

# Características, métodos de cultivo y resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*

## Artículo de revisión

Botero Cardona, J., Cardona López, M. A.<sup>1</sup>, Álvarez Aldana A.<sup>2</sup>

### RESUMEN

*Helicobacter pylori* es la principal especie del género *Helicobacter* responsable de una gran variedad de patologías gastroduodenales en países desarrollados y en vía de desarrollo. La importancia de cultivarla radica en la capacidad de conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología, determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos usados en determinado tratamiento y la posibilidad de realizar una detección exitosa en pacientes que se sospeche la presencia del microorganismo. Actualmente no se provee de un medio de cultivo universal para mantener el crecimiento de *H. pylori* y pocos medios han sido identificados que proveen significativamente el crecimiento ventajoso *in vitro*. Este artículo tiene como objetivo realizar una revisión de los diferentes medios de cultivo utilizados para el crecimiento *in vitro* de *H. pylori*, así como los mecanismos de resistencia de la bacteria.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, crecimiento bacteriano, medios de cultivo, resistencia antibiótica.

Recibido: Septiembre 2018 - Aceptado: Noviembre 2018

---

<sup>1</sup> Universidad Libre, Programa de Microbiología.

<sup>2</sup> Universidad Libre, Programa de Microbiología, Grupo de Investigación MICROBIOTEC, Semillero de Investigación Microorganismos de Importancia en Salud Humana y Animal (OBVIO MICROBIO). Correo: adalucy.alvareza@unilibre.edu.co

# Characteristics, cultivation methods and Antimicrobial resistance in *Helicobacter Pylori*

## *Review article*

Botero Cardona, J., Cardona López, M. A.<sup>1</sup>, Álvarez Aldana A.<sup>2</sup>

### **ABSTRACT**

*Helicobacter pylori* is the main species of the *Helicobacter* genus responsible for a large variety of gastroduodenal pathologies in developed and developing countries. The importance of cultivating it lies in the ability to know its growth characteristics, its genetic diversity, its epidemiology, determine the bacterial resistance to the antibiotics used in a given treatment and the possibility of making a successful detection in patients who suspect the presence of the microorganism. Currently not provided of a universal culture medium to maintain the growth of *H. pylori* and few means have been identified that provide significantly advantageous growth in vitro. East the objective of this article is to review the different culture media used for the in vitro growth of *H. pylori*, as well as the resistance mechanisms of the bacteria.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, bacterial growth, culture media, resistance antibiotic

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es la principal especie del género *Helicobacter* responsable de una gran variedad de patologías gastroduodenales en países desarrollados y en vía de desarrollo; Es la principal causa de al menos el 90% de las úlceras duodenales y el 70% de las úlceras gástricas<sup>(1)</sup>. La bacteria tiene una tasa de crecimiento baja, es Gram-negativa, morfología curvada en forma de S y posee múltiples flagelos en un polo de la bacteria observados en micrografía electrónica<sup>(1, 2)</sup>; tiene entre 2 a 6 flagelos unipolares característicos; mide entre 2,5-4,0  $\mu\text{M}$  de largo y 0,5-1,0 de ancho, la pared celular es lisa y puede estar cubierta con un prominente glicocalix con un espesor de 40nm<sup>(3)</sup>. No forman esporas en cultivos de agar sangre (in vitro) y en general, la bacteria cambia de forma espiral a cocoide según las condiciones del medio; en cultivos viejos ocurre el cambio a forma cocoide y está asociada a pérdida de la capacidad de cultivarse<sup>(4)</sup> y generalmente son irrecuperables<sup>(5)</sup>.

La importancia de cultivar *Helicobacter pylori* radica en la capacidad de conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología y la posibilidad de determinar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos comúnmente utilizados en los tratamientos. Es un microorganismo fastidioso por su crecimiento que requiere condiciones de microaerofilia y medios basales como agar Columbia<sup>(1, 5-9)</sup>, agar Triptacasa soya<sup>(9, 10)</sup>, agar infusión cerebro corazón (BHIA)<sup>(1, 6, 11-14)</sup>, Ham' F-12<sup>(15)</sup> o agar yema de huevo<sup>(6, 7, 9)</sup>; suplementado con sangre<sup>(1, 5-7, 9, 11, 16)</sup>, suero<sup>(1, 6, 10, 14-18)</sup>, mucina<sup>(18,19)</sup>, IsoVitaleX<sup>(6, 9, 11, 12, 18)</sup>, almidón<sup>(16, 18)</sup>, sulfato ferroso<sup>(19)</sup>

o ciclodextrina<sup>(7, 18, 20, 21)</sup>; así como medios líquidos caldo infusión cerebro corazón (BHIB), caldo Mueller-Hinton (MHB) o Caldo Brucella (BB).<sup>(13)</sup>

La complejidad de cultivar *Helicobacter pylori* está basada en determinar las condiciones adecuadas para su crecimiento; desde su descubrimiento, muchos investigadores han cultivado y estudiado la bacteria pero sin embargo, todavía no se provee de un medio universal usado para mantener el crecimiento de *H. pylori* y pocos medios han sido identificados que proveen significativamente el crecimiento ventajoso in vitro<sup>(8)</sup>. Este artículo tiene como objetivo realizar una revisión exhaustiva de los métodos utilizados para el cultivo de *H. pylori* así como su mecanismo de resistencia.

## MATERIALES Y METODOS

Se realizó una búsqueda aleatoria de la literatura en la base de datos NCBI Pubmed y Scopus. Se utilizaron los términos *Helicobacter pylori* y el conector booleano AND y se seleccionó por título con los siguientes términos: *Helicobacter pylori* AND *culture* arrojó 20 artículos, *Helicobacter pylori* AND *culture media* arrojó 10 artículos, *Helicobacter pylori* AND *media* arrojó 20, *Helicobacter pylori* AND *médium* arrojó 20 artículos, *Helicobacter pylori* AND *recovery* arrojó 20 artículos, *Helicobacter pylori* AND *transport media* arrojó 9 artículos, *Helicobacter pylori* AND *solid médium* arrojó 2 artículos, *Helicobacter pylori* AND *solid media* arrojó 3 artículos, *Helicobacter pylori* AND *liquid media* arrojó 5 artículos, *Helicobacter pylori* AND *antibiotics resistance* arrojó 2433 artículos.

