

Universidad	UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA
Programa Académico	MICROBIOLOGÍA
Nombre del Semillero	MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL
Nombre del Grupo de Investigación (si aplica)	MICROBIOTEC
Línea de Investigación (si aplica)	PATOGENOS DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL
Nombre del Tutor del Semillero	ADALUCY ALVAREZ ALDANA
Email Tutor	aalvarez@unilibrepereira.edu.co
Título del Proyecto	comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de <i>helicobacter pylori</i>
Autores del Proyecto	ADALUCY ALVAREZ ALDANA. JOSE IGNACIO MONCAYO ORTIZ. JORGE JAVIER SANTACRUZ IBARRA, YINA MARCELA GUACA GONZALES. JULIANA BOTERO. MIGUEL ANGEL CARDONA.
Ponente (1)	MIGUEL ANGEL CARDONA
Documento de Identidad	1088326315
Email	mcardona.microbiologia@unilibrepereira.edu.co
Ponente (2)	JULIANA BOTERO
Documento de Identidad	1088329995
Email	jbotero.microbiologia@unilibrepereira.edu.co
Teléfonos de Contacto	3148141454
Nivel de formación de los estudiantes ponentes	ESTUDIANTES DE VIII SEMESTRE
<b>MODALIDAD</b>	<b>PÓSTER</b>
<b>Área de la investigación (seleccionar una- Marque con una x)</b>	• Propuesta de Investigación
	• Ciencias Naturales
	• Ingenierías y Tecnologías
	• Ciencias Médicas y de la Salud X
	• Ciencias Agrícolas
	• Ciencias Sociales
	• Humanidades
• Artes, arquitectura y diseño	

# Comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *Helicobacter pylori*

ADALUCY ALVAREZ ALDANA<sup>1</sup>. JOSE IGNACIO MONCAYO ORTIZ<sup>2</sup>. JORGE JAVIER SANTACRUZ IBARRA<sup>2</sup>. JULIANA BOTERO<sup>3</sup>. MIGUEL ANGEL CARDONA<sup>3</sup>. YINA MARCELA GUACA GONZALES<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Docente Programa de Microbiología Universidad Libre Seccional Pereira.

<sup>2</sup> Docentes Programa de Medicina Universidad Tecnológica de Pereira

<sup>3</sup> Estudiantes VIII Semestre Programa de Microbiología Universidad Libre Seccional Pereira.

**Resumen:** *Helicobacter pylori* es responsable de patologías gastroduodenales. Es complicado de cultivar debido a que requiere condiciones de microaerofilia y medios enriquecidos. La importancia de cultivarla radica en la capacidad de conocer su diversidad genética, la resistencia tanto fenotípica como genotípica a los antibióticos usados en el tratamiento y la detección en pacientes *H. pylori* positivos. La posibilidad de recuperar un banco de aislamientos de 10 años conservados a -80°C permitiría realizar todos estos tipos de investigaciones. El presente proyecto tiene como objetivo comparar diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *H. pylori*. Estos se inocularán en 3 medios de cultivo enriquecidos A, B, y C para encontrar el medio que permita mayor recuperación.

**Palabras claves:** Banco de aislamientos, cultivo, *Helicobacter pylori*, recuperación.

**Problema de investigación:** *Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo capaz de colonizar el estómago humano, más del 50% de la población mundial está infectada; se calcula que de cada 10 personas infectadas por este microorganismo, solo una sufre enfermedad y nueve nunca la desarrollan. La infección por *Helicobacter pylori* es asociada con la presentación de úlceras pépticas y con el desarrollo de un tipo especial de linfoma gástrico, de igual manera participa en el desarrollo del cáncer gástrico. La organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado ha dicho patógeno como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) donde la incidencia más alta se encuentra en países en vía de desarrollo y parece estar relacionada con condiciones económicas e higiénico-sanitarias desfavorables (Bayona, 2013), por tal motivo es un microorganismo de interés en salud pública.

*Helicobacter pylori* tiene un crecimiento lento y es complicado de cultivar debido a que requiere condiciones de microaerofilia, medios complejos y enriquecidos para su crecimiento. No se ha logrado obtener la formulación de un medio económico y de alta productividad para *H. pylori*; (Ndip et al., 2003). La utilidad e importancia del cultivo para *H. pylori* está relacionada con poder conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología y la posibilidad de determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos usados en el tratamiento; también el cultivo de *H. pylori* es fundamental para la recuperación y mantenimiento de cepas conservadas a -80°C por largos periodos de tiempo.

Debido entonces a la necesidad de cultivar este microorganismo de manera eficiente, se requiere un medio de cultivo ideal que logre la recuperación del microorganismo y el mantenimiento de la viabilidad de los bancos de aislamientos que permita seguir estudiándolos a través del tiempo.

### Referente Teórico:

*Helicobacter pylori* es una bacteria heterogénea con gran diversidad genómica; en adición los humanos pueden albergar múltiples cepas y *H. pylori* puede cambiar genotípicamente y fenotípicamente durante la colonización en el huésped. La presencia de una bacteria en forma de espiral en la mucosa gástrica de los humanos fue reconocida hace más de 100 años, originalmente llamada *Campylobacter pylori*. En 1989 un nuevo género fue propuesto renombrándola *Helicobacter pylori*. Actualmente se clasifica taxonómicamente en el dominio Bacteria, filo Proteobacteria, subfilo delta/épsilon subdivisiones, clase Epsilonproteobacteria, orden Campylobacteriales, Familia Helicobacteraceae y género *Helicobacter*. El microorganismo se parece al género *Campylobacter* en muchos aspectos, morfología curvada, crecimiento en medios enriquecidos bajo condiciones de microaerofilia, incapacidad de fermentar glucosa, sensibilidad a metronidazol y un contenido de G+C DE 34%, así pues fue primero referido como *Campylobacter pylori*. Micrografías electrónicas mostraron múltiples flagelos en un polo de la bacteria, en contraste a un único flagelo bipolar típico de *Campylobacter* spp. Las principales bandas de ácidos grasos y proteínas de *C.pylori* estaban marcadas diferentes de las especies de *Campylobacter*. Subsecuente, análisis de la secuencia 16S rRNA mostraron que la distancia entre *C.pylori* y las especies verdaderas *Campylobacter* fue suficiente para excluirla y fue renombrada *Helicobacter pylori* el primer miembro de este género.

