

# Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*

## Microbiological conditions for culturing *Helicobacter Pylori*

Martín Alonso Bayona Rojas, Bact., Esp., M. Sc.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Docente Facultad de Medicina, Grupo de investigaciones Biomédicas y de Genética Aplicada (GIBGA), Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Bogotá-Colombia  
e-mail: mabayona@udca.edu.co

Fecha recibido: 17-09-12  
Fecha aceptado: 16-04-13

### Resumen

El diagnóstico oportuno y de cultivo de *Helicobacter pylori* es de gran importancia para estudiar las características de su crecimiento, así como para contribuir al conocimiento de la epidemiología clásica y molecular, la diversidad genética y la susceptibilidad frente a los antibióticos. La ubicuidad e importancia como patógeno de este microorganismo a nivel mundial nos obliga a considerar y a proponer alternativas efectivas para aislarlo e identificarlo de rutina en los laboratorios de microbiología. La presente revisión estuvo orientada a describir la literatura referente a las condiciones requeridas para el cultivo de este microorganismo en el laboratorio.

### Palabras clave

*Helicobacter pylori*, microbiología, aislamiento, cultivo microbiano.

### Abstract

Early diagnosis and culturing of *Helicobacter pylori* are of great importance for the study of the growth characteristics of these bacteria which can contribute to knowledge of classical and molecular epidemiology, genetic diversity and susceptibility to antibiotics. The ubiquity and importance of this pathogen throughout the world has forced us to consider and propose effective routine alternatives for isolating and identifying these bacteria in microbiology laboratories. This review was conducted to describe the literature concerning the conditions for cultivation of this organism in the laboratory.

### Key words

*Helicobacter pylori*, microbiology, isolation, microbial culture.

## ANTECEDENTES

Se calcula que *H. pylori* infecta entre 50 y 75% de la población mundial. De cada 10 personas infectadas por este microorganismo, solo una sufre enfermedad y nueve nunca la desarrollan. La infección se asocia etiológicamente con la presentación de úlceras pépticas, ya sea gástrica o duodenal, y con el desarrollo de un tipo especial de linfoma gástrico que se denomina maltoma; de igual manera, participa de la cadena multicausal etiológica del desarrollo de

cáncer gástrico (1). De hecho, la Organización Mundial de la Salud ha clasificado a dicho patógeno como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) donde la incidencia más alta de infección tiene lugar durante la infancia en países en vías de desarrollo y parece estar relacionada con condiciones económicas e higiénico-sanitarias desfavorables (2, 3). Las diferentes cepas parecen estar asociadas con la diversidad en su virulencia y la interacción de factores, entre otros, el origen étnico, la mala alimentación, el hacinamiento, la geografía y la edad (4).

En el presente artículo se presenta una revisión de aspectos microbiológicos orientados al cultivo y los factores implícitos para el mismo. Para la búsqueda bibliográfica se exploraron las siguientes bases de datos: Medline, Proquest, Embase, Jstore, Pubmed, Hinary, Springer, Nature, Science online y Oxford Journal y en revistas particulares como Plos, Nas e Imbiomed. Se combinaron los términos: *Helicobacter* and Maintenance, Supplements for *Helicobacter*, Laboratory Maintenance, Culture on Solid Medium, Susceptibility to antibiotics.

En Colombia, en un estudio realizado por la universidad del Valle en financiación con el Instituto colombiano para el desarrollo de la ciencia y la tecnología reportaron una prevalencia de 69,1% de infección por *H. pylori* en hospitales regionales de 16 departamentos de Colombia en muestras de biopsias tomadas de endoscopia de vías digestivas altas. En las décadas anteriores, las investigaciones acerca de las causas de la enfermedad ácido péptica y adenocarcinoma gástrico se enfocaron, principalmente, en factores de la dieta, pero el descubrimiento de *H. pylori* como un patógeno gástrico frecuente ha cambiado los conceptos etiológicos acerca de estas y otras enfermedades gastro-duodenales (5).

El estudio de *H. pylori* en nuestro país se inicia a finales de la década anterior y existen pocos informes de laboratorios experimentados en las habilidades microbiológicas necesarias para su aislamiento y cultivo (6).

## CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Los miembros del género *Helicobacter* fueron descritos en 1989, colonizan el estómago e intestino de humanos y algunas especies de animales, es un bacilo Gram negativo curvado, microaerófilo, posee una membrana externa y 4 a 8 flagelos polares protegidos por una vaina de estructura lipídica. Dentro de las enzimas que produce están: ureasa, catalasa y citocromo-oxidasa. La ureasa se encuentra entre los factores de virulencia bacterianos de *H. pylori* la cual transforma la urea en NH<sub>3</sub> y agua, alcalinizando así el medio ácido circundante; otros factores están representados en la lipasa, las adhesinas, la catalasa, el factor activador plaquetario, la proteína del gen asociado a citotoxina Cag A, el pic B (que induce a citocinas) y la citosina vacuolizante Vac A (3, 7).

Para el cultivo, las muestras se obtienen a partir de mucosas gástricas y muestras extragástricas tomadas de placa dental, recto, vejiga y esófago; el tiempo que tarda en formar colonias se obtiene entre 4 a 7 días en condiciones de: 5-10% O<sub>2</sub>; 5-10% CO<sub>2</sub>; 80-90% N<sub>2</sub>, humedad de 95% y temperatura de 35 a 37 °C. Usualmente se cultiva en medios complejos con sangre, suero y antibióticos (7).

## CONDICIONES DE LA TOMA DE MUESTRAS

El protocolo recomendado para la toma de biopsias en pacientes con gastritis crónica es el propuesto por el sistema Sídney. Se debe tener en cuenta que *H. pylori* se encuentra predominantemente en la parte antral del estómago, excepto en individuos tratados con IBP y antihistamínicos anti-H<sub>2</sub>, en los que se encuentran densidades más grandes en el cuerpo. Se deben tomar 5 biopsias de la siguiente manera: dos muestras antrales a partir de las curvaturas mayor y menor 2 a 3 centímetros proximales al píloro, dos muestras del cuerpo a partir de las curvaturas mayor y menor 8 centímetros distales del cardias y una muestra a partir de la incisura angularis (8). Empleando este protocolo se puede detectar la bacteria en prácticamente todos los individuos infectados (9). La toma de la biopsia es un proceso prácticamente indoloro para el paciente pero es un procedimiento que debe ser realizado por un gastroenterólogo experto siguiendo los protocolos de ética médicos establecidos. No se recomienda que el procedimiento se lleve a cabo en pacientes con úlcera sangrante ya que puede representar peligro de hemorragia. Todos los estudios deben estar aprobados por el Comité de Ética y tener un consentimiento informado claro.

Se han utilizado otras muestras gástricas como jugo gástrico, la obtenida mediante la prueba del hilo ("string test") y el aislamiento a partir de vómitos, aportando diferentes resultados. *H. pylori* se ha cultivado puntualmente también de muestras extragástricas como placa dental, esófago, recto y vejiga urinaria.

*Aspectos a tener en cuenta:* si el paciente ha estado en tratamiento con antibióticos es necesario esperar al menos cuatro semanas tras la última dosis para obtener resultados satisfactorios en lo que respecta al cultivo. Los fórceps con los que se realizan las biopsias deben desinfectarse adecuadamente para evitar contaminaciones entre los pacientes; si la desinfección es demasiado fuerte puede afectar la viabilidad de la bacteria.

Las muestras de biopsia deben triturarse o pulverizarse con una pequeña cantidad de solución salina fisiológica antes de aplicarse al medio. La muestra homogénea debe colocarse de inmediato sobre la superficie del medio: debe tomarse con un asa y luego extenderse sobre la superficie con un método de extensión para aislamiento (8, 9).