En las búsquedas realizadas se utilizó tanto el termino media como médium debido a que el inglés acepta ambas variantes para la palabra medio. No se restringió la pestaña de tiempo, se seleccionó solo aquellos artículos que evaluaran el crecimiento de *Helicobacter pylori* en medios de cultivo y su recuperación, Se escogió artículos desde el descubrimiento de *H. pylori* hasta la fecha. Se utilizó el termino *Helicobacter pylori AND antibiotics resistance*, y se seleccionó review y free full text, se escogió por título y se seleccionaron los artículos que explicaran la resistencia de *Helicobacter pylori* a antibióticos utilizados en tratamientos y en medios de cultivo. Se obtuvo un total de 149 artículos de los cuales se escogieron 50.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

#### Morfología celular

*Helicobacter pylori* es descrita como una bacteria Gram-negativa de forma en S o curvada (0,5-0,9 µm de ancho por 2-4µm de largo); no forma espora, posee de 2 a 6 flagelos (Lofotrico)<sup>(4)(3)</sup>.

#### Morfología de las colonias.

Las colonias de *H. pylori* de un cultivo primario suplementado con agar sangre a 37°C, usualmente toman de 3 a 5 días en aparecer y son circulares (1-2mm) y son traslucidas en apariencia.<sup>(4)</sup>

### Características Bioquímicas

Las especies de *Helicobacter* son quimiorganotrofas, la gelatina, el almidon y la caseína y la tirosina no son hidrolizadas<sup>(2)</sup> aunque Coudron et al (1995) menciona el aumento en la tasa de crecimiento de *H. pylori* usando el almidón como fuente de carbono en el medio de cultivo<sup>(16)</sup>. Las especies de *Helicobacter* son rojo metilo y Voges-proskauer negativas. Actividad oxidasa está presente en todas las especies y la mayoría de las especies como *H. pylori* producen catalasa y ureasa; no presentan producción de pigmentos<sup>(2)</sup>. Por otro lado Testerman et al (2006) explica que el hierro es esencial para el crecimiento de la bacteria, las especies de *Helicobacter* son capaces de utilizar varias formas de hierro, aunque a altas concentraciones de éste, no coloniza el intestino debido a que otras especies de bacterias utilizan el hierro para su crecimiento; así mismo se menciona que la adición de aminoácidos no esenciales como triptófano e isoleucina en medio Ham's-F12 incrementa significativamente el crecimiento de *H.pylori* y lo mismo ocurre con glutamina y glutamato<sup>(15)</sup>

La detección de *H. pylori*, incluye las pruebas bioquímicas tinción de Gram, test de ureasa, catalasa y oxidasa aunque se incluye herramientas moleculares como la PCR para lograr una clarificación y buena detección<sup>(1)</sup>.

#### Formas cocoides

Catrenich & Makin (1991) determinaron que *H. pylori* cambia de forma bacilar a cocoide

en caldo como medio de cultivo después de 5 días bajo condiciones microaerobias y que paralelamente ésta conversión en su forma cocoide ocasiona un decrecimiento en la formación de unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL) dando lugar a la pérdida de la recuperación del medio de cultivo<sup>(22)</sup>; por consiguiente estudios superiores mencionan que la forma cocoide de *H. pylori* ha sido dividida en tres tipos: Forma cocoide degenerativa que representa la muerte de la bacteria por la pincosis, una bacteria cocoide viva que puede ser cultivada en medio de cultivo sólido y finalmente viable pero no cultivable (Viable But Non-Culturable, VBNC). Se sugiere que la transformación a la forma cocoide trae como resultado la reducción del metabolismo e induce a una menor modificación en los procesos fisiológicos de la bacteria<sup>(23)</sup>.

### Tiempo de generación

Joo et al (2010) Establecieron un tiempo de generación para *H. pylori* de 3,3 horas creciendo exponencialmente durante 28 horas en un cultivo líquido de capa en caldo Brucella suplementado con suero equino, extracto de levadura, y dimetil-beta ciclodextrina<sup>(21)</sup>; Así mismo Jiang et al (2000) evaluaron el crecimiento de *H. pylori* en varios suplementos teniendo como resultados en caldo BHI suplementado con mucina al 0.15, 0.30 y 0.45% tiempos de generación de 4.3, 3.8 y 4.0 horas respectivamente; caldos suplementados con 0.05, 0.075 y 0.1% sulfato ferroso y piruvato de sodio tuvieron tiempos de generación de 3,2 a 4,2 horas durante 72 a 96 horas de crecimiento<sup>(19)</sup>.

### Condiciones de incubación

Se han señalado diferentes composiciones para una atmósfera de microaerofilia usada para el cultivo de *H. pylori*. Rangos de 5-6% de O<sub>2</sub>, 7-12% CO<sub>2</sub>, 0-85% H<sub>2</sub> y 0-85% N<sub>2</sub>; estos valores pueden ser logrados usando kits generadores de gas y llenados con 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> y 80% N<sub>2</sub> de una mezcla de gases<sup>(1)</sup>; así mismo Xu, Czinn & Blsncard (2010), demuestran que *H. pylori* cultivada en profundidad en tubos de ensayo con agar Brucella o Agar Infusión cerebro corazón permanecen viables durante 8 semanas mantenidas a 37°C con 10% de CO<sub>2</sub><sup>(14)</sup>. Aunque se conoce claramente que *H. pylori* crece de manera exitosa a 37°C durante 4 a 7 días en condiciones de microaerofilia, también se ha reportado durante periodos mucho más largos en condiciones anaeróbicas predominando la forma cocoide sobre la bacilar, esto mismo sucede en *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Acinetobacter* sp<sup>(24)</sup>. Así mismo, Siavoshi et al (2012) expone que *H. pylori* es microaerofila y cambia a forma cocoide cuando se expone a condiciones aeróbicas; el estudio presenta un crecimiento equidistante entre las condiciones microaerobias y aeróbicas debido a la producción de un exopolisacárido (EXP) que sirve como barrera física y reduce la difusión del oxígeno a través de la pared celular protegiendo a la bacteria contra condiciones de estrés<sup>(25)</sup>.

