

Artículo original

Comparación cualitativa de diferentes medios de cultivo y condiciones de siembra para el aislamiento primario de *Helicobacter pylori* a partir de biopsia gástrica obtenidas de pacientes dispépticos.

Ingrid Johanna Bedoya, ingridjohanab@hotmail.com Álvarez Adalucy², Moncayo José Ignacio, Guaca Yina Marcela, Santacruz Jorge Javier.

¹ Facultad Ciencias de la Salud- Grupo de Investigación en enfermedades Infecciosas – GRIENI- Universidad Tecnológica de Pereira

² Facultad Ciencias de la Salud. Grupo de investigación en Microbiología y Biotecnología MICROBIOTEC. Universidad Libre Seccional Pereira.

Fecha de envío: 10/10/2016

Fecha de correcciones 08/11/2016/

Fecha de aceptación 02/01/2017

Fecha de publicación 31/08/2017

Fecha de publicación enero 31 de 2017

Resumen

El cultivo de *Helicobacter pylori* es indispensable para estudiar la sensibilidad de las cepas a distintos agentes antimicrobianos, realizar pruebas diagnósticas y evaluar su toxicidad y virulencia, además, preservar los aislamientos con fines investigativos futuros. Bajo condiciones óptimas, el cultivo posee una sensibilidad cercana al 90% y una especificidad de 100%, pero las tasas de aislamiento de los individuos infectados pueden variar entre 23,5% a 97%, dependiendo de un número de factores como los componentes del medio de cultivo, el transporte de las biopsias, automedicación con inhibidores de bomba de protones/antibióticos y los métodos de toma de la biopsia. Por esta razón, el objetivo del estudio de la investigación fue comparar diferentes medios de cultivo y las condiciones de transporte, manejo y procesamiento de las biopsias para el aislamiento de *Helicobacter pylori*.

Se analizaron 27 biopsias gástricas de antro y cuerpo del estómago obtenidas de pacientes dispépticos; fueron sembradas por duplicado en tres medios de cultivo diferentes designados como A, B y C y bajo dos condiciones de siembra de la biopsia por Impresión (Touch) y por maceración, el transporte de las biopsias se realizó en medio de transporte con y sin suplementos y antibióticos.

Los resultados de la tasa de recuperación en el medio de cultivo A fue 59,2%, en el B fue 37% y en el C fue de 18,5%. Tanto el medio A como en el B se evidenció un crecimiento vigoroso de *H. pylori*, caso contrario en el medio de cultivo C, en donde las colonias no se observaron tan brillantes y evidentes. La siembra por maceración en laboratorio y el medio de cultivo A proporcionaron las mejores condiciones para la recuperación de *H. pylori*.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, medio de cultivo, biopsia, gastritis, estómago, dispepsia.

Copyright © Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira. 1995-2017. Todos los derechos reservados *

Qualitative comparison between different cultures media and conditions for primary isolation of *Helicobacter pylori* obtain of gastric biopsies of dyspeptic patients

Helicobacter pylori cultivation is essential to study the sensitivity of isolates to various antimicrobial agents, diagnostic testing and evaluating toxicity and virulence also preserve isolates with future research purposes. Under optimum conditions, cultivation has a sensitivity approaching 90% and a specificity of 100%, but the rates of isolation of infected individuals may vary between 23.5% to 97%, depending on a number of factors such as components culture medium, transporting biopsies, self-medication with proton-pump inhibitor / antibiotics and methods of making the biopsy. For this reason, the aim of the research study was to compare different culture media and conditions of transport, handling and processing of biopsies for the isolation of *Helicobacter pylori*.

27 antrum's gastric biopsies and body's gastric biopsies obtained from dyspeptic patients were analyzed; were seeded for duplicate on three different culture's mediums designated as A, B and C and under two culture's conditions. The biopsies were seeded for Printing (Touch) in the endoscopy unit and maceration in the microbiology's laboratory. The biopsies were transported in transport medium with and without supplements and antibiotics.

The results of the recovery rate in the culture medium A was 59.2%, in the B was 37% and in the C was 18.5%. In the culture medium A and B were observed a vigorous growth of *H. pylori*, otherwise in the culture medium C, the colonies were not observed as bright. Seeding by maceration in laboratory culture medium and A provided the best conditions for recovery of *H. pylori*.

Keys Words: *Helicobacter pylori*, culture medium, biopsy, gastritis, stomach, dyspepsia.