Las muestras obtenidas se deben procesar rápido ya que el microorganismo es muy sensible al ambiente. Las muestras tomadas por biopsia (tomadas del antro y del cuerpo) se deben introducir en un tubo estéril tapa rosca con 0,5 ml de suero fisiológico y puede permanecer allí durante máximo 6 horas. Si se prevé una demora, se deben utilizar medios

de transporte como el medio Stuart y mantenerse a una temperatura de 4 a 8 °C, por no más de 24 horas antes del procesamiento, posteriormente se debe realizar un homogenizado y sembrar por duplicado en diferentes medios de cultivo entre ellos, caldo y agar *Brucella*, BHI, Mueller Hinton, agar Columbia y tripticasa de soja suplementados generalmente con suero fetal bovino, lisado de eritrocitos, extracto de levadura, peptona y extracto de cianobacterias. La sangre (caballo, cordero, conejo) generalmente se adiciona entre 7 y 10 % y dentro de los antibióticos que se añaden al medio están: vancomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, cefsulodine y polimixina B. Las muestras se pueden conservar en caldo tripticasa de soja o BHI adicionadas con glicerol al 20% las cuales se almacenan en congelador a -80 °C o N<sub>2</sub> líquido (10-12).

## CULTIVO

La utilidad e importancia del cultivo para *H. pylori* radica en poder conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología y en la posibilidad de determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos usados en el tratamiento (7, 13).

Tersterman y cols (2001) describen el uso de un medio con sustratos definidos (Hams F-12) el cual es empleado para el cultivo de células de mamíferos. Para el aislamiento de *H. pylori* se le realizaron modificaciones las cuales consistieron en suplementarlo con B- ciclodextrina, colesterol y suero fetal bovino sin adición de sangre lo cual hace costoso este medio. Se empleó agar sangre tradicional y se realizaron siembras de biopsia y cepas de referencia de *H. pylori*, obteniendo un crecimiento en 100% de los casos (14).

Joo y cols (2010), al establecer un sistema de cultivo líquido de capa fina para la recuperación de *H. pylori* mediante la adición de caldo *Brucella* en cajas de Petri de 90 mm de diámetro al cual adicionaron suero equino, extracto de levadura y dimetil-beta-ciclodextrina obtuvieron un tiempo de generación de 3,3 horas, creciendo exponencialmente dicho microorganismo durante 28 horas (15).

Stevenson y cols (2000) proponen un medio de cultivo alternativo cuyo componente base consta de agar Columbia y una mezcla de antibióticos que inhiben la carga microbiana acompañante como son vancomicina, anfotericina B, trimetoprima y cefsulodina. Adicionalmente, incorpora sangre de caballo, extracto de carne, agar agar y almidón de maíz (16).

Al sembrar muestras de antro pilórico y fondo gástrico en agar Columbia adicionado con 7% de sangre desfibrinada de cordero y suplemento selectivo DENT (vancomicina, trimetoprim, anfotericina B y cefsulodin) se obtuvo una alta especificidad (100%) siendo considerado el cultivo bacteriológico como prueba de oro (17).

El cultivo exitoso de *Helicobacter* requiere del uso de sangre fresca de cordero o de equino en los diferentes agares empleados. Los medios de cultivo preparados comercialmente pueden funcionar, pero la frescura de estos es difícil de verificar y a menudo pueden ser demasiado viejos o demasiado secos, y de igual manera carecen de antibióticos selectivos apropiados. Una vez preparados los agares, estos no deben emplearse inmediatamente, se deben mantener en bolsas de plástico sellados a 4 °C por no más de 2 a 3 semanas (7). Lo anterior ha sido confirmado en nuestra investigación destacando que el empleo de agar *Brucella* adicionado con sangre de caballo (8%) ofrece una mejor recuperación frente a la sangre de cordero (8%) y que su conservación se debe realizar a 4 °C por un tiempo máximo de 20 días.

En un estudio realizado por Yepes y cols (2008), en el que se determinó la resistencia de *H. pylori* en pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), las muestras obtenidas fueron inicialmente transportadas en un tubo estéril con tapa rosca y congelados a -70 °C durante un periodo no mayor a 3 semanas. Posteriormente, se descongeló la muestra y se cultivó en agar *Brucella* suplementado con sangre de cordero al 5% e incubado durante 5 días en un medio microaerofílico húmedo y a 37 °C (18).

Al evaluar un medio de transporte alternativo constituido por caldo Mueller Hinton suplementado con extracto de cianobacterias (MH-CE) y compararlo con el medio, caldo Mueller Hinton suplementado con suero fetal de ternera (MH-FCS), se obtuvo que la recuperación después de 48 horas a temperatura ambiente en MH-CE fue mayor (p menor o igual a 0,005) que en MH-FCS. El medio MH-CE es simple, barato y se puede emplear para preservar la viabilidad de *H. pylori* y su recuperación a partir de biopsias (19).