*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 (Banks, Carbone, Blum, & Cesarman, 2012; Owen, 1995). 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 (Owen, 1995).

Las especies de *Helicobacter* son Quimiorganotrofos y muestran un tipo de respiración metabólica, son incapaces de utilizar los carbohidratos como energía (ni en la oxidación o fermentación) aunque recientes estudios indican que *H. pylori* es capaz de oxidar la glucosa. La vía de la glucolisis-gluconeogenesis probablemente compromete los principales medios de producción de energía como también los puntos de inicio de muchas vías de biosíntesis. La vía Entner-Doudoroff, derivada de las pentosa fosfato y el ácido tricarbóxico están al menos parcialmente presentes. La gelatina, el almidón, caseína y tirosina no son hidrolizadas. Las especies de *Helicobacter* son rojo de metileno y Voges-Proskauer negativas. Actividad oxidasa está presente en todas las especies y la mayoría de las especies produce catalasa. Muchas especies producen ureasa, alcalina fosfatasa o ambas. No presentan producción de pigmentos. (H. L. T. Mobley, Mendz, & Hazell, 2001)

La pared celular es lisa, puede estar cubierta con un prominente glicocalix con un espesor de 40 nm; ocasionalmente la bacteria puede contener bacteriófagos. Los flagelos miden 2,5 µm de largo y 30 nm de espesor teniendo un distintivo bulbo terminal; exhibe una remarcable motilidad en soluciones viscosas y los flagelos juegan el papel central en la motilidad. *Helicobacter pylori* también puede adoptar forma cocoide.

Las células blanco de *H. pylori* son la mucosa gástrica; vive principalmente en la superficie de la mucosa (Humans, 2010) 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 en la culturabilidad (Owen, 1995).

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 microaeróbicas 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 (Catrenich & Makin, 1991); 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 pycnosis, 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 (Dus et al., 2013)

Se han señalado diferentes composiciones para una atmósfera microaerófila 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. (Ndip et al., 2003). 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> (Xu et al., 2010). 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 (Yamaguchi, Osaki, Takahashi, Taguchi, & Kamiya, 1999). Así mismo, Siavoshi et al (2012) expone que *H. pylori* es microaerófila y cambia a forma cocoide cuando se expone a condiciones aeróbicas; el estudio presenta un crecimiento equidistante entre las condiciones microaeróbicas 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 (Siavoshi et al., 2012)

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 de caballo, extracto de levadura, y dimetil-beta ciclodextrina (Joo et al., 2010). Así mismo Jiang et al 2000 evaluaron el crecimiento de *Helicobacter 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 (Jiang & Doyle, 2000). Vega et al determinó el tiempo de generación de *H. pylori* NCTC 11638; en medio suplementado con suero fetal bovino fue de 3.3 horas y con extracto de levadura fue de 3.5 horas.

García-Rodríguez et al (1989) probaron aislamientos de *H. pylori* con 16 antimicrobianos (ampicilina, cefazolina, cefuroxima, cefotaxima, imipenem, aztreonam, tigemonam, eritromicina, vancomicina, ácido nalidíxico, colistina, norfloxacin, ciprofloxacina, difloxacina, ofloxacina and pefloxacina). Los antimicrobianos que mostraron su más alta actividad fueron ampicilina, imipenem y ciprofloxacina seguido por cefazolina, cefuroxima, cefotaxima, aztreonam, tigemonam, eritromicina y difloxacina. El ácido nalidíxico, colistina y vancomicina fueron inefectivos contra *H. pylori* (García-Rodríguez, García-García, García-Sánchez, García-Sánchez, & Muñoz Bellido, 1989)

Los mecanismos de resistencia que las bacterias utilizan para los antibióticos son variados; hay 4 principales mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos. Por ejemplo la carencia de penetración parece que ocurre en todos los compuestos pero el nivel de resistencia alcanzado es

usualmente bajo y el aumento de la dosis puede superar esta resistencia. El segundo mecanismo de resistencia es la inactivación enzimática de los antibióticos ocurre principalmente con los  $\beta$ lactámicos y aminoglucósidos por ejemplo ciertas bacterias pueden producir enzimas extracelulares capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ lactámico antes de que los compuestos ingresen a la pared celular bacteriana. El tercer mecanismo de resistencia, modificación del blanco es el principal mecanismo de resistencia de *H. pylori* frente a macrólidos y quinolonas (Megraud, 1997).

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: glicopéptidos (vancomicina), sulfonamidas, 2,4-diaminopirimidina: trimetropin, primera generación de quinolonas,  $\beta$  lactámicos (cefsulodin), polimixinas, componentes antifúngicos. En estos casos la resistencia se logra mediante la genética de la bacteria (Resistencia cromosómica); además las especies bacterias que son usualmente susceptibles pueden desarrollar resistencia a un antibiótico dado, esto es llamado resistencia adquirida. Las cepas o aislamientos pueden llegar a ser resistentes por dos diferentes mecanismos genéticos: mutación en los genes cromosomales o adquisición de ADN exógeno, principalmente plásmidos. El mecanismo esencial genético de *H. pylori* parece ser mutación cromosómica (Megraud, 1997).