Copyright © Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira. 1995-2017. All rights reserved *.

Introducción

Helicobacter pylori coloniza aproximadamente la mitad de la población mundial [1-3] con una prevalencia entre el 80 y 90% de la población de países en vía de desarrollo [4] y entre 30-50% en los desarrollados (30-50%), además, posee un gran potencial de expansión/transmisión dado que sus vías de transmisión son oral-oral, fecal oral o por agua contaminada [5, 6]. La infección crónica desempeña un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades gastroduodenales, incluyendo úlcera gástrica, úlcera duodenal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y carcinoma gástrico [7-9], además ha estado relacionada con entidades hematológicas como anemia por deficiencia de vitamina B12, púrpura trombocitopénica inmune y anemia por deficiencia de hierro [10]. El diagnóstico se puede realizar de manera indirecta determinando la actividad de sus enzimas con técnicas como test respiratorio, prueba rápida de ureasa o mediante serología detectando anticuerpos específicos anti *H. pylori* (IgG) o con anticuerpos contra antígenos bacterianos expulsados en las heces [11]; sin embargo, la detección de manera directa por aislamiento de la bacteria es fundamental para el diagnóstico definitivo de la infección, para ello se utilizan métodos invasivos donde se obtiene las biopsias gástricas para realizar estudios histopatológicos y para el cultivo [12], siendo el cultivo, indispensable para el desarrollo de investigaciones epidemiológicas y para establecer la susceptibilidad antimicrobiana, fabricación de vacunas, estudiar nuevos blancos bioquímicos para inhibición con antibióticos. Debido al gran potencial de diseminación y la alta prevalencia de *H. pylori* en la población mundial, la infección por esta bacteria se ha convertido en un serio problema de salud pública, sin embargo, es curable con terapia antimicrobiana [5, 6]. Para su tratamiento se han utilizado diferentes antimicrobianos, principalmente, metronidazol, amoxicilina, tetraciclina y claritromicina [10], combinados con un inhibidor de bomba de protones (IBP- omeprazol, lansoprazol y pantoprazol) para aumentar la absorción del antibiótico en el estómago del huésped [13, 14]. Las tasas de resistencia parecen ir aumentando en muchos países, por lo que se hace indispensable un estudio y control periódico

en cada área geográfica; diversos estudios han demostrado que la resistencia antimicrobiana perjudica significativamente la eficacia de la terapia anti *H. pylori*, así, cuando un paciente es colonizado con una cepa resistente a metronidazol, la tasa de erradicación se disminuye hasta el 50% en la triple terapia estándar (TTE) con sales de bismuto [15, 16]; y cuando se presenta resistencia a claritromicina, la eficacia de la terapia puede disminuir hasta el 70% [15, 17]. Para evaluar la resistencia antimicrobiana es indispensable cultivar la bacteria, sin embargo, existen serias dificultades en el cultivo de *H. pylori* a partir de especímenes clínicos, como biopsia gástrica [18].

El cultivo de *H. pylori* es lento y fastidioso. El éxito de lograr el cultivo de la bacteria depende de múltiples factores que en muchas ocasiones son difíciles de solucionar o controlar. La manipulación, el procesamiento, la composición del medio de cultivo, condiciones de microaerofilia, el transporte del espécimen clínico, experiencia del personal que cultiva la bacteria son factores muy importantes para lograr el aislamiento de *H. pylori*. La sensibilidad del cultivo es variable y 100% de especificidad [19], la gran ventaja del aislamiento de la bacteria es que permite realizar estudios fenotípicos y genómicos, virulencia, susceptibilidad antimicrobiana, desarrollo de vacunas, epidemiología molecular, evaluación de interacciones bacteria/célula huésped y determinación de los requisitos de crecimiento y metabolismo [18, 20].

El cultivo a partir de especímenes clínicos como biopsia gástrica presenta serias dificultades [18], las tasas de aislamiento oscilan entre 23,5% y 97% dependiendo de factores como los componentes del medio de cultivo, el transporte de las biopsias, los métodos de toma de la biopsia, la automedicación de los pacientes con inhibidores de bomba de protones/antibióticos [12]. Para la obtención de cultivos primarios, se hace indispensable la adición de antibióticos que inhiban el crecimiento de otras bacterias presentes en el tracto digestivo que se adquieren durante el proceso endoscópico de toma de la biopsia; algunos antibióticos usados se incluyen la vancomicina, trimetoprima sulfá, polimixina y anfotericina B [21, 22] para minimizar la microbiota acompañante y disminuir la competencia por nutrientes para favorecer el crecimiento de *H. pylori*.