Trespalcios y cols (2010) aislaron e identificaron *H. pylori* a partir de biopsias gástricas las cuales fueron maceradas en una solución de carbón activada al 1% obteniendo una solución homogénea. Posteriormente se sembraron en el medio Wilkins-Chalgren modificado, suplementado con isovitalax y antibióticos los cuales fueron incubados en anaerobiosis a 37 °C durante 4-15 días obteniendo 79 aislamientos y representando 80% de recuperación (20).

Quiroga y cols (2005), al cultivar muestras de biopsias obtenidas a partir de pacientes con enfermedades gastroduodenales las cuales fueron maceradas en condiciones asépticas y cultivadas en medio *H. pylori* (Lab M), con suplemento de suero de caballo al 8%, isovitalax al 1% y suplemento selectivo para *Campylobacter* (Merck) reportaron buenos resultados en la recuperación de *H. pylori* (21).

El crecimiento in vitro de *H. pylori* requiere medios como caldo o agar *Brucella* complementados con vitaminas

y suero de caballo o ciclodextrinas. Los medios líquidos generalmente muestran un crecimiento lento. Al reemplazar el suero o ciclodextrinas con una solución de colesterol disponible comercialmente se obtuvo un óptimo crecimiento de *H. pylori* siendo una alternativa para su recuperación a partir de muestras clínicas (22).

Majalca y cols (2001) evaluaron los medios base de GC (gelosa, chocolate) con 2% de hemoglobina liofilizada, agar *Campylobacter*, agar de Casman, agar de Columbia, agar infusión cerebro corazón, agar *Brucella*, agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, todos adicionados con 7-10% de sangre de caballo o de cordero suplementados con antimicrobianos y con o sin NAD (Nicotinamida-adenina) a una concentración de 15 ug/ml. El ambiente microaerofílico se logró utilizando sobres generadores de CO<sub>2</sub> y empleando tres pastillas de Alkaseltzer en 10 ml de agua dentro de un frasco sellado con parafilm, con o sin vela. Las cepas se conservaron a -70 °C empleando caldo *Brucella* adicionado de 10% de suero de caballo, 25% de glicerina y sangre de caballo así como caldo *Brucella* adicionado de 10% de suero fetal bovino y 30% de glicerol. Dentro de los resultados obtenidos se destaca: el óptimo ambiente microaerofílico obtenido con las tres pastillas de Alkaseltzer. El medio de cultivo que mostró mejores resultados en la recuperación de *H. pylori* correspondió al agar Casman con 7% de sangre de caballo durante 5-7 días y el mejor medio de conservación correspondió al caldo *Brucella* con 2% de suero fetal bovino (23).

La sensibilidad de los medios de cultivo varía en relación con diferentes variables: colección, transporte, almacenamiento de la muestra, medios de cultivo y condiciones de incubación. Navarro y cols (2007) evaluaron el método ecométrico para tres medios de cultivo: agar tripticasa de soya, Agar BHI y agar *Brucella*, a los cuales se les adicionó sangre de cordero al 5%. La capacidad de recuperación de los tres medios para *H. pylori* fue baja y se correlacionó con un índice de crecimiento absoluto (ICA) por debajo de 2,5 indicando que todos ellos no tienen buena capacidad de recuperación posiblemente debido a la baja concentración de sangre y a la ausencia de nutrientes como isovitalex (24).

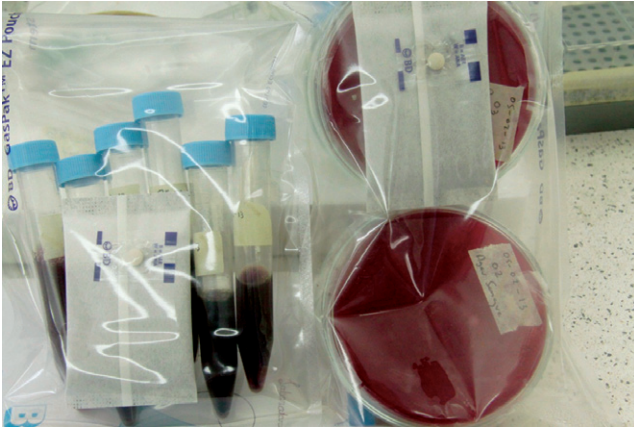
El crecimiento de *H. pylori* en ausencia de suero sigue siendo difícil, y solo parcialmente se han definido algunos requerimientos nutricionales como aminoácidos, metales, cloruro de sodio para hierro, zinc y magnesio fueron críticos para el crecimiento; cobre no era necesario. Estos datos indican que *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp no son tan exigentes como se pensaba. Los datos también sugieren que los medios químicamente definidos descritos podrían generar el crecimiento de una amplia gama de *Helicobacter* spp, lo que permite una caracterización más