### PRESERVACION Y TRANSPORTE DE CULTIVOS

El éxito de cultivar *H. pylori* de biopsias gástricas está influenciada por las condiciones de transporte. Las bacterias que son tomadas de las biopsias gástricas deben ser inoculadas a cultivos tan rápido

como sea posible ya que la viabilidad del microorganismo es reducida por la exposición a la atmosfera de oxígeno<sup>(1)</sup>. Xia et al (1994) investigaron la forma de transportar *H. pylori* en medios solidos; explican que el transporte en medios agar chocolate inclinado (pico de flauta) y placas de agar chocolate en bolsas BBL Campy es recomendable y más efectivo, se logra una mayor tasa de recuperación después de 3 días de almacenamiento, así mismo menciona que la adición de CO<sub>2</sub> en el agar chocolate inclinado (pico de flauta) aumenta el efecto de supervivencia de la bacteria, por consiguiente, también proponen que después del transporte del microorganismo se realice un subcultivo en (i) Agar Columbia con 7% de sangre humana (ii) agar Wilkins Chalgren con 10% de sangre humana y antibióticos que incluyen vancomicina (10µg/L), defsulodin (2 µg/mL), cicloheximida (200µg/L) y trimetropim (5µg/L) o (iii) agar Columbia con 6% de sangre de cordero y antibióticos que incluyen vancomicina (6µg/L), polimixina B (4 µg/mL) y trimetropim (5µg/L) bajo condiciones microaerofilas de 3 a 7 días<sup>(5)</sup>. Vega et al (2012) utilizó un medio alternativo suplementado con extractos de cianobacterias (CE) para preservar la viabilidad de las cepas de *H. pylori* en el proceso de transporte; se comparó dos medios de cultivo para transporte de *H. pylori* ambos preparados con Agar caldo Mueller-Hinton, la única diferencia radicaba en que a un medio se le agregó extracto de cianobacterias y al otro suero fetal bovino, los resultados mencionan que el medio que contenía extracto de cianobacterias tuvo una recuperación exitosa<sup>(26)</sup>. Por otro lado Xu, Czinn & Blsncard (2010) Evaluaron un mecanismo para mantener viable los cultivos de *H. pylori* en el laboratorio sin

tener continuamente que realizar repiques, mencionan que los medios de cultivo sólidos en tubos de ensayo pueden ser utilizados para mantener y repicar la cepa exitosamente<sup>(14)</sup>. Veenendaal et al (1993) buscando una manera de bajo presupuesto de transportar *H. pylori* extraído de biopsias gástricas, comparan el Transporte con NaCl 0,9% y el medio Clairy-Blair, determinan que por la disponibilidad, bajo costo y fácil de manipular, NaCl fue preferido y es un medio adecuado para el transporte de la bacteria<sup>(27)</sup>. También se ha mencionado el uso de caldo infusión cerebro corazón (BHI), suero de caballo y extracto de levadura suplementado con vancomicina, anfotericina B y ácido nalidixico (VAN) para la recuperación de *H. pylori* con una tasa del 76 al 46% después de almacenada por 5 a 9 días<sup>(28)</sup>. Por otra parte Cellini et al (2014), desarrollaron un nuevo medio para el transporte de *H. pylori* (*GESA-Helicobacter pylori transport médium*), este medio mantiene la viabilidad de la bacteria por 7 a 10 días; Este medio contiene agar, digestión enzimática de caseína, digestión enzimática de tejido animal, extracto de levadura y glucosa, ellos aseguran que el medio de cultivo GESA permite exitosamente el transporte de biopsias gástricas de endoscopias al laboratorio garantizando una alta viabilidad y buen cultivo<sup>(29)</sup>.

## MEDIOS DE CULTIVO

### Medios de cultivo sólidos

Numerosos medios de cultivo sólidos se han formulado para el crecimiento de *H. pylori*. Goodwin et al (1985) evaluaron técnicas de cultivo para el aislamiento de *H. pylori* de biopsias de mucosa gástrica; determinaron

que el medio más satisfactorio para *H. pylori* fue usando agar infusión cerebro corazón, sangre de cordero 7%, 1-0% IsoVitalex, 6mg/L de vancomicina, 20mg/L ácido nalidixico y 2 mg/L de anfotericina; en comparación con el medio que contenía suplemento FBP (Campylobacter Growth Selectavial: Sulfato ferroso, Metabisulfito de sodio y piruvato de sodio) en vez de sangre de cordero e isoVitalex; así mismo se dieron cuenta que el metabisulfito de sodio presente en el suplemento FBP inhibe algunas cepas de *H. pylori* y, la densidad, crecimiento y tamaño de las colonias en agar con sangre lisada fue menor que con sangre intacta en la mayoría de las cepas<sup>(30)</sup>. Kraiden et al (1987) compararon el aislamiento de *H. pylori* de un medio no selectivo (agar sangre de cordero, SBA) con un medio selectivo (Agar Skirrow, SM); el medio SM detectó todos los aislamientos encontrados en el medio SBA, además se menciona que 29 de 49 endoscopias fueron positivas en el medio SBA mientras que 27 de 49 endoscopias fueron positivas en el medio SM, una diferencia en la tasa de recuperación en la cual no es significativa<sup>(31)</sup>. En continuación J. C. Dent (1988) añade al medio cefsulodin (5mg/L) como un sustituto de la polimixina y anfotericina B (5g/L) para inhibir *Candida* spp, un contaminante común del estómago<sup>(11)</sup>. Por otro lado en 1991, Westblom et al; presentaron un nuevo medio para el cultivo de *H. pylori*, Agar emulsión yema de huevo compuesto de agar Columbia, EYE (Emulsion yema de huevo), IsoVitalex, Cloruro de trifeniltetrazolio, agua destilada y antibióticos opcionales como cefsulodin, trimetropin, vancomicina y anfotericina B. ellos compararon agar triptacasa soya, agar Mueller-Hinton, Agar Brucella en