Entre los macrólidos disponibles, solo claritromicina es extensamente utilizada, la claritromicina contiene 14 carbonos en su anillo a diferencia de la eritromicina, y josamicina que contienen 15 carbonos y 16 carbonos respectivamente. Los macrólidos actúan uniéndose a los ribosomas 23S rRNA. El cambio en una sola base en los genes rRNA 23S de *H. pylori* ha sido asociado con la resistencia a macrólidos (Megraud, 1997). La resistencia a macrólidos es debido a varios mecanismos, que incluye la falta de unión de los macrólidos al sitio blanco, inactivación de macrólidos por enzimas, impermeabilidad de la membrana bacteriana y eflujo activo. Este último mecanismo es aparentemente de importancia en *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*. La modificación del blanco usualmente envuelve una modificación post-transcripcional o una mutación situada en el dominio peptidiltransferasa (dominio V) del rRNA 23S (Megraud, 1997). Occhialini et al (1997) mencionan una mutación en A $\rightarrow$ G en la posición 2143 o 2144 en aislamientos de *H. pylori* en Estados Unidos; así mismo realizaron un estudio y encontraron que todas las cepas resistentes tenían una mutación puntual en la posición 2143 y 2144 la mutación fue A $\rightarrow$ G en todos los casos excepto uno que fue A  $\rightarrow$ C en la posición 2143 (Occhialini et al., 1997). La sustitución de una base causa el decrecimiento de la afinidad de los ribosomas por los macrólidos; la sustitución de A  $\rightarrow$  G/C en la posición 2142 ha sido relacionada con la más alta resistencia a macrólidos; mientras que A $\rightarrow$ G en la posición 2143 ha sido relacionada con alto nivel de resistencia a eritromicina (Gerrits, van Vliet, Kuipers, & Kusters, 2006).

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 Favlin nitroreductasa (FrxA), Oxidoreductasa 2- oxoglutarato (OorD), piruvato: oxidoreductasa ferredoxina (PorD), y oxígeno-insensitivo NAD (P)H nitroreductasa (RdxA). Estos factores no permiten una correcta activación del fármaco (Gerrits et al., 2006). En *H. pylori* vino a ser descubierto que una mutación nula en el rdxA fue suficiente para conferir resistencia a una cepa susceptible a metronidazol (Gerrits et al., 2006). La resistencia a metronidazol ha sido asociada con mutaciones en los genes rdxA y frxA. 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 sola 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. Aldana et al (2005) también menciona que reportes anteriores mencionan un cambio de aminoácido en la proteína que codifica para los genes frxA y rdxA; para frxA se ha encontrado un cambio de N→S en la posición 124, V→A en la posición 69, K →I en la posición 126, M en la posición 149 a R, Y en la posición 62 a D, A en la posición 16, V en la posición 211 a A, S en la posición 43 a A e I en la posición 44 a F (Aldana et al., 2005)

La resistencia a fluoroquinolonas no es un problema para la primera generación de quinolonas tales como ácido nalidíxico donde *H. pylori* posee una resistencia natural contra este agente. La resistencia a las fluoroquinolonas ha sido reportada de al menos el 1%. Las fluoroquinolonas inhiben la sub-unidad A de la enzima ADN girasa; la principal función de ésta enzima es relajar la superhelice de DNA para permitir la replicación. La resistencia a fluoroquinolonas 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.(Gerrits et al., 2006)

Furazolidina y nitrofuratoína son antibióticos bacterianos que comparten similitudes con el metronidazol en la estructura y modo de acción. *H.pylori* es usualmente susceptible a furazolidina y nitrofuratoína, pero se ha reportado un incremento del MIC ocasionalmente; por otro lado Rifabutina y varios derivados de la rifampicina son antibióticos bactericidas que se unen a la subunidad β del DNA dependiente del ARN polimerasa resultando de una inhibición de la transcripción. La subunidad β es codificada por el gen rpoB. La resistencia contra rifamicina y rifabutina in vivo es raro, sin embargo han incrementado la incidencia de la resistencia de rifamicina y rifampicina en *H.pylori*; la resistencia en *H.pylori* está relacionada con una mutación puntual en el gen rpoB que corresponde a los aminoácidos 149, 524-545 y 586 (Gerrits et al., 2006).

Dentro del grupo de las penicilinas, la amoxicilina es un antibiótico que se une a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) e interfiere con la síntesis de la pared bacteriana, resultando en una lisis de la replicación bacteriana; la actividad antibacteriana de la amoxicilina es muy similar a los otros antibióticos del mismo grupo, pero la amoxicilina actúa de manera más efectiva cuando se libera en el jugo gástrico además de que aumenta la estabilidad en condiciones ácidas a diferencia de otros antibióticos. En bacterias Gram-negativas, la resistencia a penicilinas es más frecuente por la actividad de betalactamasas que rompen el anillo betalactámico de las penicilinas, mientras que en bacterias Gram-positivas la resistencia es mediada principalmente por cambios mutagénicos en una o más PBPs. Sin embargo en *H.pylori*, no hay indicaciones de que la resistencia a amoxicilina es debido a la actividad de las betalactamasas; la resistencia parece ser principalmente mediada por alteraciones de las proteínas de unión a penicilina (PBPs). Estudios de unión a PBP con H-benzylpenicilina han mostrado que la resistencia a amoxicilina es mediada por la ausencia de PBP D (también llamada PBP4). así mismo se ha asociado que el cambio en las PBPs ha reducido la permeabilidad de la membrana o ha activado el eflujo de amoxicilina en *H.pylori* (Gerrits et al., 2006).

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; altos niveles de tetraciclina, están relacionados con una resistencia a un cambio en AGA en la posición 926-928 a TTC 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 (Gerrits et al., 2006).