Debido a la tendencia global del aumento de las tasas de resistencia, existe un fuerte argumento para realizar los cultivos a nivel clínico y probar la susceptibilidad a los antimicrobianos después

de una falla terapéutica en el tratamiento primario y aún después de la segunda falla terapéutica [23], algunos autores podrían sugerir que debería ser realizado en el diagnóstico inicial en áreas de alta prevalencia de resistencia [19]. La importancia como patógeno de este microorganismo a nivel mundial, obliga a considerar y a proponer alternativas efectivas para aumentar las tasas de aislamiento e identificación de la bacteria en los laboratorios de microbiología. En Colombia existen pocos informes de laboratorios experimentados en las habilidades microbiológicas necesarias para su aislamiento y cultivo [24] y ha evidenciado a través de tiempo como la sensibilidad del medio de cultivo ha ido en descenso, en el Eje Cafetero nuestra área de investigación hemos observado que de tasas de aislamiento de 90% hemos descendido a tasas alrededor de 50%, preocupante para nuestros estudios donde necesitamos los aislamientos de *H. pylori* para estudiar la susceptibilidad antimicrobiana y a nivel molecular [19, 25, 26].

Por lo mencionado anteriormente, el Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas –GRIENI– de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira, realizó un estudio comparativo de diferentes medios de cultivo, condiciones de procesamiento y transporte de los especímenes clínicos para mejorar las tasas de aislamiento de *H. pylori*.

Materiales y métodos

Muestra poblacional: 27 biopsias gástricas obtenidas de pacientes sometidos a endoscopia gastroduodenal en unidades de endoscopia del Eje Cafetero y que aceptaron participar en el estudio firmando el consentimiento informado.

Criterios de inclusión: Pacientes mayores de edad, con síntomas dispépticos en donde el gastroenterólogo consideró recomendable toma de biopsia para cultivo y que no hubieran ingerido antibióticos seis semanas antes de la endoscopia, o inhibidores de la bomba de protones o bismuto, 15 días previos a la endoscopia.

Toma de muestra: De cada paciente sometido a endoscopia y que aceptó voluntariamente participar en el estudio, se tomó una biopsia de antro y otra de cuerpo gástrico. Las muestras fueron tomadas por gastroenterólogos.

Tabla 1. Características de los medios de cultivo usados para obtener aislamientos primario de *H. pylori*.

Medio de cultivo	Composición
A	Agar Tripticasa de Soya (BBL), suplementado con sangre de cordero al 7%, Isovitalex (BBL) al 0,5%, y los antibióticos vancomicina (10 mg/L), polimixina B (0,33 mg/L), bacitracina (1,07 mg/L) y anfotericina B (5 mg/L).
B	Agar Columbia (Merck), suplementado con sangre de cordero lisada al 10%, extracto de levadura al 0,25%, suero fetal bovino (Gibco) al 5% y los antibióticos vancomicina (10 mg/L), anfotericina B (1,07 mg/L) y trimetoprim (5 mg/L).
C	Agar Columbia (Merck), suplementado con sangre de cordero al 7%, Isovitalex (BBL) al 0,5% y el suplemento comercial DENT que contienen vancomicina, anfotericina B, cefsulodina de sodio y lactato de trimetoprim.

Siembra y transporte de la muestra: Las biopsias de antro y cuerpo de 27 pacientes fueron sembradas por impresión en los centros de endoscopia y en tres medios de cultivo diferentes denominados como medio A, B y C. Las características de los medios de cultivo utilizados se describen en la Tabla 1. Las biopsias fueron sembradas por impresión en los tres medios de cultivo en la misma sala de endoscopia y el ambiente microaerófilo se proporcionó con el sistema Campy-Pouch (BD GasPak EZ Pouch Systems). Posteriormente, a la siembra por impresión, las biopsias fueron almacenadas en caldo BHI (Merck) con glicerol al 20%, Isovitalex (BBL) al 0,5% y los antibióticos vancomicina (10 mg/L), polimixina B (0,33 mg/L), bacitracina (1,07 mg/L) y anfotericina B (5 mg/L) y transportadas en forma refrigerada desde los centros de endoscopia al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira. Tabla 1.