detallada de su fisiología y de las interacciones con las células del huésped (25).

McNulty y cols (2002) recomiendan el empleo del medio de cultivo Wilkins-Chalgren-*Brucella*, en la recuperación de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas siendo catalogado como un medio selectivo (26).

Miendje y cols (2010), al evaluar tres medios selectivos (PYL-bioMérieux, Francia; *Helicobacter* agar-Beckton Dickinson, E.U y Brugman *Helicobacter* agar) empleados para la recuperación de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas no encontraron ninguna diferencia significativa en cuanto al número de colonias y tasas de recuperación. Observaron la aparición de colonias típicas las cuales fueron identificadas mediante el empleo de la coloración de Gram y pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa y ureasa (27).

La experiencia que hemos tenido como integrante del grupo GIBGA (Grupo de investigaciones biomédicas y de genética aplicada) en cuanto a la recuperación de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas, nos ha permitido establecer y recomendar un medio de transporte y de enriquecimiento selectivo a la vez como es el caldo *Campylobacter* adicionado de isovitalex al 2%, sangre completa de caballo o de cordero al 8%, trimetropim-sulfametoazol 0,1%, vancomicina 0,1%, penicilina 0,1% y anfotericina 0,1%. Este medio se incubaba a 37 °C por espacio de 3 a 5 días (a las 18 horas de incubación se observan colonias características) en condiciones de anaerobiosis el cual se alcanza mediante el empleo del sistema comercial BD de recipientes (bolsas) de generación de Gaspak EZ anaerobio - Ref: 260683 (figura 1). Posteriormente a la incubación mencionada se procede a realizar el aislamiento en medios como agar *Brucella* o agar chocolate adicionado con los ingredientes anteriormente mencionados en el medio de transporte y de enriquecimiento. Los métodos de recuperación en caldo y en medios sólidos recomendados por el autor han sido evaluados con una cepa de referencia de *H. pylori* NCTC 11638 amablemente donada al grupo GIBGA por parte del cepario de la Universidad Javeriana de Colombia a cargo de la doctora Alba Alicia Trespalcios. Cabe destacar que a cada una de las cepas que han sido obtenidas se les ha realizado un control bioquímico caracterizado por pruebas convencionales (Gram, oxidasa, catalasa, ureasa) y un control molecular basado en la genotipificación de la subunidad 16s del gen ribosomal teniendo en cuenta que estas cepas presentan altísima diversidad. Destacamos así mismo que a partir de los cultivos en medio líquido se presenta como característica importante la presencia de una biopelícula la cual promueve el intercambio genético, favoreciendo la generación de cepas más virulentas y resistentes en ambientes extremos (28, 29).



**Figura 1.** Condiciones microaerofílicas para el aislamiento y recuperación de *Helicobacter pylori* basado en el sistema de generación Gaspak EZ.

## ANTIBIOGRAMA

Para evaluar la sensibilidad de *H. pylori* frente a los antibióticos, el método de referencia aprobado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) corresponde al método de dilución del antibiótico en agar (28).

Por otra parte, la British Society for Antimicrobial Chemotherapy recomienda el E-test (Método epsilómetro) el cual tiene buena correlación con el método de referencia (10).

Para la prueba de sensibilidad se emplea agar Muller Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero. El inóculo se prepara en solución salina 0,85% comparando con el tubo N° 2 de la escala de MacFarland ( $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml). Para obtener este inóculo, la cepa se debe tomar a partir de un subcultivo de 72 horas en agar sangre; de igual manera, como alternativa, a partir de cultivos de *H. pylori* de 2-3 días de incubación se prepara una suspensión de en caldo *Brucella* ajustada a la escala de Macfarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) los cuales se inoculan en placas con agar Mueller Hinton suplementado con 10% de suero de caballo y 2% de isovitalax (20).