combinación con concentraciones de yema de huevo; siendo agar brucella en concentraciones de 2,5 a 5% superior a los otros dos<sup>(9)</sup>. Tee et al (1991) compara tres medios selectivos Skirrow's, Dent's CP y medio Charcoal campylobacter Brussels Glupczynski's modificado, y agar chocolate; los estudios confirmaron que el agar chocolate tiene la más baja tasa de aislamiento, mientras que el medio Skirrow's probó tener la más alta tasa de aislamiento y fue capaz de tener un buen crecimiento en una pequeña cantidad de inóculo<sup>(32)</sup>. En consiguiente, Herinksen et al (1995) realizó seis variantes del medio Charcoal y Skirrow para el crecimiento de *H. pylori*; las mejores variantes obtenidas fueron con sangre intacta, suero y emulsión con yema de huevo; pero el suero fue significativamente mejor que la emulsión con yema de huevo, y la adición de Isovitalex resultó en un mejoramiento en el crecimiento de *H. pylori*<sup>(12)</sup>. Cover (2012) menciona que el suero en el medio de cultivo puede ser sustituido por Beta ciclo dextrina en lugar de productos a base de sangre y la adición de emulsión de yema de huevo (EYE) ha sido descrita como un medio sin sangre para el crecimiento de *H. pylori*<sup>(6)</sup>. En continuación Hachem et al (1995) compararon medios sólidos para el primer aislamiento de *H. pylori*, de tal forma que determinaron el mejor medio para tal fin; se sembraron 22 aislamientos de *H. pylori* extraídas de pacientes infectados y conservadas en glicerol; las cepas se sembraron en los medios BHIA<sup>(12)</sup> con 7% de sangre de caballo desfibrinada, Agar yema de huevo (ELLA), agar sangre Columbia<sup>(12)</sup> –agar ciclodextrina (CBA-cd) y TSA suplementado con 5% de sangre de cordero; BHIA con 7% de sangre de

caballo probó ser el mejor y el más sensible medio para *H. pylori* para el primer aislamiento; así mismo el medio TSA 5% sangre de cordero tubo mejor resultado en comparación con EYA y CBA-cd<sup>(7)</sup>. De los primeros en realizar estudios del crecimiento de *H. pylori* suplementado solo con ciclodextrinas fue Olivieri et al (1993); las ciclodextrinas son producidas a partir del almidón, este suplemento puede ser usado para medios de cultivo primarios a partir de biopsias gástricas, medios de cultivo de rutina en el laboratorio y fermentadores a gran escala; las ciclodextrinas reducen las concentraciones de sustratos o productos a niveles mucho más bajos los cuales estos son toxinas o inhibidores del microorganismo, por ejemplo el suero bovino reduce el efecto toxico de los ácidos grasos absorbiéndolos<sup>(33)</sup>. Por otro lado Walsh & Moran (1997) evaluaron el crecimiento y la expresión de un antígeno (LPS) en *H. pylori* en medios sólidos y líquidos determinando que las Beta-ciclodextrinas no incrementan el crecimiento; y el cultivo en medio líquido incrementa la producción de LPS<sup>(34)</sup>.

Stevenson et al (2000) también realizó una comparación entre 3 medios: agar Columbia, Agar Johnson-Murano (JMA) y Agar *H. pylori* especial peptona (HPSPA), el medio HSPA probó una obvia ventaja en el tamaño de las colonias; los tres medios de cultivo sólidos no mostraron significativa diferencia con respecto a la tasa de recuperación después de 2 a 3 días(8). Haciendo un cambio en los suplementos típicos para *H. pylori*, vega et al (2003) evaluaron el crecimiento de esta bacteria suplementada con extractos de cianobacterias Los extractos de algas

y cianobacterias pueden exitosamente remplazar nutrientes en medios de cultivo; las cianobacterias filamentosas son particularmente adecuadas para la generación de una variedad de productos químicos valiosos algunos de los cuales tienen valores nutricionales tales como vitaminas, enzimas, ácidos grasos, polipéptidos, carbohidratos y proteínas. Se utilizó el medio agar Muller-Hinton (MHA) suplementado con 0,4% o 0,6% de extractos de cianobacterias *Nostoc* sp. Este medio se comparó con MHA 5% sangre de cordero y fue exitosamente cultivado; el crecimiento con extractos de cianobacterias fue similar al crecimiento con sangre de cordero en cepas aisladas de *H. pylori*; así pues el uso de este medio no requiere la edición de sangre o derivados de sangre, el uso de extractos de cianobacterias reduce los costos como medio de cultivo para *H. pylori*<sup>(18)</sup>; de la misma forma, Tasterman et al (2006) descubren que el medio Ham's F-12 (F-12) utilizado comúnmente para el cultivo de tejidos, provee el crecimiento adecuado de *H. pylori* en ausencia de suero o proteínas; los estudios indicaron que el hierro es una limitante para el crecimiento de *H. pylori*, es decir que el incremento de este metal, mejora el crecimiento del microorganismo; El incremento de todos los aminoácidos o de al menos un aminoácido, triptófano, isoleucina, glutamato o glutamina por encima de los niveles encontrados en el medio F-12 no mejoraron el crecimiento de *H. pylori*, por lo que estos aminoácidos no son una limitante para el crecimiento. El medio F-12 usado en este estudio no presentó glucosa y aunque también se realizó con presencia de glucosa, no se observó beneficios o un mejor crecimiento, lo que confirma que

*H. pylori* prefiere los aminoácidos que los azúcares como fuente de carbono, también menciona que *Helicobacter* spp incorpora colesterol en el interior de las membranas, surge la hipótesis de que el colesterol puede tomar el lugar del suero en el interior de la membrana dándole la susceptibilidad especialmente a polimixina B<sup>(15)</sup>; Otro nuevo suplemento fue añadido para el crecimiento de la bacteria, Hutton et al (2012) utilizaron AlbuMaX II como una alternativa de la sangre y el suero para *H. pylori*. *H. pylori* sobre medios de cultivo sólido y líquido fue examinado comparando el crecimiento con los suplementos sangre de caballo, suero fetal bovino, B-ciclodextrina o AlbuMAX II. Los resultados aseguran que el crecimiento del microorganismos en los medios con sangre y suero es similar o mayor con AlbuMAX II, incluso con medios que contenían B-Ciclodextrina<sup>(20)</sup>. Las nuevas invenciones han llevado al cultivo por microcapilaridad, Allahverdiyev et al (2015) utilizó el método de cultivo por microcapilaridad para el aislamiento y diagnóstico de *H. pylori*, resultó en un método eficiente, rápido y de buena detección en comparación con el cultivo clásico<sup>(35)</sup>. La preparación de medios de cultivo divididos en 2 secciones también han sido referenciados por Ding et al (2001); *H. pylori* puede ser recuperado por muchos tipos de medios de cultivo pero en ocasiones no puede ser detectado eficientemente; se evaluaron 12 variantes de medios de cultivo y los de mayor tasa de detección fueron agar chocolate con 1% de IsoVitaleX mientras que la otra sección agar chocolate, 1% de IsoVitaleX y 1% de antibióticos<sup>(36)</sup> La mayoría de los cultivos formulados con anterioridad son para una recuperación exitosa de *H. pylori* extraído

