi lalu dicat dengan pewarnaan H&E, pewarnaan Toluidine Blue, dan pewarnaan Warthin-Starry setelah itu *slide* diamati menggunakan mikroskop dengan minyak imersi pada perbesaran 1000x.

Pada prosedur pewarnaan Haematoxylin & Eosin (H&E) setelah *slide* dilakukan deparafinisasi dan dimasukkan ke dalam air, preparat ditetesi dengan Gill's haematoxylin selama 5 menit dan dibilas dengan aquades, inti sel dibirukan dengan cara *slide* dicelupkan ke *ammonia water* kemudian dibilas dengan aquades serta alkohol 70%, selanjutnya *slide* diberi *counterstain* menggunakan alkoholik eosin selama 4 menit. Setelah selesai, preparat didehidrasi secara cepat dengan dua kali pergantian alkohol 95% dan xylene, yang mana sebelum preparat dimasukkan ke xylene harus dikeringkan terlebih dahulu dengan cara diblot dengan kertas saring dan diangin-anginkan. *Slide* kemudian ditutup dengan *cover glass* yang sudah diberi entellan.

Prosedur pewarnaan Toluidine Blue dilakukan dengan cara memberikan larutan Toluidine Blue pada *slide* yang telah diberi kertas saring dan didiamkan selama 20 menit, pemberian kertas saring ini berguna untuk menyaring endapan cat. Larutan Toluidine Blue didapatkan dengan cara mencampurkan 1% Toluidine Blue dan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH

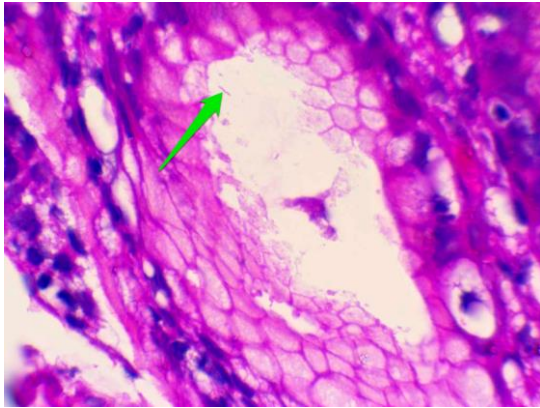
6,8 dengan perbandingan 1:50. Setelah didiamkan, *slide* dibilas dengan aquades dan didehidrasikan menggunakan alkohol dan xylene masing – masing dua kali penggantian, setelah itu preparat ditutup oleh *cover glass* yang sudah diberi entellan.

Prosedur selanjutnya adalah prosedur pewarnaan Warthin-Starry, prosedur ini membutuhkan dua *waterbath* dan silver yang lumayan banyak. Sebelum pengecatan dimulai, *beaker glass* yang berisi *water for irrigation* dimasukkan ke dalam *waterbath* pertama dengan suhu 60°C. Langkah pertama pengecatan adalah deparafinisasi *slide*, kemudian *slide* dimasukkan ke dalam larutan *silver solution* 1% selama 1 jam di *waterbath*, *silver solution* harus dipanaskan terlebih dahulu di *waterbath* pada suhu 60°C. Setelah selesai, *slide* ditiriskan dan dimasukkan ke dalam *coplin jar* yang berisi larutan *developer* yang baru dibuat dan dimasukkan ke dalam *waterbath* kedua pada suhu 55°C sampai jaringan berwarna coklat keemasan, hal ini biasanya membutuhkan waktu sekitar 20 – 60 detik. Setelah itu *slide* dicuci dengan *water one* yang sudah dipanaskan tadi, *slide* dibilas menggunakan *water one* dan dimasukkan ke dalam *coplin jar* yang berisi larutan acetate buffer pH 3,6 selama 5 menit. *Slide* dibilas dengan aquades dan diberikan larutan sodium thiosulphate 5% lalu didiamkan selama 3 menit. *Slide* dibilas lagi dan diblot serta dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam xylene dalam dua kali pergantian masing – masing selama 5 menit dan ditutup dengan *cover glass*.