Teniendo en cuenta que el método de dilución en agar no es aplicable de rutina y el método del E-test es caro y que también se observan discrepancias con metronidazol, McNulty en 2002 realizó una revisión de los estudios en los que se había utilizado difusión con disco, recomendando:

**Concentración de discos y puntos de corte:** para metronidazol se recomienda el empleo de un disco de 5 µg y se considera resistente si el halo es < 16 mm, intermedio si es de 16-21 mm y sensible si es > 21 mm. En las cepas con sensibilidad intermedia se recomienda la realización de un método de determinación de CMI. Para claritromicina, la utilización de un disco de 2 µg considerado resistente cuando no existe

halo de inhibición. También se puede utilizar un disco de 15 µg de claritromicina y considerar resistente si el halo es de < 18 mm (26).

Ramos (2012) afirma que el cultivo es la prueba más específica. Las mejores muestras para el cultivo están representadas por las biopsias gástricas las cuales deben colocarse en el medio Stuart y sembrarse en poco tiempo. El carbón adicionado a los medios de cultivo en una concentración de 10% protege al microorganismo de los radicales libres de oxígeno y de los ácidos grasos (30, 31).

## CONCLUSIONES

La identificación preliminar de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas se basa en las características de la colonia y en la detección de enzimas como catalasa, citocromo-oxidas y ureasa siendo esta última un elemento básico para la sobrevivencia en el ambiente ácido gástrico.

Al analizar los diferentes medios reportados en la literatura podemos observar que existen diversas posibilidades de acuerdo con la accesibilidad a los diferentes productos comerciales o a los ingredientes con que se cuenten en los laboratorios de microbiología. Dentro de los componentes básicos recomendados para la preparación de estos medios se tiene el empleo de un caldo o agar base nutritivo adicionado de sangre fresca de cordero o de equino al 8%, isovitalax al 2%, carbón al 10%, suero de equino al 10% y antimicrobianos como vancomicina, trimetoprim, cefsulodine y anfotericina B. Las condiciones de incubación en anaerobiosis son obligatorias si se tiene en cuenta que es un microorganismo muy exigente, observándose colonias entre 2 a 7 días en condiciones de: 5-10% O<sub>2</sub>; 5-10% CO<sub>2</sub>; 80-90% N<sub>2</sub>, humedad de 95% y temperatura de 35 a 37 °C.

## Agradecimientos

El autor agradece la colaboración prestada al doctor Andrés Julián Gutiérrez Escobar líder del grupo GIBGA.

## REFERENCIAS

1. Sierra F. *Helicobacter pylori*. Estado actual. Revista colombiana de cirugía 2002; 17(3): 128-130. Disponible en <http://www.encolombia.com/medicina/cirugia/ciru17302editorial.htm>
2. Gutiérrez O. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados con la infección por *Helicobacter pylori* en niños. revista de gastroenterología 2001; 16(1): 19-22 Disponible en <http://www.encolombia.com/medicina/gastroenterologia/gastro16101trab-seroprevalencia.htm>
3. Naranjo D, Suárez M, Bayona M, Gallego M, Urbina M, Rojas D. Aspectos históricos, epidemiológicos y patológicos de la helicobacteriosis en humanos y en caninos. Medicina (Bogotá) 2012; 34: 146-161.

4. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. *Helicobacter pylori* in Developing Countries. Journal of Digestive Diseases 2011; 12; 319-326.
5. Bravo Luis E, Cortés Armando. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Revista Colombia Médica 2003; 34(3). Disponible en <http://www.bioline.org.br/request?Rc 03019>.
6. Cittelly Diana Marcela, Henaó Sandra Consuelo, Orozco Oscar, Martínez Julian David, Detección de *Helicobacter pylori* en Colombia: diferentes metodologías aplicadas a su estudio en una población de alto riesgo de cáncer gástrico. Revista colombiana de gastroenterología 1999; 14(3): 164-169. Disponible en <http://www.encolombia.com/gastro14399-deteccion.htm>
7. Blanchard T, Nedrud J. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. Current Protocols in Microbiology 2012; supplement 24.
8. Dixon M, Genta R, Yardley J, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996; 20: 1161-81.
9. El-Zimaity H, Graham D. Evaluation of gastric mucosal biopsy site and number for identification of *Helicobacter pylori* or intestinal metaplasia: role of the Sydney system. Hum Pathol 1999; 30: 72-7.
10. Ndip R, Mackay W, Farthing M, Weaver L. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36: 616-622.
11. Hernández F, Rivera P. Historia natural de la infección por *Helicobacter pylori*, su tratamiento antimicrobiano y el empleo de plantas medicinales. Rev Costarric Cienc méd 2003; 24(3-4): 149-165.
12. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G. Procedimientos en microbiología microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Primera edición, Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, España; 2004.
13. Eeskandarian R, Ghorbani R, Shiyasi M, Momeni B, Hajifathalian K, Madani M. Prognostic role of *H. pylori* infection in acute coronary syndrome a prospective cohort study. Cardiovasc J Afr 2012; 23(3): 131-135.
14. Tersterman T, McGee D, Mobley H. *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Hms F- 12 nutrient mixture. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3842-3850.
15. Joo J, Park K, Song J, Kim D, Lee K, Kwon Y, Kim J, Kim K, Youn H, Kang H, Baik S, Lee W, Cho M, Rhee K. Thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2010; 15(4): 295-302.
16. Stevenson T, Lucia L, Acuff G. Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. Appl Environ Microbiol 2003; 66: 723-727.
17. Bilbao P, Claros M, Damiani E, Ascarrunz C, Cárdenas A, Lobo M, Altman E, Gabastou J, Verez B, Trigoso C. Infección por *Helicobacter pylori*: asociación a patologías gástricas y métodos de diagnóstico. Biofarbo 2007; 15(1): 51-54.
18. Yepes C, Rodríguez B, Ruiz A, Ariza B. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. Acta Med Colomb 2008; 33(1): 11-14.
19. Vega A, Silva H, Cortiñas T. Evaluation of a Serum-free transport medium supplemented with cyanobacterial extract, for the optimal survival of *Helicobacter pylori* from biopsy samples and strains. European Journal of clinical microbiology y infectious diseases 2012; 31(2): 135-139.
20. Trespalacios A, Otero W, Mercado M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol. Claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Rev Col Gastroenterol 2010; 25(1): 31-38.
21. Quiroga A, Citelly D, Bravo M. Frecuencia de los genotipos babA2, oipA y cagE de *H. pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. Biomédica 2005; 25: 325-334.
22. Jiménez L, Rohrer S, Jain U, Ertl C, Sewald X, Haas R. Effects of cholesterol on *Helicobacter pylori* growth and virulence properties in vitro. Helicobacter 2012; 17(2): 133-9.
23. Majalca C, Rivera J, Ochoa S, Giono S. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. Bioquímica 2001; 26(4): 85-89.
24. Navarro J, Perea A, Pineda J, Díez O, Mercado M, Trespalacios A. Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *H. pylori*. Universita Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias 2007; 12: 79-86.
25. Tersterman T, Conn P, Mobley H, McGee D. Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. J Clin Microbiol 2006; 44(5): 1650-8.
26. McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, Smith G, Teare L. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. Journal Antimicrobial Chemotherapy 2002; 49(4): 601-609.
27. Miendje V, Van der Borre C, Fontaine V. Comparative evaluation of 3 selective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies under routine condition. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease 2010; 68: 474-476.
28. Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Verginelli F, Di Giulio M, Baffoni M, Bessa L, Cellini L. *Helicobacter pylori* biofilm: a protective environment for bacterial recombination. J Appl Microbiol 2012; 113(3): 669-76.
29. Carron M, Tran V, Sugawa C, Coticchia J. Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa. J Gastrointest Surg 2006; 10(5): 712-7.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing and approved standard M7-A5. Informational supplement M100-S10.22. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pa. 2000.
31. Ramos Javier. Infectología clínica. Segunda edición. Editorial El Manual Moderno S.A de C.V. 2012.