En el laboratorio de microbiología, las biopsias fueron sembradas en los tres medios de cultivo por maceración. Las biopsias fueron retiradas del medio de transporte, mezcladas individualmente con solución salina estéril y maceradas con un homogeneizador manual (Deltaware Pellet Pestle); el tejido restante de la maceración fue almacenada a -80°C en caldo de transporte.

Se sembraron 100 microlitros de cada solución del macerado en la superficie de los medios de cultivo y se incubaron bajo condiciones microaerofílicas de 5% O_2 ,

10% CO_2 y 85 N_2 a 37°C hasta 10 días (Water Jacketed Incubator, NUAIRE).

Los cultivos fueron revisados periódicamente cada tres días y hasta el décimo día antes de considerarlo negativo.

Se comparó el grado de contaminación del cultivo primario con o sin suplemento/antibióticos en el medio de transporte.

Identificación de *Helicobacter pylori*: Las colonias obtenidas del cultivo primario se identificaron por coloración de Gram, bacilos Gram-negativos en forma de espiral, y por las pruebas bioquímicas de catalasa (BactidentKatalase, Merck) y ureasa (solución de urea al 10%).

Análisis de datos: se realizó un análisis comparativo entre las condiciones de cultivos para la elección de las más adecuadas y un análisis estadístico descriptivo para comparar las tasas de recuperación bacteriana en los diferentes medios de cultivo.

En la Tabla 1 se observan las características de los medios de cultivo usados para obtener aislamientos primario de *H. pylori*

Resultados

El mejor método de siembra fue el de maceración de la biopsia en el laboratorio porque se observó un crecimiento más uniforme y denso, a diferencia del cultivo por impresión en la unidad de endoscopia que fue más escaso (Figura 1 y 2). No se evidenciaron ventajas con la siembra en la sala de endoscopia, ni incidencia del transporte de la biopsia sobre el crecimiento bacteriano, ya que los resultados positivos para el cultivo fueron replicados por ambos métodos de siembra y en ambos lugares. Inicialmente, las biopsias gástricas fueron transportadas en caldo BHI con glicerol sin suplemento/antibióticos, el grado de contaminación fue alto y dificultó el aislamiento de *H. pylori*, la inclusión del suplemento/antibióticos en el medio de transporte mejoró el aislamiento de *H. pylori*.

Los resultados obtenidos para cada uno de los tres medios de cultivo utilizados en el aislamiento de *H. pylori*, mostraron que el medio de cultivo A presentó un porcentaje de recuperación mayor con el 59,2% (16/27), seguido del medio de cultivo B con el 37% (10/27) y por último el medio de cultivo C con el 18,5% (5/27). Tanto en el medio de cultivo A como en el B se observó un crecimiento vigoroso de *H. pylori*, mientras que en el medio de cultivo C se observó un pobre crecimiento de la bacteria.

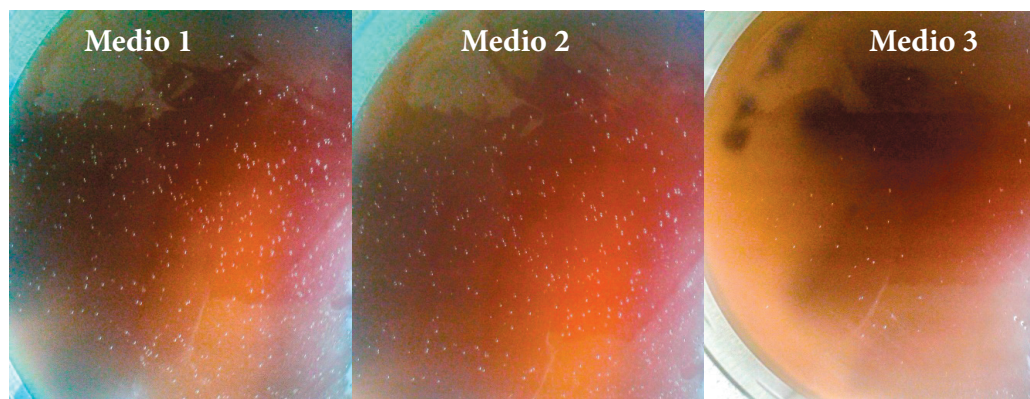


Figura 1: Comparación del crecimiento de *H. pylori* en los medios de cultivo A, B y C, siembra de la biopsia por impresión en la unidad de endoscopia.