*H.pylori* tiene una resistencia natural a trimetropin 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. Trimetropin 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 ésta dada por el gen thyX, que provee una vía alternativa a la del gen Fola (Gerrits et al., 2006)

Dentro de los Betalactamicos ( $\beta$ -lactamicos), amoxicilina es la única utilizada para tratar la infección por *H. pylori*. La resistencia a betalactamicos 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 debido a que no se ha detectado la actividad de la betalactamasa en ensayo de cefalosporina nitrocefina cromogénico. Otros importantes mecanismos de resistencia a antibióticos betalactamicos incluye la alteración en proteínas de unión a penicilina (PBPs), decrecimiento en la permeabilidad de los antibióticos a través de la pared celular o una combinación de ambas estrategias. Las PBPs son un conjunto de enzimas encontradas en la membrana de la bacteria y están involucradas en la etapa terminal de la biosíntesis del peptidoglicano; son componentes integrales en la determinación y mantenimiento de la morfología celular y son, como lo sugiere su nomenclatura, proteínas blanco para penicilina y otros betalactamicos. PBPs están presentes en todas las bacterias de un tamaño de 15 a 150 kDa y una afinidad por los betalactamicos. Una unión covalente de los betalactamicos a PBPs específicos en organismos susceptibles resulta en la inhabilidad de la bacteria de construir pared celular completa y por tanto conduce a la lisis celular. La alteración de los PBPs puede afectar la habilidad de los betalactamicos de unirse a los PBPs resultando en la resistencia al microorganismo. La alteración en los PBPs resulta en la resistencia a betalactamicos y ha sido principalmente descrito en bacterias Gram-positivas como *Streptococcus pneumoniae*. Reportes iniciales sugirieron que *H.pylori* tiene tres principales PBPs (PBP 1, 2, 3) como masas moleculares de 66, 63 y 60 KDa (PBP 1, 2 Y 3 respectivamente). Se encontró que la resistencia a amoxicilina depende de un PBP no detectado (PBP-D) con una masa molecular de 32 KDa y una baja afinidad por amoxicilina. Usando la membrana de *H.pylori*, etiquetada con desoxigena -ampicilina, fueron capaces de identificar 8 PBPs con masas moleculares de 72 a 28 KDa. Así mismo fue encontrado que amoxicilina se une exclusivamente a el 72KDa PBP (PBP 1A) con una alta afinidad; así mismo se ha demostrado que mutaciones puntuales en el gen PBP1A fueron asociados con una estable resistencia a amoxicilina. En general la prevalencia de resistencia a amoxicilina es todavía baja en muchos países (H. L. T. Mobley et al., 2001)

Ureasa: Es un potente estimulante de activación para fagocitos mononucleares y la producción de citoquinas inflamatorias. In vitro, su actividad es tóxica para células del epitelio gástrico. Funciona como colonizador (factores de mantenimiento) y factor de virulencia (Blaser, 1996; Dorrell, Crabtree, & Wren, 1998). Es un factor esencial de colonización. Parece ser que la actividad ureasa se requiere para la producción de un microambiente neutral para el organismo en el lumen gástrico. Hay evidencias considerables de la asociación de ureasa a la membrana externa de *H. pylori*,

aunque algo de actividad también se detecta en el citoplasma sugiriendo un papel en la asimilación de nitrógeno orgánico. La asociación de la ureasa con la superficie es estabilizada por iones calcio y magnesio, aunque otros cationes pueden inhibir la actividad de la enzima. La ureasa recombinante es expresada óptimamente cuando la utilización de Ni<sup>2+</sup> no es inhibido in vitro y cuando la síntesis de Ure A y Ure B es suficientemente permitida. Una proteína transportadora de alta afinidad por níquel (Nix A) permite el transporte a bajas concentraciones de este metal y es necesario para la completa actividad de la ureasa de *H. pylori*. Sin embargo, mutantes en nix A muestran actividad ureasa aunque a niveles bajos frente a las que sí tienen actividad ureasa (H. L. Mobley, Island, & Hausinger, 1995)

Catalasa y superóxido dismutasa: Son genes homólogos a microorganismos patógenos intracelulares, sugiriendo el papel de resistencia a morir por leucocitos polimorfonucleares. Una pequeña fracción de catalasa y superóxido dismutasa se asocian a la superficie de *H. pylori* y es esencial para la protección frente a muerte dependiente de O<sub>2</sub> por los neutrófilos (Odenbreit, Wieland, & Haas, 1996; Spiegelhalder, Gerstenecker, Kersten, Schiltz, & Kist, 1993)

*H. pylori* inhibe la respuesta secretora de las células mucosas in vitro, indicando el efecto potencial de deterioro en este mecanismo principal de defensa de la mucosa gástrica. 1. Fosfolipasa: *H. pylori* destruye la capa rica en fosfolípidos con función protectora. Más aún, los cambios pueden ser inducidos en capas fosfolipídicas in vitro por fosfolipasas A2 y C expresadas en *H. pylori* (Ottlecz, Romero, Hazell, Graham, & Lichtenberger, 1993).

Mucinasas: *H. pylori* posee un gen idéntico casi al de la mucinasa de *Vibrio cholerae*. Esta actividad mucinasa in vitro contribuiría a la ruptura de la barrera mucosa gástrica (Smith, Chahal, & French, 1994).

Citotoxinas: Estas inducen vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucariotas. Casi simultáneamente, cuatro grupos dieron con el clonaje y secuencia de vac A (3.9 Kb) que codifica a una citotoxina vacuolante. El gen vac A codifica a una proteína de 134KD, protoxina que contiene una secuencia leader de 33 aminoácidos y un fragmento carboxilo terminal de ~ 50 KD que presenta homología con el carboxilo terminal del precursor de la proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, y que parece estar implicado en la translocación de la proteasa a la membrana externa. Por analogía, el carboxilo terminal de la protoxina de *H. pylori* puede jugar un papel en la secreción de la citotoxina. Mutantes en vac A no expresan la citotoxina y pierden la actividad vacuolante (Dorrell et al., 1998).