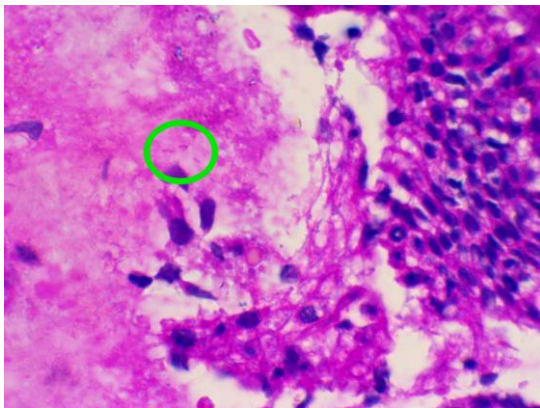
3. Hasil dan Pembahasan

Hasil yang didapatkan selama penelitian adalah sebagai berikut:

Pewarnaan Haematoxylin & Eosin (H&E)

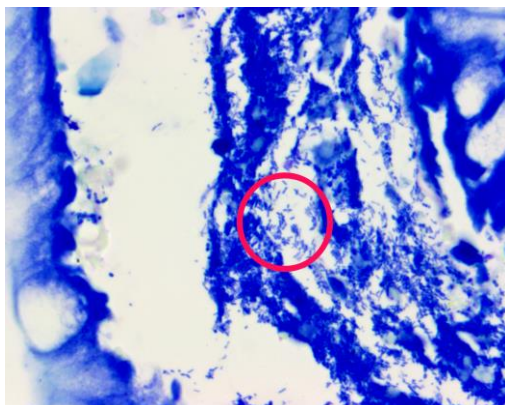


Gambar 1. *Helicobacter pylori* dengan pewarnaan H&E pada perbesaran 1000x (panah hijau)

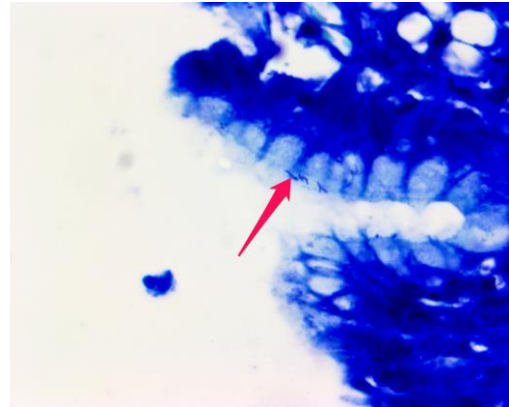


Gambar 2. *Helicobacter pylori* dengan pewarnaan H&E pada perbesaran 1000x (lingkaran hijau)

Pewarnaan Toluidine Blue

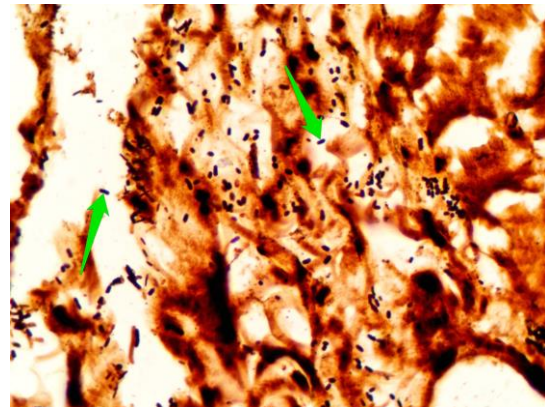


Gambar 3. *Helicobacter pylori* dengan pewarnaan Toluidine Blue pada perbesaran 1000x (lingkaran merah)

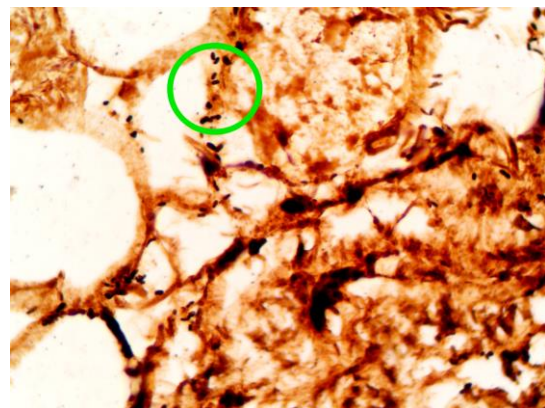


Gambar 4. *Helicobacter pylori* dengan pewarnaan Toluidine Blue pada perbesaran 1000x (panah merah)

Pewarnaan Warthin-Starry



Gambar 5. *Helicobacter pylori* dengan pewarnaan Warthin-Starry pada perbesaran 1000x (panah hijau)



