

**Comparación de diferentes metodologías de siembra y zonas de toma de muestra
gástrica para la detección de *Helicobacter pylori* por cultivo en pacientes que asisten a
endoscopia de las ciudades de Pereira y Manizales**

Catalina Ramírez Osorio

Wendy L. Ospina Joaqui

ASESOR

Adalucy Álvarez Aldana. BSc, MSc, PhD

Co-asesor

Eleazar Vargas Mena. BSc, MSc.

UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA

2018

TABLA DE CONTENIDO

1. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1. RESEÑA HISTÓRICA

3.2. MICROBIOLOGÍA DEL MICROORGANISMO

3.2.1. Taxonomía

3.2.2. Morfología celular

3.2.3. Genoma

3.2.4. Características Bioquímicas

3.3. EPIDEMIOLOGÍA

3.3.1. Prevalencia de la infección

3.3.2. Incidencia de la infección

3.4. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN

3.4.1. Exámenes no invasivos

3.4.1.1. *Serología*

3.4.1.2. *Pruebas en aire espirado (Breath Test)*

3.4.2. EXÁMENES INVASIVOS

3.4.2.1. *Prueba de ureasa en biopsia antral*

3.4.2.2. *Histopatología*

3.4.2.3. *Características de crecimiento In vitro*

3.4.2.4. *Cultivo*

3.4.2.5. *Reacción en cadena de la polimerasa*

3.4.2.6. *Helico Blot 2.1 Kit*

3.5. MEDIOS DE CULTIVO

3.5.1. Suplementos para el crecimiento de *Helicobacter pylori*

3.5.2. Agentes antimicrobianos utilizados en los medios de cultivo

3.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

3.6.1. Ureasa

3.6.2. Catalasa

3.6.3. Oxidasa

3.6.4. Tinción de Gram

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

5.2. MUESTRA POBLACIONAL

5.3. TOMA DE MUESTRA

5.4. CULTIVO DE LAS BIOPSIAS

5.5. METODOLOGÍAS DE SIEMBRA POR CULTIVO

5.5.1. Siembra de las biopsias por IMPRESIÓN

5.5.2. Siembra de las biopsias por MACERADO

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.7. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. MUESTRA POBLACIONAL

6.2. TOMA DE MUESTRA

6.3. CULTIVO DE LAS BIOPSIAS

6.4. FRECUENCIA POR CULTIVO DE IMPRESIÓN Y MACERADO

6.4.1. Cultivo por Impresión

6.4.2. Cultivo por Macerado

6.5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE SIEMBRA

6.6. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN IMPRESIÓN Y
MACERADO

6.7. COMPARACIÓN DE A, C Y F PARA MACERADO

7. CONCLUSIONES

8. PERSPECTIVAS

9. AGRADECIMIENTOS

10. ANEXOS

11. REFERENCIAS

1. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El bacilo gram negativo *Helicobacter pylori*, infecta la mucosa gástrica de más de la mitad de la población mundial, causa gastritis, enfermedad ulcero-péptica, y se asocia tanto con carcinoma gástrico como con linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (mucus-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT). La infección por este microorganismo, presenta una alta tasa de morbilidad, pero una baja tasa de mortalidad y es curable con terapia antimicrobiana. La frecuencia de infección en los países desarrollados es un poco más baja que en los países en vía de desarrollo, en este último se puede decir que la frecuencia aumenta a casi un 80%, probablemente debido a las deficientes condiciones higiénico-sanitarias.

El cultivo es considerado el método de referencia (patrón oro/Gold Standard) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. La principal ventaja que posee este método es que puede estudiar la sensibilidad de las cepas a los distintos agentes antimicrobianos. El hecho de tener la cepa permite la realización de distintos estudios como puede ser estudios fisiológicos y/o genéticos. Como desventaja cabe destacar que es un método de lento diagnóstico, que puede demorarse varios días, dispendioso, relativamente costoso; en donde la sensibilidad de la técnica depende de la experiencia en su cultivo, de las condiciones adecuadas de toma y transporte de la muestra, además del no consumo de ciertos medicamentos por parte del paciente.