En la figura 1 se observa el crecimiento de *H. pylori* en el medio de cultivo A, B y C por el método de siembra de impresión.

En la figura 2 se observa el crecimiento de *H. pylori* en el medio de cultivo A, B y C cuando el método de siembra utilizado fue la maceración después de haber sido transportada al laboratorio de microbiología.

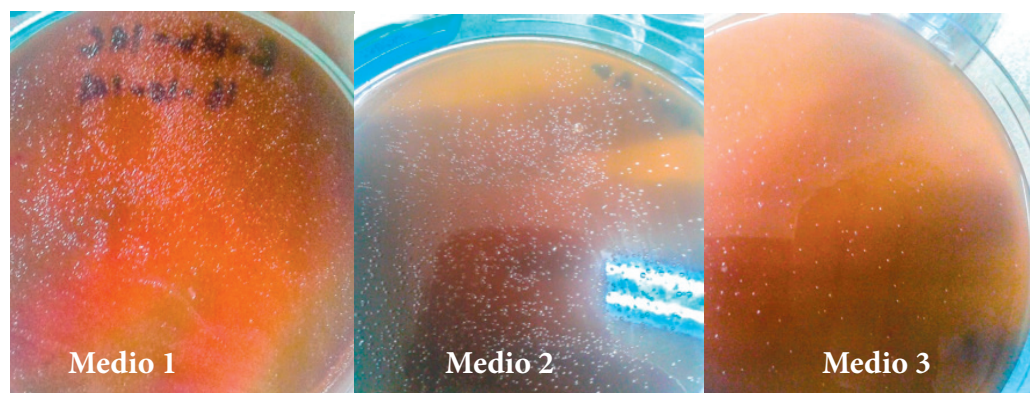


Figura 2: Comparación del crecimiento de *H. pylori* en los medios de cultivo A, B y C, siembra de la biopsia por maceración en el laboratorio de microbiología.

Discusión.

Dado que la recuperación de *H. pylori* en cultivo es difícil, principalmente cuando adquiere su forma cocóide por envejecimiento o en condiciones desfavorables como modificación del pH, tensión de oxígeno, temperatura, exposición a antibióticos, ausencia de nutrientes y teniendo en cuenta que es principalmente el estómago humano quien proporciona las condiciones adecuadas para el establecimiento de la forma bacilar de la bacteria, en el cual una breve exposición a pH bajo, aumenta la expresión de proteínas de choque térmico y mejora la fijación de la bacteria al epitelio gástrico [27] ha sido necesario estudiar condiciones de cultivo que proporcionen un ambiente adecuado para la recuperación de la bacteria en el laboratorio; bajo estas condiciones se han realizado numerosos estudios intentando mejorar las tasas de recuperación de *H. pylori* en las se han sugerido múltiples medios de cultivos, obteniendo distintas tasas de recuperación; además, ha sido recomendado emplear simultáneamente un medio selectivo y otro no, para obtener resultados superiores a los reportados con un solo medio de cultivo [8]. Tersterman et al., describieron el uso de un medio con sustratos definidos, empleado previamente para el cultivo de células de mamíferos (Hams F- 12), lo suplementaron con β -ciclodextrina, colesterol y suero fetal bovino; sin embargo, esto lo hacía muy costoso. Posteriormente, emplearon agar sangre tradicional y realizaron siembras de biopsia y cepas de referencia de *H. pylori*, obteniendo un crecimiento en 100% de los casos [28, 29]. Majalca et al, evaluaron ocho medios (base de agar gelosa-chocolate con 2% de hemoglobina liofilizada, agar campylobacter, casman, columbia, infusión cerebro corazón, brucella, Mueller Hinton y tripticasa de soya), todos suplementados con sangre de caballo o de cordero entre un 7-10% y algunos con adición de antimicrobianos; ellos reportaron que el mejor medio para la recuperación de *H. pylori* fue al agar casman suplementado con sangre de caballo al 7%, y el mejor medio de conservación correspondió al caldo brucella con 2% de suero fetal bovino [30]. McNulty et al., recomendaron el medio Wilkins-Chalgren/brucella como un medio selectivo [31]. Joo et al., establecieron un cultivo líquido de capa fina con caldo brucella, suero equino, extracto de levadura y dimetil- β -ciclodextrina [29, 32]. En el 2011 se estableció que el medio skirrow suplementado con vancomicina, trimetoprima sulfá, polimixina B y anfotericina B y el medio Dent con vancomicina, trimetoprima, cefsulodina y anfotericina B son de gran utilidad para el aislamiento de la bacteria [33].