Gambar 6. *Helicobacter pylori* dengan pewarnaan Warthin-Starry pada perbesaran 1000x (lingkaran hijau)

Tabel 1. Tabel Hasil Penelitian

Nama Pengecatan	<i>Helicobacter pylori</i>
Haematoxylin & Eosin (H&E)	+
Toluidine Blue	++
Warthin-Starry	+++

Pewarnaan Haematoxylin & Eosin (H&E) pada umumnya digunakan untuk melihat morfologi dan reaksi jaringan, pewarnaan H&E bisa juga digunakan untuk mendeteksi inflamasi dan mengamati ada tidaknya bakteri *H. pylori* pada jaringan namun memiliki sensitivitas dan spesifitas yang rendah.^{1,24} Hal ini bisa dilihat pada gambar 1 dan 2 yang memperlihatkan penampakan bakteri *H. pylori* pada spesimen lambung, warna bakteri dan latar belakang hampir mirip dan sulit dibedakan sehingga membutuhkan kemampuan khusus dan jam terbang yang tinggi agar tidak terjadi kesalahan dalam pembacaan. Apabila hasil dengan pewarnaan H&E negatif dan untuk menghindari hasil negatif palsu, hal ini diperlukan pewarnaan lain seperti Giemsa, Warthin-Starry, Genta, dan Acridine Orange.^{1,25} Sampel biopsi lambung yang tidak ditemukan penampakan bakteri harus dilakukan pewarnaan khusus seperti Warthin-Starry untuk menghindari kesalahan pembacaan pada pengecatan rutin.³⁰ Pewarnaan khusus seperti pewarnaan *modified* Giemsa, pewarnaan Warthin-Starry, pewarnaan Genta, dan pewarnaan Immunohistokimia (IHC) telah terbukti meningkatkan spesifisitas hingga 100%.²²

Pewarnaan Toluidine Blue adalah pewarnaan *metachromatic* yang dapat digunakan untuk membedakan antara bakteri *H. pylori* dengan mucus dan sel epitel, dimana bakteri *H. pylori* akan berwarna biru tua sedangkan *background* akan berwarna biru yang bervariasi.²⁷ Pewarnaan Toluidine Blue memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih besar dibandingkan dengan pewarnaan Giemsa, pewarnaan

Toluidine Blue juga lebih murah dan lebih ilustratif dibandingkan dengan pewarnaan Giemsa.^{28,29} Pada gambar 3 dan 4 adalah gambar spesimen yang diwarnai oleh pewarnaan Toluidine Blue, bakteri *H. pylori* tampak lebih jelas dan lebih banyak terlihat dibandingkan dengan pewarnaan H&E.

Pewarnaan Warthin-Starry memiliki keuntungan dibandingkan pewarnaan lain karena memberikan warna yang lebih kontras antara bakteri dengan *background* jaringan, bakteri akan berwarna hitam sedangkan latar belakang akan berwarna kuning, kontras ini membuat bakteri lebih mudah terlihat dan meningkatkan sensitivitas pembacaan.^{22,31} Warthin-Starry juga membuat bakteri lebih jelas terlihat dikarenakan pewarna silver akan melapisi bakteri dan membuat bakteri tampak lebih besar.²⁶ Pada gambar 5 dan 6 adalah gambar *H. pylori* yang diwarnai oleh pewarnaan silver Warthin-Starry, kontras antara bakteri dan latar belakang terlihat jelas dan bakteri tampak lebih besar. Pewarnaan Warthin-Starry memiliki kekurangan karena membutuhkan biaya yang besar dan pengerjaan yang lebih rumit dibandingkan dengan pewarnaan Toluidine Blue dan H&E.

Tabel 1 berisi data penelitian berupa penilaian berdasarkan kejelasan penampakan bakteri *H. pylori* pada berbagai pewarnaan. Nilai +1 diberikan kepada pewarnaan H&E karena ditemukan sedikit bakteri dengan penampakan bakteri kurang jelas pada spesimen, nilai +2 jika diberikan kepada pewarnaan Toluidine Blue karena ditemukan bakteri dalam jumlah sedang dengan penampakan bakteri jelas, dan nilai +3 diberikan kepada pewarnaan Warthin-Starry karena ditemukan banyak bakteri dengan penampakan bakteri sangat jelas pada spesimen.