Con el trabajo de grado “Comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *H. pylori*”, y otros proyectos de investigación realizados por el grupo, se ha encontrado una gran dificultad al momento de detectar *H. pylori* por cultivo. Con el trabajo de grado previamente mencionado, al utilizar diferentes medios de cultivo para la recuperación de la bacteria, no se mejoraron las tasas de detección. Con estos antecedentes de la baja sensibilidad del cultivo y como parte de los objetivos del proyecto marco de este trabajo de grado “Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *H. pylori* en pacientes dispépticos del Eje Cafetero”, en donde es

necesario tener una alta tasa de recuperación de la bacteria, se generó la idea de evaluar si las metodologías de procesamiento de muestras para la siembra y el número de biopsias por paciente mejoran la tasa de recuperación de *H. pylori* por medio del cultivo. Por lo anterior se plantean las siguientes preguntas: ¿Cuál de las metodologías de siembra de las biopsias gástricas para el cultivo permite una mayor detección de la infección por *H. pylori*?; ¿Cuál de las diferentes zonas de toma de muestra de la mucosa gástrica para el cultivo permite una mayor detección de la infección por *H. pylori*?

2. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es categorizado por la organización mundial de la salud (OMS) como un agente carcinogénico tipo I, precursor del cáncer gástrico, ocupando la segunda causa de neoplasia más frecuente en el mundo contemporáneo, con más de 470.000 casos nuevos al año, y representando el 10% del total de los tumores malignos registrados. La infección puede ser adquirida desde la niñez y es curable con terapia antimicrobiana. La frecuencia de infección en los países desarrollados es menor al 50%, mientras en los países en vía de desarrollo está por encima del 80%, convirtiendo la infección en estos países en un problema de salud pública debida a las patologías con las cuales la infección se asocia.

La detección de la infección se puede realizar de manera directa o indirecta por diferentes métodos diagnósticos (Cultivo, Examen histológico, Reacción en cadena de la polimerasa, Prueba rápida de ureasa, Prueba del aliento, Test serológico) cuya muestra puede ser de origen invasivo o no. El cultivo es considerado el método de referencia (Gold Standard) para el diagnóstico de la infección, y requiere muestra de biopsia gástrica a través del método invasivo de endoscopia. La principal ventaja que posee este método es que puede estudiar la sensibilidad de las cepas a los distintos agentes antimicrobianos. Como desventaja esta su baja sensibilidad en algunos casos por debajo del 50% y es dependiente de la experiencia del laboratorista, del medio de cultivo, de los días de incubación, de las condiciones previas a la toma de muestra en el paciente, ya que se ha descrito que el consumo previo de antimicrobianos o inhibidores de bomba de protones inhibe el crecimiento del microorganismo.

Según las recomendaciones dadas por el sistema actualizado de Sídney, para una evaluación óptima de la gastritis y la infección por *H. pylori*, se deben obtener muestras de biopsia tanto de antro, cuerpo e incisura angularis. Contrario a esto, algunas investigaciones han obtenido sensibilidad de más del 90% con solo biopsia antral; y en otros estudios identifican que la

muestra de antro no es suficiente y que el cuerpo es un mejor sitio para la detección de *H. pylori*.

H. pylori es principalmente encontrado en la capa mucosa gástrica y rara vez coloniza porciones profundas de la mucosa gástrica. Considerando lo anterior, la siembra de la biopsia gástrica podría ser tanto por impresión del moco gástrico presente en la biopsia o maceración del tejido. En la búsqueda bibliográfica no se encontró si había alguna diferencia en utilizar una u otra metodología; en aquellas investigaciones en donde se describe la metodología del cultivo refieren maceración del tejido. Por lo tanto se consideró comparar estas dos metodologías para observar si habían diferencias en la tasa de detección de *H. pylori* en el cultivo.

Considerando entonces la información previa, este estudio pretende determinar si las tasas de recuperación de la bacteria en el cultivo son diferentes con respecto a la zona de la mucosa gástrica utilizada (antro, cuerpo, fondo) o cuando la metodología de procesamiento de la muestra es diferente (impresión, maceración).