Especies de oxígeno reactivas: *H. pylori* induce la síntesis de "Reactive oxygen species" (ROS) en la mucosa gástrica in vivo. Hay asociación positiva entre ROS, la carga infectiva de *H. pylori* y el daño en mucosa gástrica. Muchas drogas anti-úlceras funcionan como "secuestradores" de ROS, ayudando a explicar cómo minimizan el daño en la mucosa inducido por *H. pylori*. *H. pylori* estimula la producción de ROS in vitro e in vivo (Smith et al., 1994)

Sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS): *H. pylori* induce iNOS y macrófagos in vitro. La alta producción de óxido nítrico por la inducción de esta sintasa, en asociación con la activación inmune, es responsable de daño tisular (Mannick et al., 1996)

Sideróforos: El hierro es elemento esencial para el crecimiento y metabolismo bacteriano de *H. pylori*. Hoy, después de los estudios contradictorios de Husson y colaboradores, y posteriormente de Illingworth, se continúa sin aclarar cómo *H. pylori* toma hierro para su crecimiento, es decir, si usan

la lactoferrina humana y receptores bacterianos en la membrana de *H. pylori* para lactoferrina o si bien *H. pylori* tiene proteínas de unión a hierro o sideróforos (Husson, Legrand, Spik, & Leclerc, 1993; Illingworth, Walter, Griffiths, & Barclay, 1993)

Agar TSA: Dada su composición nutritiva, el agar de soja Trypticase se ha convertido en un medio de uso muy extendido, ya sea sin suplementos o como base para medios con sangre. El agar de soja Trypticase con sangre de cordero al 5-10% se utiliza ampliamente para la recuperación y el cultivo de especies microbianas exigentes y para la determinación de reacciones hemolíticas importantes para las características de diferenciación de bacterias.

La combinación de caseína y peptonas de soja hace al medio altamente nutritivo, al suministrar nitrógeno orgánico, en especial aminoácidos y péptidos de cadena más larga. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico.

La sangre de carnero defibrinada es la sangre más ampliamente utilizada para enriquecer los medios de base de agar.

El Suplemento Selectivo de *Helicobacter pylori* (Dent) se desarrolló a partir del medio selectivo de Dent descrito para el aislamiento de *H. pylori* de biopsias gástricas. Se trata de una modificación del medio de Skirrow en el que se sustituye la polimixina B por cefsulodina y se añade anfotericina B para inhibir las especies de *Candida*. Cuando se usó rutinariamente en el laboratorio para 100 biopsias gástricas, el medio de Dent alcanzó una mayor tasa de aislamiento para *H. pylori* y una menor contaminación por otros organismos cuando se comparó con el medio de Skirrow y agar de sangre de chocolate.

Vancomycin: Es un antibiótico glicopéptido utilizado en la profilaxis y el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas. La vancomicina actúa inhibiendo la síntesis adecuada de la pared celular en bacterias Gram-positivas. Debido al mecanismo diferente por el cual las bacterias Gram-negativas producen sus paredes celulares y los diversos factores relacionados con la entrada en la membrana externa de organismos Gram-negativos, la vancomicina no es activa contra las bacterias Gram-negativas (excepto algunas especies no gonocócicas de *Neisseria*).

Trimetoprim: Es un antibiótico bacteriostático que pertenece a la clase de agentes quimioterapéuticos conocidos como inhibidores de la dihidrofolato reductasa. El trimetoprim actúa interfiriendo con la acción de la dihidrofolato reductasa bacteriana, inhibiendo la síntesis de Tetrahidrofólico. El ácido tetrahidrofólico es un precursor esencial en la síntesis de novo del compuesto intermedio Timidina monofosfato (dTMP), precursor del metabolito del ADN Timidina trifosfato. Las bacterias son incapaces de tomar el ácido fólico del medio ambiente (es decir, el huésped de la infección) y, por tanto, dependen de su propia síntesis de novo. La inhibición de la enzima prohíbe las bacterias de los nucleótidos necesarios para la replicación del ADN, causando, en determinadas circunstancias, la letalidad celular debida a la muerte sin muerte.

Cefsulodin: Es un antibiótico de la cefalosporina de la tercera generación que tiene actividad muy específica contra *Pseudomonas aeruginosa*. No tiene actividad significativa contra otras bacterias Gram-negativas y actividad muy limitada contra bacterias Gram-positivas y bacterias anaeróbicas.

Anfotericina B: Es un fármaco antifúngico polieno. Se conocen dos anfotericinas, anfotericina A y anfotericina B, pero sólo B se usa clínicamente, porque es significativamente más activo in vivo.

Al igual que con otros antifúngicos de polieno, la anfotericina B se asocia con ergosterol, el principal componente de las membranas celulares de hongos, formando un canal transmembrana que conduce a la fuga de iones monovalentes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  y  $Cl^-$ ), que es el principal efecto que conduce a células fúngicas muerte.

Polimixina: La polimixina B es un antibiótico lipopeptídico aislado de *Bacillus polymyxa*. Su estructura básica consiste en un anillo peptídico policatiónico y una cadena lateral tripeptídica con una cola de ácido graso. La polimixina B contiene cinco grupos amina primaria y es un polication a pH fisiológico. La polimixina B es una mezcla de al menos cuatro componentes estrechamente relacionados, la polimixina B1 a la B4, siendo la polimixina B1 y B2 los dos componentes principales. Los cuatro componentes difieren entre sí solamente en el resto ácido graso. La polimixina B está disponible para uso parenteral como la sal de sulfato, y la variación de lote a lote existe en la proporción de diferentes componentes. Existe sólo una diferencia de aminoácidos entre la polimixina B y la colistina. Otra diferencia importante entre la polimixina B y la colistina es que la primera se administra parenteralmente como la sal de sulfato, mientras que la última se administra como la sal sódica de colistina metanosulfonato, un profármaco inactivo que se somete a hidrólisis in vivo e in vitro para formar la entidad activa colistina. Tanto la polimixina B como la colistina son agentes bactericidas de acción rápida, con un mecanismo de acción de tipo detergente. Las polimixinas interactúan con el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y se toman posteriormente a través de la "camino". El anillo peptídico policatiónico se une a la membrana externa desplazando los puentes de calcio y magnesio que estabilizan el LPS. Debido a que los péptidos tienen afinidades para LPS que son al menos tres órdenes de magnitud superiores a los cationes divalentes  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ , desplazan competitivamente estos iones y consecuentemente alteran la membrana externa. La cadena lateral de ácido graso interactúa además con el LPS, contribuyendo a la inserción de polimixinas en la membrana externa. Las polimixinas producen un efecto físico-químico disruptivo, que conduce a cambios de permeabilidad en la membrana externa. Se cree que la membrana afectada desarrolla "grietas" transitorias que permiten el paso de una variedad de moléculas, incluyendo compuestos hidrófobos y proteínas pequeñas y, lo que es más importante, promueve la captación del propio péptido perturbador y conduce a la muerte celular (de ahí el término "Auto-promoción de la captación").