4. Kesimpulan

Setelah semua pengecatan dilakukan dan hasil pengecatan diamati, dapat diambil kesimpulan bahwa

pengecatan Warthin-Starry memberikan hasil yang paling baik untuk mewarnai *Helicobacter pylori*, kemudian disusul oleh pewarnaan Toluidine Blue dan Haematoxylin & Eosin (H&E). Hal ini bisa mendasari dijadikannya pemeriksaan Warthin-Starry sebagai pewarnaan utama untuk diagnosis *Helicobacter pylori*. Apabila dirasa pewarnaan Warthin-Starry terlalu mahal dan rumit bisa digunakan alternatif pemeriksaan lain menggunakan pewarnaan Toluidine Blue dan pewarnaan H&E, namun hal ini dengan catatan untuk pemeriksaan H&E harus dilihat secara seksama agar tidak terjadi kesalahan pembacaan.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Medis Sudarma, Surabaya, Indonesia atas ketersediannya membantu proses penelitian.

Daftar Rujukan

- [1] Parikh, N.S., Ahlawat, R. 2023. *Helicobacter Pylori*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534233/>
- [2] Malferttheiner, Peter., M.C. Camargo., Emad, El-Omar., Jyh-Ming, Liou., Richard, Peek., Christian, Schulz., Stella, I. Smith., Sebastian, Suerbaum. 2023. *Helicobacter pylori infection*. Nature Reviews Disease Primers. (2023) 9:19. doi: <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00431-8>
- [3] Dunn, B.E., H. Cohen., M.J. Blaser. 1997. *Helicobacter pylori*. ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews; 10:4. doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.720>
- [4] Jones, N.L., Koletzko, S., Goodman, K., Bontems, P., Cadranell, S., Casswall, T., Czinn, S., Gold, B.D., Guarner, J., Elitsur, Y., Homan, M., Kalach, N., Kori, M., Madrazo, A., Megraud, F., Papadopolou, A., Rowland, M., ESPGHAN, NASPGHAN. 2017. Joint ESPGHAN/NASPGHAN Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* in Children and Adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017 Jun;64(6):991-1003.
- [5] Ceylan, A., Kirimi, E., Tuncer, O., Türkoğlu, K., Ariyucu, S., Ceylan, N. 2007. Prevalence of *Helicobacter pylori* in children and their family members in a district in Turkey. J Health Popul Nutr. 25(4):422-7.
- [6] Saxena, A., Mukhopadhyar, A.K., Nandi, S.P. 2020. *Helicobacter pylori*: perturbation and restoration of gut microbiome. J Biosci 45(1):1-15.
- [7] Zamani, M., Vahedi, A., Maghdouri, Z., Shokri-Shirvani, J. 2017. Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. Caspian J Intern Med. 8(3):146-152
- [8] Urita, Y., Watanabe, T., Kawagoe, N., Takemoto, I., Tanaka, H., Kijima, S., Kido, H., Maeda, T., Sugawara, Y., Miyazaki, T., Honda, Y., Nakanishi, K., Shimada, N., Nakajima, H., Sugimoto, M., Urita, C. 2013. Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. J Paediatr Child Health. 49:394-398.
- [9] Kayali, S. et al. 2018. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. Acta Biomed. 89, 72-76.
- [10] Stefano, K., Marco, M., Federica, G., Laura, B., Barbara, B., Gioacchino, L., Gian, L.d.A. 2018. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: State of the art. Acta Bio Med. Atenei Parm. 89, 72.
- [11] Saxena, A., Mukhopadhyay, A.K., Nandi, S.P. 2020. *Helicobacter pylori*: Perturbation and restoration of gut microbiome. J. Biosci. 45, 1-15.
- [12] Mobley, H.L., M.J. Cortesia., L.E. Rosenthal., B.D. Jones. 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 26, 831-836.
- [13] Sidebotham, R.L., Worku, M.L., Karim Q.N., Dhir, N.K., Baron, J.H. 2003. How *Helicobacter pylori* urease may affect external pH and influence growth and motility in the mucus environment. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 15:395-401. doi: 10.1097/00042737-200304000-00010.