En este estudio se evaluaron tres medios de cultivo con diferentes propiedades y dos tipos de condiciones de siembra de la biopsia que proporcionaron un entorno adecuado para el aislamiento primario de la bacteria. Sin embargo, la tasa de recuperación de la bacteria no fue satisfactoria a pesar que está dentro del rango reportado por otros investigadores. En esta investigación no se observó impacto marcado de las condiciones de siembra o transporte sobre el crecimiento bacteriano a pesar de lo sugerido por Sidnay en el protocolo de recolección de muestra, donde se especifica que estas deben ser trituradas en solución salina antes de ser inoculadas [29]; sin embargo, la maceración de la biopsia permitió obtener cultivos más homogéneos. Nosotros creemos que la concentración y tipo de antibióticos que suplementa el medio de cultivo incide en la tasa de recuperación. Durante el proceso de estandarización se utilizaron dos medios suplementados de la misma manera (7% sangre de cordero, 0,5% Isovitalax), a uno de ellos (medio C) se le adicionó una mezcla de antibióticos comerciales (DENT) y al otro (medio A) una mezcla determinada por el grupo de investigación, comparando el crecimiento de la bacteria en ambos medios, se evidenció una diferencia marcada de esta, siendo mayor en el medio de cultivo A que el medio C. Sin embargo, a pesar de que se demostró que uno de los medios de cultivo fue mejor en el aislamiento de *H. pylori*, lo cual se demostró no solamente en el cultivo primario sino también en los subcultivos y

en los preservados; la tasa de recuperación en el cultivo primario fue moderada con 59,2%. La experiencia adquirida por el grupo después de más dos décadas de cultivo de *H. pylori* nos ha mostrado que la recuperación en cultivo de *H. pylori* ha ido disminuyendo a través de los años, debido probablemente al uso indiscriminado de inhibidores de la bomba de protones o bismuto, que son prescritos aún para otras enfermedades donde se utilizan antibióticos por vía oral. Por otra parte, se debe considerar que la veracidad de la información suministrada por parte del paciente sobre el uso de inhibidores de bomba de protones (IBP) o antibióticos es indispensable para obtener altas tasas de recuperación de la bacteria, posiblemente los pacientes ingirieron IBP o antibióticos cerca a la fecha de toma de endoscopia [34, 35], lo que conllevó a obtener una tasa de recuperación menor al 60%. Lo anterior nos permite considerar que existen otros factores que inciden en la tasa de recuperación y son difíciles de controlar. Durante la recolección de la muestra, fue necesario suplementar el medio de transporte con Isovitalax y antibióticos, debido a la alta carga bacteriana presente en la muestras de biopsias gástricas, esta medida permitió disminuir la contaminación bacteriana en el cultivo de *H. pylori*. Como resultado de la investigación se puede concluir que las condiciones de cultivo que permitieron mayor recuperación de *H. pylori* desde biopsia gástrica fueron el uso del medio de cultivo agar Tripticasa de Soya, suplementado con sangre de cordero al 7%, Isovitalax al 0,5%, y los antibióticos vancomicina 10 mg/L, polimixina B 0.33 mg/L, bacitracina 1.07 mg/L y anfotericina B, 5 mg/L y la siembra por maceración y la adición de antibióticos al medio del transporte permitió disminuir la contaminación de la biopsia gástrica y aumentar la viabilidad de la bacteria en biopsia, mejorando el aislamiento de *H. pylori*.

En resumen, aunque se logró mejorar las condiciones de transporte de la biopsia para evitar el sobre crecimiento de la microbiota contaminante; la tasa de recuperación de *H. pylori* fue aceptable, lo cual nos permite inferir que hay otros factores no controlables por los investigadores que inciden en la tasa de recuperación de *H. pylori*.

Finalmente, seguiremos investigando cuales son los factores que inciden en la disminución de la tasa de recuperación de *H. pylori* en el Eje Cafetero, después de haber tenido una alta eficiencia en el cultivo.

Agradecimientos

Al grupo CENBIOTEP y al grupo de investigación en enfermedades infecciosas GRIENI – de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Al doctor Luis Javier Castañeda, a su padre y a su equipo de trabajo.