Bacitracina: Antibiótico producido por una mezcla de polipéptidos cíclicos producidos por cepas de la variedad Tracy de la bacteria *Bacillus subtilis*. Inhibe la síntesis de la pared bacteriana mediante la prevención de la transferencia de mucopéptidos en la pared celular en crecimiento.

El enriquecimiento IsoVitaleX es un suplemento definido químicamente que se utiliza como un aditivo para medios de cultivo de microorganismos nutricionalmente fastidiosos.

Carpenter y Morton describieron un medio "chocolate" mejorado para el aislamiento de gonococos en 24 horas. La eficacia de este medio, agar GC suplementado con hemoglobina y concentrado de levadura, se demostró en un estudio de 12 medios que se encontraban en uso para el aislamiento de este organismo. El medio fue mejorado reemplazando el concentrado de levadura por el enriquecimiento IsoVitaleX BBL.

El enriquecimiento IsoVitaleX ha sido utilizado en medios mejorados para el cultivo de *Neisseria* patógena, por ejemplo para el agar Thayer-Martin modificado<sup>6</sup>, el agar Martin-Lewis<sup>7</sup> y el medio

Transgrow8, así como para el agar GC suplementado (agar GC II con enriquecimiento IsoVitaleX) utilizado para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para *N. gonorrhoeae* empleando discos de difusión.

Rojo de tetrazolium: Se utiliza para visualizar la actividad de la enzima deshidrogenasa. Inicialmente la solución de tetrazolio es incolora pero cambia a rojo cuando entra en contacto con hidrógeno. Tetrazolium rojo se utiliza en una prueba de viabilidad bioquímica para las semillas. La prueba se basa en enzimas deshidrogenasas para liberar iones hidrógeno que posteriormente reducen la solución de sal de tetrazolio incolora a un compuesto rojo llamado formazan. Las células vivas se vuelven rojas mientras que las células muertas permanecen incoloras.

Suero fetal bovino: Se cree que FBS proporciona elementos básicos requeridos para el cultivo celular, incluyendo factores de crecimiento, factores de apego, transportadores de hierro, vitaminas, aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas y elementos traza. El FBS se ha mostrado empíricamente para cultivar células; Sin embargo, se ha cuestionado recientemente si el crecimiento celular es la única lectura importante. Aunque FBS puede apoyar el crecimiento de muchos tipos de células, cómo lo hace y qué elementos específicos son importantes para cada tipo de célula individual aún no se han identificado. Para los casos en los que las células cultivadas se utilizan como fábricas para producir proteínas, como en las industrias biotecnológica y farmacológica, es crucial el control sobre la producción y la calidad del producto final a partir de las células cultivadas. Para el entorno académico, tener control sobre todas las variables y constantes en cualquier experimento es parte integrante de la ciencia impulsada por la hipótesis (Elhofy, 2008)

Extracto de levadura: Es un extracto soluble en agua de un autolisado de células de levaduras seleccionadas. Este producto es rico en vitaminas especialmente del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento. Es utilizado en una amplia variedad de medios de cultivo como una excelente fuente de nutrientes.

**Objetivo general:** Comparar diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *Helicobacter pylori*.

**Objetivos Específicos:**

Realizar una revisión de bibliográfica de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *H. pylori*.

Comparar diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *H. pylori*.

**Metodología:**

Los aislamientos de *H. pylori* que han estado conservados a -80°C por 10 años serán sembrados en tres medios de cultivos diferentes, denominados A, B y C. La evaluación se realizará sembrando un inóculo de 100µL en placa por superficie en cada medio de cultivo. Los medios a evaluar se muestran en la tabla:

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Agar Triptacasa Soya (ATS)</b>	Agar Triptacasa Soya (ATS)	Agar Triptacasa Soya (ATS)
<b>Sangre de cordero Completa 7%</b>	Sangre de cordero lisada 10%	
	Suero fetal bovino 5%	Suero fetal Bovino 5%
<b>IsoVitaleX 0,5%</b>		IsoVitaleX 0,5%
	Extracto de levadura 0,25%	Extracto de levadura 0,25%
<b>Vancomicina 10mg/L</b>	Vancomicina 10mg/L	DENT
<b>Anfotericina B 5 mg/L</b>	Anfotericina B 5mg/L	cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio 40mg/L
<b>Bacitracina 1,07mg/L</b>	Trimetoprim 5mg/L	
<b>Polimixina B 0,33mg/L</b>		

Las placas se evaluarán observando el crecimiento de un mismo vial en los medios de cultivo A, B y C. El de mayor crecimiento marcará como 3, el de crecimiento intermedio como 2, y el de menor crecimiento como 1. La confirmación se realizará mediante la tinción de Gram, pruebas bioquímicas de ureasa, catalasa y oxidasa.

### **Resultados esperados:**

Generación de nuevo conocimiento: Manuscrito tipo artículo de revisión de tema sobre los diferentes tipos de medios de cultivo que existen para la recuperación de *H. pylori*. Manuscrito tipo artículo de investigación con los resultados del objetivo general del proyecto. Se generará un documento para tesis de pregrado.