de biopsias fecales; Kabir (2001) explica la extracción de *H. pylori* en heces fecales y su detección por cultivo; las ventajas que trae este proceso es la máxima especificidad, fácil identificación y preparación en los laboratorios, permite la tipificación del aislamiento y la posibilidad de realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; mientras que las limitaciones se encuentran en que es difícil cultivarla de heces fecales, limitada información sobre la forma y la viabilidad de *H. pylori* en heces y retrasos en el resultado<sup>(37)</sup>.

### Medios de cultivo líquidos

Entre los caldos utilizados para el cultivo de *H. pylori* se cita caldo infusión cerebro corazón (BHIB), caldo Mueller-Hinton (MHB), Caldo Brucella (BB)<sup>(13)</sup> caldo triptacasa soya (TSB) y caldo Columbia (CB)<sup>(38)</sup>. De los primeros en sugerir el crecimiento exitoso de *H. pylori* en medio líquido fueron Morgan et al (1987), explican que el cultivo en caldo depende de la apropiada dispersión de gases; 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub> probó ser las condiciones atmosféricas adecuadas para el crecimiento del microorganismo suplementado son sangre<sup>(39)</sup>. Kangatharalingam & Amy (1994) usaron el medio BB modificado para el estudio del crecimiento de *H. pylori* variando el pH (de 4.0 a 8.0) y la presión de oxígeno para así determinar el efecto de la urea que tiene en el pH del medio de cultivo; el caldo comercial brucella fue modificado añadiendo las sales fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Fosfato monoácido de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>), y nitrapirina; nitrapirina junto con NH<sub>4</sub><sup>+</sup> induce al crecimiento rápido de muchas bacterias; confirmaron que el

medio caldo Brucella modificado produjo un crecimiento excelente de *H. pylori* comparado con el producido por el caldo comercial Brucella, incrementando el crecimiento en un 50%. El pH del medio permanece estable sin y con urea. El rango de pH y la presión de oxígeno para un excelente crecimiento fue de 5 a 6 con un pico de 5.5, y entre 2.0 a 10.0 (+/-1.0) kPa respectivamente<sup>(13)</sup>. Con respecto al caldo Muller-Hinton, Coudron & Stratton (1995) evaluaron el crecimiento de *H. pylori*; el caldo se utilizó con ajuste de cationes (Cation-adjusted Muller-Hinton, CAMHB) suplementado con almidón, sangre de cordero o sangre de cordero barnizada; se observó que todas las cepas evaluadas, su crecimiento fue inhibido cuando se le añadía ambas sangres al caldo; así mismo se evaluó éste caldo añadiendo almidón, bismuto y caldo suplementado con suero fetal bovino (FCS o SFB) con una cepa clínica y una ATCC 43504; concluyeron que el *H. pylori* crece en almidón, aunque el crecimiento con suero fetal Bovino (SFB) fue mucho mejor. Así mismo el bismuto inhibió el crecimiento de *H. pylori* a las 24 horas; se sugirió que el grupo hemo en caldo no era necesario para el crecimiento de *H. pylori*, además que el papel de ciertos suplementos puede deberse a que en realidad sirven para absorber o inactivar factores tóxicos como el caso del agar que sirve como medio de desintoxicación de toxinas relacionadas con el crecimiento<sup>(16)</sup>. En continuación, con respecto al caldo brucella (BBL) Deshpande et al (1995) desarrollaron un procedimiento a gran escala para el cultivo de *H. pylori* ATCC 436229 en matraces y fermentadores; el preinoculo se realizó conteniendo 200 mL de BBL (Caldo brucella) y 5% de suero

fetal bovino; el fermentador equipado con un volumen de 15 litros, contuvo BBL esterilizada, el recipiente fue rociado con aire, para calibrar el oxígeno disuelto a unas condiciones microaerofílicas de gas 6% O<sub>2</sub>, fue suplementado con 5% de suero fetal bovino, se añadió los antibióticos vancomicina (5mg/L) ácido nalidixico (10mg/L) y una suspensión de nistatina (10000U/L), el fermentador constaba de agitador y control de pH; el inoculo usado fue de 10 L. concluyeron que la tasa de crecimiento obtenida por este sistema se encontró entre las más altas tasas de crecimiento reportadas por este microorganismo<sup>(17)</sup>. Stevenson et al (2000) resaltan que los medios MHB, BHI y caldo especial peptona no presentan diferencias significativas en el crecimiento de la bacteria<sup>(8)</sup>. Con respecto al caldo BHI Jiang & Doyle (2000) compararon el efecto de tres suplementos en el crecimiento de *H. pylori*: Sulfato ferroso, piruvato de sodio y mucina; tanto el sulfato ferroso como el piruvato se someten a reacciones oxidativas bajo condiciones fisiológicas en las células vivas; estas mismas condiciones se perciben al comparar la combinación de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (FBP) para el mejoramiento en el crecimiento de *Campylobacter* spp. La mucina una glicoproteína de alto peso molecular es el principal constituyente de la mucosa en el cual *H. pylori* yace naturalmente in vivo; la combinación de piruvato de potasio y sulfato ferroso (FP) y mucina, ambos reducen la fase lag y mejoran el crecimiento de *H. pylori* en medio líquido<sup>(19)</sup>. Para la recuperación de la bacteria, Richards et al (2011) elabora el caldo R (Regrowth Broth) que consiste en Caldo Brucella, Hepes, CuSo<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>,

piruvato de sodio, sangre humana y sangre humana lisada. Este medio resultó en una buena recuperación para el crecimiento de *H. pylori* por lo tanto, fue adaptado en condiciones selectivas y diferenciales de forma inclinada, un medio optimizado para la “resucitación” de *H. pylori* aplicado a células no cultivables ha sido desarrollado<sup>(10)</sup>. también se menciona el uso del medio Ham’s F-12 en estado líquido comparándolo con Caldo BHI y brucella suplementado con suero<sup>(40)</sup> <sup>(41)</sup>; explican también que la formación de biofilm y la expresión del gen *luxS* incrementa con la concentración mínima inhibitoria de claritromicina y amoxicilina<sup>(40)</sup>; también Young et al (2000) utiliza el caldo BHI suplementado con 5% de sangre de caballo desfibrinado con el objetivo de cuantificar (UFC/mL) la carga de *H. pylori* presente en el jugo gástrico capaz de transmitirse<sup>(42)</sup>.

## RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La resistencia puede ocurrir con todas las cepas o aislamientos de una especie dada y es llamada resistencia natural o resistencia intrínseca. *H. pylori* tiene una resistencia natural a los agentes antimicrobianos: glicopeptidos (vancomicina), sulfonamidas, 2,4-diaminopirimidina: trimetoprim, primera generación de quinolonas,  $\beta$  lactámicos (cefsulodín), polimixinas, componentes antifúngicos. En estos casos la resistencia se logra mediante la genética de la bacteria (Resistencia cromosómica); además las especies bacterianas que son usualmente susceptibles pueden desarrollar resistencia a un antibiótico dado, esto es llamado resistencia adquirida<sup>(43)</sup>.

## Macrolidos

Entre los macrolidos disponibles, solo claritromicina es extensamente utilizada por su bajo MICs (Concentración mínima inhibitoria) (MICs incrementa moderadamente con el decrecimiento del pH); la claritromicina contiene 14 carbonos en su anillo a diferencia de la azithromicina, y josamisina que contienen 15 carbonos y 16 carbonos respectivamente. Los macrolidos actúan uniéndose a los ribosomas 23 rRNA; el cambio en una sola base en los genes rRNA 23S de *H. pylori* ha sido asociado con la resistencia a macrolidos<sup>(43)</sup>. Occhialini et al (1997) mencionan una mutación en A→G en la posición 2143 o 2144, y una mutación en A →C en la posición 2143 en aislamientos de *H. pylori* en Estados Unidos<sup>(44)</sup>. La sustitución de una base causa el decrecimiento de la afinidad de los ribosomas por los macrólidos; la sustitución de A → G/C en la posición 2142 ha sido relacionada con la más alta resistencia a macrólidos; mientras que A→G en la posición 2143 ha sido relacionada con alto nivel de resistencia a eritromicina<sup>(45)</sup>.

## Nitroimidazoles

Dentro de los nitroimidazoles, metronidazol y tinidazol son utilizados para tratar *H. pylori*; metronidazol penetra a través de la bacteria y luego el grupo nitro del anillo imidazol es reducido para formar un derivado hidroxilamina; el producto reducido causa daño al ADN y por lo tanto la muerte celular. En teoría, cualquier proteína que posee un bajo potencial redox puede aceptar electrones del metronidazol

y tinidazol y así activar ésta droga. En bacterias y protozoarios en condiciones anaeróbicas la resistencia por metronidazol es mediada por una reducida y escasa actividad de un aceptor de electrones, especialmente piruvato, ferredoxina, oxidoreductasa y ferredoxina. En *H. pylori* varios aceptores de electrones han sido identificados incluyen ferredoxina (FdxB) NAD(P)H Flavín nitroreductasa (FrxA), Oxidoreductasa 2- oxoglutarato (OorD), piruvato: oxidoreductasa ferredoxin (PorD), y oxígeno-insesitivo NAD (P) H nitroreductasa (*RdxA*). Estos factores no permiten una correcta activación del fármaco<sup>(45)</sup>. Aldana et al (2005) estudiaron el rol de los genes *rdxA* y *frxA* en la resistencia de *H. pylori*; encontraron que cepas con alta resistencia a metronidazol contenían una mutación simple en el gen *frxA* pero ningún cambio se presentaba en el gen *rdxA*. Así mismo cepas con moderada resistencia presentaban mutación tanto en el gen *frxA* como en el *rdxA*, una mutación múltiple y única respectivamente; finalmente los bajos niveles de resistencia se debieron a una única mutación en el gen *frxA* y ninguna mutación en el gen *rdxA*. En este estudio la resistencia a metronidazol estuvo asociada principalmente a la mutación en el gen *frxA*, sugiriendo la posibilidad que la inactivación de este gen podría originar la resistencia a metronidazol. Así mismo Marais et al (2003) determinaron las mutaciones de la resistencia a metronidazol de las cepas J99 y 26695, y 9 aislamientos de biopsias gástricas, encontrándose mutación en *rdxA* sin sentido (N141stop), con desplazamiento del marco de lectura (N73stop) y cambio de sentido (S81L, T31E, R90K, A108S y R16C; así mismo para *FrxA* se encontró desplazamiento en

el marco de lectura (L74stop, L39Sstop) y cambio de sentido (N111H, M126I, N129T, S130D)<sup>(47)</sup>.

### **Fluoroquinolonas**

La resistencia a fluoroquinolonas no es un problema para la primera generación de quinolonas tales como ácido nalidixico donde *H. pylori* posee una resistencia natural contra este agente. Las fluoroquinolonas inhiben la ADN girasa y las topoisomerasas interfiriendo en la replicación del ADN. La principal función de la ADN girasa es relajar la superhelice de DNA para permitir la replicación. La resistencia a fluoquinolonas es asociada con mutaciones en el gen *gyrA* en *E.coli* y también en otras bacterias. Se ha estudiado la resistencia de ciprofloxacina en *H. pylori*, 11 de 12 cepas estudiadas habían presentado mutación en los fragmentos de ADN sugiriendo la alteración de la girasa por lo cual es la primer causa de resistencia de *H.pylori*. Cuatro tipos de mutaciones fueron encontrados en los aminoácidos en la posición 87,88, 91 y 97<sup>(45)</sup>.

### **Tetraciclinas**

Las tetraciclinas, actúan como bacteriostáticos que se unen a el rRNA 16S, interfiriendo en la fijación aminoacil-ARN al ribosoma, resultando en la inhibición de síntesis de proteínas y por ende el crecimiento bacteriano; en muchas bacterias la resistencia a tetraciclina es mediada por una sobreexpresión de proteínas de eflujo o cambios en las proteínas de protección a ribosomas; sin embargo en *H. pylori* no hay indicaciones que la resistencia se ha mediada por alguno de estos dos procesos.