A la doctora Brenda Arturo y a su equipo de trabajo en Manizales.

A Colciencias por financiar a joven investigador

A la Universidad Tecnológica de Pereira por su colaboración y recursos aportados.

Conflicto de interés.

Los autores manifiestan que no existe conflicto de interés. El presente trabajo fue financiado por la Universidad Tecnológica de Pereira como parte del proyecto “caracterización del fenotipo y genotipo de perfiles antimicrobianos en aislamientos de *Helicobacter pylori* obtenidos de pacientes dispépticos del Eje Cafetero”. Código 5-13-2.

Referencias

- Brown, L.M., *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*, 2000. 22(2): p. 283-97.
- Dunn, B.E., H. Cohen, and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, 1997. 10(4): p. 720-41.
- Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, 1991. 325(16): p. 1127-31.
- Suerbaum, S. and P. Michetti, *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 2002. 347.
- Pajares, J.M. and J.P. Gisbert, *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2006. 98: p. 770-785.
- Eusebi, L.H., R.M. Zagari, and F. Bazzoli, Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2014. 1: p. 1-5.
- Cover, T.L. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, 2009. 136(6): p. 1863-73.
- Kusters, J.G., A.H. van Vliet, and E.J. Kuipers, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 2006. 19(3): p. 449-90.
- McColl, K.E., Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 2010. 362(17): p. 1597-604.
- Malfurtherner, P., et al., Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 2012. 61(5): p. 646-664.
- Mohammadi, M., et al., In vivo measurement of *Helicobacter pylori* infection. *Methods Mol Biol*, 2012. 921: p. 239-56.
- Yin, Y., L.H. He, and J.Z. Zhang, Successful isolation of *Helicobacter pylori* after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World J Gastroenterol*, 2009. 15(12): p. 1528-9.
- Rey Arevalo, M., Comparación de las características operativas de la prueba E-test con la prueba de dilución en agar para determinar susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *H. pylori*, in Facultad de ciencias. 2007, Pontificia universidad javeriana: Bogotá.
- Suzuki, H., T. Nishizawa, and T. Hibi, *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol*, 2010. 5(4): p. 639-48.
- Trespacios, A., W. Otero, and M. Mercado, Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol*, 2010. 25(1): p. 31-38.
- Papastergiou, V., S.D. Georgopoulos, and S. Karatapanis, Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Meeting the challenge of antimicrobial resistance. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2014. 20(29): p. 9898-9911.
- Mégraud, F., *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 2004. 53(9): p. 1374-1384.
- Hachem, C.Y., et al., Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, 1995. 48(8): p. 714-6.
- Moncayo, J., et al., Evaluation of different tests for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Investigaciones Andina*, 2011. 13 (23): p. 297-311.
- Perez-Perez, G.I., Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am*, 2000. 29(4): p. 879-84.
- Navarro-Hernández, J., et al., Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *Helicobacter pylori*. *Universitas Scientiarum*, 2007. 12(3): p. 79-86.
- Rizvi, F. and A. Hannan, Evaluation of different transport and enrichment media for the isolation of *Helicobacter pylori*. *JAMC*, 2000. 13(3): p. 31-33.
- Mégraud, F. and P. Lehours, *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*, 2007. 20(2): p. 280-322.
- Bayona-Rojas, M., Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 2013. 28(2): p. 94-99.
- Alvarez-Aldana, A., et al., Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(9): p. 4022-4.
- Moncayo, J., et al., Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Medica*, 2006. 37(3): p. 203-212.
- Mégraud, F. and P. Lehours, *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007. 20(2): p. 280-322.
- Tersteman, T., D. McGee, and H. Mobley, *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Hams F- 12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(11): p. 3842-3850.
- Bayona Rojas, M.A., Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 2013. 28(2): p. 94-99.
- Majalca, C., et al., Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*, 2001. 26(4): p. 85-89.
- McNulty, C., et al., *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2002. 49(4): p. 601-609.
- Joo, J., et al., Thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010, 2010. 15(4): p. 295-302.
- Ott, L., et al., Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and susceptibility to five antimicrobial drugs in Southern Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011. 42: p. 442-447.
- Calvet, X., et al., Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2010. 1: p. 7-13.
- Mégraud, F. and P. Lehours, *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007. 20(2): p. 280.