- [14] Jonathan, P. Celli., Bradley, S. Turner., Neza, H. Afdhal., Sarah, Keates., Ionita, Ghiran., Ciaran, P. Kelly., Randy, H. Ewoldt., Gareth, H. McKinley., Peter, So., Shyamsunder, Erramilli., and Rama, Bansil. 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106 (34) 14321-14326. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0903438106>.
- [15] Suerbaum, S. 1995. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. Trends Microbiol. 3:168-170. doi: 10.1016/S0966-842X(00)88913-1.
- [16] Reshetnyak, V.I., Burnistrov, A.I., Maev, I.V. 2021. *Helicobacter pylori*: commensals, symbiont or pathogens?. World J Gastroenterol 27(7):545.
- [17] Kao, C.Y., Sheu, B.S., Wu, J.J. 2016. *Helicobacter pylori* infection: an overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomedical Journal. 39(1):14-23.
- [18] Fischbach, W., Malferttheiner, P. 2018. *Helicobacter Pylori* Infection. Dtsch Arztebl Int. 115(25):429-436.
- [19] Jones, N.L., Koletzko, S., Goodman, K., Bontems, P., Cadranell, S., Casswall, T., Czinn, S., Gold, B.D., Guarner, J., Elitsur, Y., Homan, M., Kalach, N., Kori, M., Madrazo, A., Megraud, F., Papadopolou, A., Rowland, M., ESPGHAN, NASPGHAN. 2017. Joint ESPGHAN/NASPGHAN Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* in Children and Adolescents (Update 2016). J Pediatr Gastroenterol Nutr. 64(6):991-1003.
- [20] de Brito, B.B., da Silva, F.A.F., Soares, A.S., Pereira, V.A., Santos, M.L.C., Sampaio, M.M., Neves, P.H.M., de Melo, F.F. 2019. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. World J Gastroenterol. 7;25(37):5578-5589. doi: 10.3748/wjg.v25.i37.5578.
- [21] Smith, S.B., Snow, A.N., Perry, R.L., Qasem, S.A. 2012. *Helicobacter pylori*: to stain or not to stain? Am J Clin Pathol. 137(5):733-8.
- [22] Lee, J.Y., Kim, N. 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. Ann Transl Med. 3(1):10.
- [23] Cardoso, A.I., Maghiar, A., Zaha, D.C., Pop, O., Fritea, L., Miere, F., Cavalu, S. 2022. Evolution of Diagnostic Methods for *Helicobacter pylori* Infections: From Traditional Tests to High Technology, Advanced Sensitivity and Discrimination Tools. Diagnostics 2022, 12, 508.
- [24] Molyneux, A.J., Harris, M.D. 2005. *Helicobacter pylori* in gastric biopsies--should you trust the pathology report? J R Coll Physicians Lond. 27:119-2025.
- [25] Garza-González, E., Bosques-Padilla, F.J., El-Omar, E., et al. 2005. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. International Journal of Cancer. 2:237-241.
- [26] Farouk, W.I., Hassan, N.H., Ismail, T.R., Daud, I.S., Mohammed, F. 2018. Warthin-Starry staining for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. Malays J Med Sci. 25(4):92-99.
- [27] Sridharan, G., Shankar, A.A. 2012. Toluidine blue: a review of its chemistry and clinical utility. J Oral Maxillofac Pathol. 16(2):251-5.
- [28] Piyumali, Sandareka. Arachchi., Manjula, Manoj. Weerasekera., Bimalka, Seneviratne., Deepaka, Weerasekera., Neluka, Fernando., and Chinthika, Prabhashinie. Gunasekara. 2018. Imprint cytology: a useful screening test for diagnosis of

- Helicobacter pylori* in resource poor settings. BMC Res Notes 11:481. doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3592-2>.
- [29] Tajalli, R., Nobakht, M., Mohammadi-Barzelighi, H., Agah, S., Rastegar-Lari, A., Sadeghipour, A. 2013. The immunohistochemistry and toluidine blue roles for *Helicobacter pylori* detection in patients with gastritis. Iran Biomed J. 17(1):36–41.
- [30] Hartman, D.J., Owens, S.R. 2012. Are routine ancillary stains required to diagnose *Helicobacter* infection in gastric biopsy specimens? an institutional quality assurance review. Am J Clin Pathol. 137(2):255–260. doi: <https://doi.org/10.1309/AJCPD8FFBJ5LSLTE>.
- [31] Genta, R.M., and Lash, R.H. 2010. *Helicobacter pylori*-negative Gastritis: Seek, Yet Ye Shall Not Always Find. Am J Surg Pathol. 34(8) : e25-e34.