El principal mecanismo de resistencia a tetraciclina en *H. pylori* está basado en una sustitución simple, doble triple en el rARN 16S; altas concentraciones de tetraciclina, están relacionadas con una resistencia a un cambio en AGA→TTC en la posición 926-928 en el rRNA 16S del gen; así mismo, bajos niveles de tetraciclina (MIC < 4mg/L) la resistencia está asociada con una sustitución simple o doble en la misma área en las posiciones 56 y 114-116<sup>(45)</sup>.

*H. pylori* tiene una resistencia natural a trimetoprim debido a que esta bacteria carece del gen *FolA* que codifica para dihidrofolato reductasa de tal forma que no ofrecen ningún blanco para el antifolato. Trimetoprim inhibe la enzima dihidrofolato reductasa; esta enzima es esencial para la conversión del ácido dihidrofolico a ácido tetrahidrofolico, por tanto la inhibición de ésta enzima puede disminuir las reservas del compuesto folato, esencial cofactor en la síntesis de purinas y por ende del ADN. En *H. pylori*, la síntesis de este compuesto está dada por el gen *thyX*, que provee una vía alternativa a la del gen *FolA*<sup>(45)</sup>. En un estudio realizado por Vasquez et al (1996) determinaron las MICs (Concentraciones mínimas inhibitorias) de tetraciclina, claritromicina y metronidazol en aislamientos de *H. pylori* de pacientes dispépticos que no habían recibido ninguna terapia antimicrobiana; encontraron que el 61% de los aislamientos fueron resistentes a metronidazol y el 50% fueron resistentes a claritromicina mientras que ningún aislamiento fue resistente a tetraciclina<sup>(48)</sup>.

### **Betalactámicos**

Dentro de los Betalactámicos ( $\beta$ -lactámicos), amoxicilina es la única utilizada para

tratar la infección por *H. pylori*, esto es debido a su bajo MIC contra esta bacteria, usualmente de <0,03/ml; aunque se ha encontrado aislamientos y cepas in vitro donde concentraciones de MIC de 0,25 a 0,5  $\mu$ g/mL alguna que otra resistencia individual es encontrada. La resistencia a betalactámicos por bacterias Gram negativas suele ser más común debido a la producción de betalactamasa, codificada de manera cromosómica aunque más comúnmente por la adquisición de plásmidos. En *H. pylori* la resistencia a amoxicilina no es atribuida a la adquisición o expresión de una betalactamasa<sup>(2)</sup>. Gerrits et al (2002) presentaron un estudio en el que señalan que la resistencia a betalactámicos resulta de la sustitución de un único aminoácido en HP0597 de la proteína de unión a penicilina 1A, los resultados de este estudio explican que una única sustitución de una serina por una arginina en la posición 414 en la PBP1A induce a una alta resistencia en amoxicilina<sup>(49)</sup>. Por otro lado Paul et al (2001) compararon la resistencia putativa y la resistencia obtenida in vitro de *H. pylori* frente a metronidazol y amoxicilina; encontraron que en el gen *Pbp1* de las cepas putativas, la proteína presentaba un cambio de 414S→R, 484Y→C, 541T→I, 600P→T, mientras que en las cepas que obtuvieron resistencia in vitro se presentaron los siguientes cambios de la proteína del gen *pbp1*: 484Y→C, 541T→I, 600P→T<sup>(50)</sup>.

### **CONCLUSIONES**

*H. pylori* es una bacteria difícil de cultivar debido a que requiere consideraciones especiales como las condiciones de transporte, medio de cultivo y condiciones de incubación para una recuperación exitosa del microorganismo. La fuente más fácil para

su cultivo son las biopsias gástricas aunque también se han sugerido las heces fecales, saliva, entre otros. Los cultivos primarios se preparan con un medio basal como agar Columbia, TSA, BHIA, agar Skirrow's, F-12 y entre otros, siempre suplementados con sangre, suero, ciclo dextrinas, almidón, IsoVitaleX, AlbumaX II o sales; la adición de antibióticos es fundamental para eliminar microorganismos interferentes con los que se puede contaminar la biopsia gástrica durante la toma de muestra como la cavidad oral o el ambiente; así mismo el sub-cultivo debe realizarse en un medio no selectivo con los suplementos adecuados. Las condiciones de incubación adecuadas apuntan a unos 37°C por siete días bajo condiciones de microaerofilia; finalmente es importante diferenciar entre una forma cocoide que puede ser cultivable y una forma cocoide viable pero no cultivable.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ndip, R.N., et al., *Culturing Helicobacter pylori from clinical specimens: review of microbiologic methods*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003. 36(5): p. 616-22.
2. Mobley, H.L.T., G.L. Mendz, and S.L. Hazell, in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.L.T. Mobley, G.L. Mendz, and S.L. Hazell, Editors. 2001: Washington (DC).
3. Banks, L., et al., *Helicobacter Pylori*, in *Biological agents*. 2012, International Agency for Research on Cancer: France.
4. Owen, R.J., *Bacteriology of Helicobacter pylori*. Baillieres Clin Gastroenterol, 1995. 9(3): p. 415-46.
5. Xia, H.X., et al., *Transportation of Helicobacter pylori cultures by optimal systems*. J Clin Microbiol, 1994. 32(12): p. 3075-7.
6. Cover, T.L., *Perspectives on methodology for in vitro culture of Helicobacter pylori*. Methods Mol Biol, 2012. 921: p. 11-5.
7. 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.
8. Stevenson, T.H., et al., *Growth of Helicobacter pylori in various liquid and plating media*. Lett Appl Microbiol, 2000. 30(3): p. 192-6.
9. Westblom, T.U., E. Madan, and B.R. Midkiff, *Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol, 1991. 29(4): p. 819-21.
10. Richards, C.L., et al., *Optimizing the growth of stressed Helicobacter pylori*. J Microbiol Methods, 2011. 84(2): p. 174-82.
11. Dent, J.C. and C.A. McNulty, *Evaluation of a new selective medium for Campylobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1988. 7(4): p. 555-8.
12. Henriksen, T.H., et al., *Rapid growth of Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1995. 14(11): p. 1008-11.