Fortalecimiento de la capacidad científica: Formación en investigación a dos estudiantes del programa de pregrado de la Universidad Libre Seccional Pereira, con el producto de tesis de grado para optar el título de Microbiólogo.

Consolidación del proyecto de investigación interinstitucional entre el grupo de investigación en microbiología y biotecnología (MICROBIOTEC) de la Universidad Libre Seccional Pereira y el grupo de investigación en enfermedades infecciosas (GRIENI) de la Universidad Tecnológica de Pereira.

c. Apropiación social del conocimiento: Presentación de una ponencia en evento científico con los resultados finales de la investigación.

### **Impactos:**

Social: Formación de dos estudiantes de pregrado en la investigación formativa, a través del semillero de investigación en donde se da la búsqueda y generación de conocimiento.

Ambiental: En la realización del proyecto, el manejo de sustancias contaminantes ambientales será tratado siguiendo los protocolos de manejo y disposición establecidos en los grupos de investigación y acogiéndose a las recomendaciones de ambas universidades en trabajo colaborativo con la ARL.

El proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Libre Seccional Pereira; y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira. Las instalaciones de los laboratorios y manejo de productos químicos y biológicos así como la disposición de desechos tóxicos se encuentran en permanente vigilancia por la oficina de riesgos de la institución. Esta oficina ha capacitado y dotado a todo el personal de los laboratorios de los implementos básicos de bioseguridad. Los desechos biológicos sólidos y líquidos producidos durante la fase experimental son almacenados en bolsas y recipientes especiales, recogidos semanalmente para ser transportados por un vehículo especial a incineración.

c. Económico: La investigación a largo plazo de un microorganismo que afecta la salud pública como es el caso de *H. pylori*, redundará sobre todo en beneficio de la región pues extrapolar datos de otras zonas geográficas no es conveniente debido precisamente a la gran diversidad genética de la bacteria. Por citar un ejemplo si en la región se tienen los datos de resistencia del microorganismo a los antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento, se puede dar a conocer a la comunidad médica de las mejores opciones de tratamiento empírico de la infección y por lo tanto se impacta en los índices morbilidad y los costos de manejo de individuos enfermos también.

### **Bibliografía:**

- Aldana, L. P., Kato, M., Kondo, T., Nakagawa, S., Zheng, R., Sugiyama, T., Kwon, D. H. (2005). In vitro induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in *rdxA* and *frxA* genes from *Helicobacter pylori* isolates. *J Infect Chemother*, 11(2), 59-63. doi:10.1007/s10156-004-0370-y
- Banks, L., Carbone, A., Blum, H., & Cesarman, E. (2012). *Helicobacter Pylori Biological agents*. France: International Agency for Research on Cancer.
- Bayona, M. a. (2013). condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. 6.
- Bessa, L. J., Grande, R., Di Iorio, D., Di Giulio, M., Di Campli, E., & Cellini, L. (2013). *Helicobacter pylori* free-living and biofilm modes of growth: behavior in response to different culture media. *APMIS*, 121(6), 549-560. doi:10.1111/apm.12020

- Blaser, M. J. (1996). The Bacteria Behind Ulcers. *Scientific American*, 274(2), 104-107.
- Catrenich, C. E., & Makin, K. M. (1991). Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 181, 58-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1866596>
- Cellini, L., Di Campi, E., Di Bartolomeo, S., Bessa, L. J., Baffoni, M., & Di Giulio, M. (2014). New transport medium for cultural recovery of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 52(12), 4325-4329. doi:10.1128/JCM.02850-14
- Coudron, P. E., & Stratton, C. W. (1995). Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol*, 33(4), 1028-1030. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790430>
- Cover, T. L. (2012). Perspectives on methodology for in vitro culture of *Helicobacter pylori*. *Methods Mol Biol*, 921, 11-15. doi:10.1007/978-1-62703-005-2\_3
- De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., . . . Zullo, A. (2010). Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis*, 19(4), 409-414. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188333>
- Dent, J. C., & McNulty, C. A. (1988). Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 7(4), 555-558. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3141172>
- Deshpande, M., Calenoff, E., & Daniels, L. (1995). Rapid large-scale growth of *Helicobacter pylori* in flasks and fermentors. *Appl Environ Microbiol*, 61(6), 2431-2435. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7793966>
- Dorrell, N., Crabtree, J. E., & Wren, B. W. (1998). Host-bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Trends Microbiol*, 6(10), 379-382. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807778>
- Dus, I., Dobosz, T., Manzin, A., Loi, G., Serra, C., & Radwan-Oczko, M. (2013). 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)*, 67, 261-268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619225>
- Elhofy, A. (2008). Serum and its applicability and use in cell culture. *Cell*.
- Garcia-Rodriguez, J. A., Garcia-Garcia, M. I., Garcia-Sanchez, E., Garcia-Sanchez, J. E., & Munoz Bellido, J. L. (1989). [In vitro activity of 16 antimicrobial agents against *Helicobacter (Campylobacter) pylori*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 7(10), 544-546. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2490433>
- Gerrits, M. M., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis*, 6(11), 699-709. doi:10.1016/S1473-3099(06)70627-2
- Goodwin, C. S., Blincow, E. D., Warren, J. R., Waters, T. E., Sanderson, C. R., & Easton, L. (1985). Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J Clin Pathol*, 38(10), 1127-1131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3902897>
- Hachem, C. Y., Clarridge, J. E., Evans, D. G., & Graham, D. Y. (1995). Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, 48(8), 714-716. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7560195>
- Heep, M., Scheibl, K., Degrell, A., & Lehn, N. (1999). Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 37(11), 3764-3766. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523597>
- Henriksen, T. H., Brorson, O., Schoyen, R., Thoresen, T., Setegn, D., & Madebo, T. (1995). Rapid growth of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14(11), 1008-1011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654438>
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2010). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC*

- Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 94, v-vii, 1-412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21141240>
- Husson, M. O., Legrand, D., Spik, G., & Leclerc, H. (1993). Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infect Immun*, 61(6), 2694-2697. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8500909>
- Hutton, M. L., Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2012). The use of AlbuMAX II((R)) as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 17(1), 68-76. doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00914.x
- Illingworth, D. S., Walter, K. S., Griffiths, P. L., & Barclay, R. (1993). Siderophore production and iron-regulated envelope proteins of *Helicobacter pylori*. *Zentralbl Bakteriol*, 280(1-2), 113-119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8280932>
- Jiang, X., & Doyle, M. P. (2000). Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 38(5), 1984-1987. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790135>
- Joo, J. S., Park, K. C., Song, J. Y., Kim, D. H., Lee, K. J., Kwon, Y. C., . . . Rhee, K. H. (2010). A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 15(4), 295-302. doi:10.1111/j.1523-5378.2010.00767.x
- Kangatharalingam, N., & Amy, P. S. (1994). *Helicobacter pylori* comb. nov. Exhibits Facultative Acidophilism and Obligate Microaerophilism. *Appl Environ Microbiol*, 60(6), 2176-2179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349304>
- Krajden, S., Bohnen, J., Anderson, J., Kempston, J., Fuksa, M., Matlow, A., . . . et al. (1987). Comparison of selective and nonselective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. *J Clin Microbiol*, 25(6), 1117-1118. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597756>
- Mannick, E. E., Bravo, L. E., Zarama, G., Realpe, J. L., Zhang, X. J., Ruiz, B., . . . Correa, P. (1996). Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res*, 56(14), 3238-3243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8764115>
- Megraud, F. (1997). Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Alimentary pharmacology and Therapeutics*, 11(1), 43-53.
- Mobley, H. L., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*, 59(3), 451-480. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7565414>
- Mobley, H. L. T., Mendz, G. L., & Hazell, S. L. (2001). In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC).
- Morgan, D. R., Freedman, R., Depew, C. E., & Kraft, W. G. (1987). Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol*, 25(11), 2123-2125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3693542>
- Ndip, R. N., MacKay, W. G., Farthing, M. J., & Weaver, L. T. (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 36(5), 616-622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717085>
- Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bebear, C. M., Lamouliatte, H., & Megraud, F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(12), 2724-2728. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9420046>
- Odenbreit, S., Wieland, B., & Haas, R. (1996). Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol*, 178(23), 6960-6967. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955320>
- Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D., Bianciardi, S., Rappuoli, R., Bayeli, P. F., . . . et al. (1993). Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J Clin Microbiol*, 31(1), 160-162. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417026>

- Ottlecz, A., Romero, J. J., Hazell, S. L., Graham, D. Y., & Lichtenberger, L. M. (1993). Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts. Biochemical and biophysical studies. *Dig Dis Sci*, 38(11), 2071-2080. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223083>
- Owen, R. J. (1995). Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 9(3), 415-446. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8563046>
- Richards, C. L., Buchholz, B. J., Ford, T. E., Broadaway, S. C., Pyle, B. H., & Camper, A. K. (2011). Optimizing the growth of stressed *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Methods*, 84(2), 174-182. doi:10.1016/j.mimet.2010.11.015
- Shahamat, M., Mai, U. E., Paszko-Kolva, C., Yamamoto, H., & Colwell, R. R. (1991). Evaluation of liquid media for growth of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 29(12), 2835-2837. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757556>
- Siavoshi, F., Saniee, P., Atabakhsh, M., Pedramnia, S., Tavakolian, A., & Mirzaei, M. (2012). Mucoid *Helicobacter pylori* isolates with fast growth under microaerobic and aerobic conditions. *Helicobacter*, 17(1), 62-67. doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00913.x
- Siu, L. K., Leung, W. K., Cheng, A. F., Sung, J. Y., Ling, T. K., Ling, J. M., . . . Chung, S. C. (1998). Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 36(10), 3048-3050. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738066>
- Smith, A. W., Chahal, B., & French, G. L. (1994). The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 13(1), 153-160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984089>
- Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E., & Kist, M. (1993). Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun*, 61(12), 5315-5325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225605>
- Stevenson, T. H., Castillo, A., Lucia, L. M., & Acuff, G. R. (2000). Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol*, 30(3), 192-196. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747249>
- Tee, W., Fairley, S., Smallwood, R., & Dwyer, B. (1991). Comparative evaluation of three selective media and a nonselective medium for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *J Clin Microbiol*, 29(11), 2587-2589. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1774265>
- Testerman, T. L., Conn, P. B., Mobley, H. L., & McGee, D. J. (2006). Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. *J Clin Microbiol*, 44(5), 1650-1658. doi:10.1128/JCM.44.5.1650-1658.2006
- Vega, A. E., Cortinas, T. I., Mattana, C. M., Silva, H. J., & Puig De Centorbi, O. (2003). Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with cyanobacterial extract. *J Clin Microbiol*, 41(12), 5384-5388. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662915>
- Walsh, E. J., & Moran, A. P. (1997). Influence of medium composition on the growth and antigen expression of *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol*, 83(1), 67-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246772>
- Westblom, T. U., Madan, E., & Midkiff, B. R. (1991). Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 29(4), 819-821. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1890184>
- Xia, H. X., Keane, C. T., Chen, J., Zhang, J., Walsh, E. J., Moran, A. P., . . . O'Morain, C. A. (1994). Transportation of *Helicobacter pylori* cultures by optimal systems. *J Clin Microbiol*, 32(12), 3075-3077. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883907>
- Xu, J., Czinn, S. J., & Blanchard, T. G. (2010). Maintenance of *Helicobacter pylori* cultures in agar stab. *Helicobacter*, 15(5), 477-480. doi:10.1111/j.1523-5378.2010.00769.x

Yamaguchi, H., Osaki, T., Takahashi, M., Taguchi, H., & Kamiya, S. (1999). Colony formation by *Helicobacter pylori* after long-term incubation under anaerobic conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 175(1), 107-111. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361715>