13. Kangatharalingam, N. and P.S. Amy, *Helicobacter pylori* comb. nov. Exhibits Facultative Acidophilism and Obligate Microaerophilism. Appl Environ Microbiol, 1994. 60(6): p. 2176-9.
14. Xu, J., S.J. Czinn, and T.G. Blanchard, Maintenance of *Helicobacter pylori* cultures in agar slabs. Helicobacter, 2010. 15(5): p. 477-80.
15. Testerman, T.L., et al., Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. J Clin Microbiol, 2006. 44(5): p. 1650-8.
16. Coudron, P.E. and C.W. Stratton, Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. J Clin Microbiol, 1995. 33(4): p. 1028-30.
17. Deshpande, M., E. Calenoff, and L. Daniels, Rapid large-scale growth of *Helicobacter pylori* in flasks and fermentors. Appl Environ Microbiol, 1995. 61(6): p. 2431-5.
18. Vega, A.E., et al., Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with cyanobacterial extract. J Clin Microbiol, 2003. 41(12): p. 5384-8.
19. Jiang, X. and M.P. Doyle, Growth supplements for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol, 2000. 38(5): p. 1984-7.
20. Hutton, M.L., M. Kaparakis-Liaskos, and R.L. Ferrero, The use of AlbuMAX II((R)) as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. Helicobacter, 2012. 17(1): p. 68-76.
21. Joo, J.S., et al., A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. Helicobacter, 2010. 15(4): p. 295-302.
22. Catrenich, C.E. and K.M. Makin, Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. Scand J Gastroenterol Suppl, 1991. 181: p. 58-64.
23. Dus, I., et al., Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research--new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2013. 67: p. 261-8.
24. Yamaguchi, H., et al., Colony formation by *Helicobacter pylori* after long-term incubation under anaerobic conditions. FEMS Microbiol Lett, 1999. 175(1): p. 107-11.
25. Siavoshi, F., et al., Mucooid *Helicobacter pylori* isolates with fast growth under microaerobic and aerobic conditions. Helicobacter, 2012. 17(1): p. 62-7.
26. Vega, A.E., H.J. Silva, and T.I. Cortinas, Evaluation of a serum-free transport medium supplemented with cyanobacterial extract, for the optimal survival of *Helicobacter pylori* from biopsy samples and strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. 31(2): p. 135-9.

27. Veenendaal, R.A., et al., *Effect of transport medium and transportation time on culture of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens*. J Clin Pathol, 1993. 46(6): p. 561-3.
28. Siu, L.K., et al., *Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol, 1998. 36(10): p. 3048-50.
29. Cellini, L., et al., *New transport medium for cultural recovery of Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol, 2014. 52(12): p. 4325-9.
30. Goodwin, C.S., et al., *Evaluation of cultural techniques for isolating Campylobacter pyloridis from endoscopic biopsies of gastric mucosa*. J Clin Pathol, 1985. 38(10): p. 1127-31.
31. Krajden, S., et al., *Comparison of selective and nonselective media for recovery of Campylobacter pylori from antral biopsies*. J Clin Microbiol, 1987. 25(6): p. 1117-8.
32. Tee, W., et al., *Comparative evaluation of three selective media and a nonselective medium for the culture of Helicobacter pylori from gastric biopsies*. J Clin Microbiol, 1991. 29(11): p. 2587-9.
33. Olivieri, R., et al., *Growth of Helicobacter pylori in media containing cyclodextrins*. J Clin Microbiol, 1993. 31(1): p. 160-2.
34. Walsh, E.J. and A.P. Moran, *Influence of medium composition on the growth and antigen expression of Helicobacter pylori*. J Appl Microbiol, 1997. 83(1): p. 67-75.
35. Allahverdiyev, A.M., et al., *Isolation and diagnosis of Helicobacter pylori by a new method: microcapillary culture*. World J Gastroenterol, 2015. 21(9): p. 2622-8.
36. Ding, H.J., et al., *An efficient method for the culture of Helicobacter pylori from gastric biopsies with two-section petri dishes*. J Gastroenterol, 2001. 36(4): p. 237-41.
37. Kabir, S., *Detection of Helicobacter pylori in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay*. J Med Microbiol, 2001. 50(12): p. 1021-9.
38. Shahamat, M., et al., *Evaluation of liquid media for growth of Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol, 1991. 29(12): p. 2835-7.
39. Morgan, D.R., et al., *Growth of Campylobacter pylori in liquid media*. J Clin Microbiol, 1987. 25(11): p. 2123-5.
40. Bessa, L.J., et al., *Helicobacter pylori free-living and biofilm modes of growth: behavior in response to different culture media*. APMIS, 2013. 121(6): p. 549-60.
41. Sainsus, N., et al., *Liquid culture medium for the rapid cultivation of Helicobacter pylori from biopsy specimens*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. 27(12): p.

- 1209-17.
42. Young, K.A., et al., *Quantitative culture of Helicobacter pylori from gastric juice: the potential for transmission*. J Med Microbiol, 2000. 49(4): p. 343-7.
43. Megraud, F., *Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics*. Alimentary pharmacology and Therapeutics, 1997. 11(1): p. 43-53.
44. Occhialini, A., et al., *Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. 41(12): p. 2724-8.
45. Gerrits, M.M., et al., *Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications*. Lancet Infect Dis, 2006. 6(11): p. 699-709.
46. Aldana, L.P., et al., *In vitro induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in rdxA and frxA genes from Helicobacter pylori isolates*. J Infect Chemother, 2005. 11(2): p. 59-63.
47. Marais, A., et al., *Characterization of the genes rdxA and frxA involved in metronidazole resistance in Helicobacter pylori*. Res Microbiol, 2003. 154(2): p. 137-44.
48. Vasquez, A., et al., *Metronidazole and clarithromycin resistance in Helicobacter pylori determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format*. J Clin Microbiol, 1996. 34(5): p. 1232-4.
49. Gerrits, M.M., et al., *Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(7): p. 2229-33.
50. Paul, R., et al., *Mutations of the Helicobacter pylori genes rdxA and pbp1 cause resistance against metronidazole and amoxicillin*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(3): p. 962-5.