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1. RESEÑA HISTÓRICA

A finales del siglo XIX y principios del XX, se reportaron en algunos informes la presencia de microorganismos en espiral en el estómago de animales, poco después de esto se encontraron bacterias algo similares en el estómago humano con enfermedades como: ulcero péptica y cáncer gástrico. Algunos pacientes fueron tratados con altas dosis de componentes de bismuto. Tiempo después, esta posibilidad fue descartada por la alta prevalencia de estas bacterias en espiral en los estómagos de personas sin síntomas clínicos y las consideraron como contaminantes de los alimentos.(1)

En la década de los 80 Robin Warren (patólogo) y Barry Marshall (gastroenterólogo), cultivaron con total éxito la bacteria en forma de espiral a partir de algunas biopsias gástricas, e realizaron algunos experimentos de auto-ingestión donde se demostró que esta bacteria puede colonizar el estómago humano y provocar inflamación en la mucosa gástrica. Esto dio pie para rebatir que los factores como el estrés y el estilo de vida eran las principales causas de la enfermedad ulcero-péptica y se estableció que la bacteria causaba más del 90% de las úlceras duodenales y el 80% de las úlceras gástricas.(2) Inicialmente, el organismo fue denominado “*Campylobacter-like organism*”, “*gastric Campylobacter-like organism*”, “*Campylobacter pyloridis*”, “*Campylobacter pylori*” y finalmente *Helicobacter pylori*.(3)

3.2. MICROBIOLOGÍA DEL MICROORGANISMO

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*.(4) Micrografías electrónicas mostraron múltiples flagelos en un polo de la bacteria, en contraste a un único flagelo bipolar típico de *Campylobacter* spp (Figura 1). 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.(5)

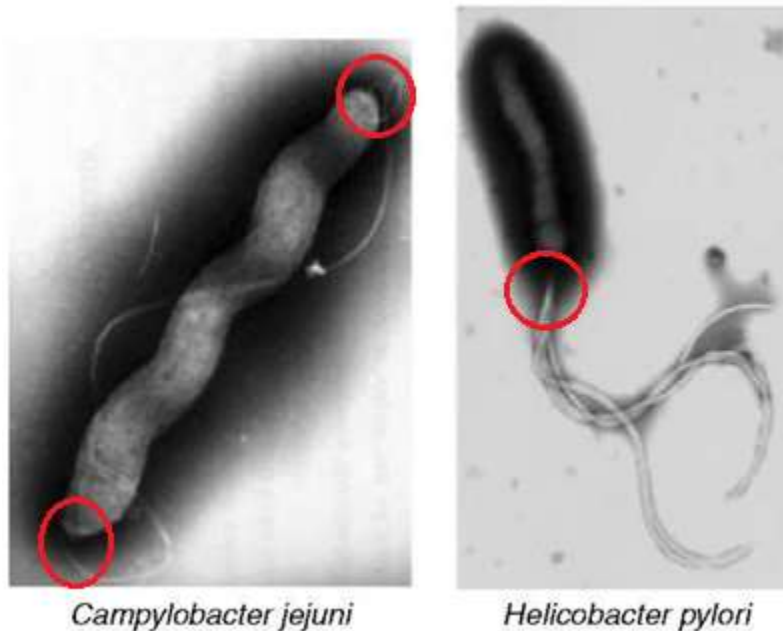


Figura 1, *C. jejuni* mostrando una pared celular rugosa y flagelo bipolar Microscopio electrónico; *Helicobacter pylori* asociada gastritis, muestra extraída de una biopsia gástrica. Se observa un único flagelo. Microscopio electrónico de barrido (500nm).

3.2.1. Taxonomía

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 genero *Helicobacter*.(6) Según la base de datos NCBI, *Helicobacter pylori* cuenta con 44 especies (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>)

el género *Helicobacter* pueden ser subdividido en gástricas y enterohepáticas (no gástricas), las gástricas son incapaces de colonizar el tracto gastrointestinal inferior y las enterohepáticas la superficie de la mucosa gástrica. *Helicobacter pylori* hace parte de las especies gástricas que se ha adaptado a condiciones inhóspitas.

3.2.2. 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 2-4 μm de largo); no forma espora, posee de 2 a 6 flagelos. (7,8)

Catrenich & Makin determinaron que *Helicobacter 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; por consiguiente estudios superiores mencionan que la forma cocoide de *Helicobacter 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.(9,10)

3.2.3. Genoma

La variación genética de *Helicobacter pylori* es notable, sin embargo se sabe poco sobre los cambios generados durante sus primeras etapas de infección,(11) la diversidad genética de *H. pylori* se debe a los procesos de adaptación; la bacteria tiene la capacidad de adaptarse y persistir en el estómago humano, donde es el organismo predominante. Mediante técnicas moleculares como RAPD, MLST y PFGE se determinó que *H. pylori* tiene una alta diversidad genómica. (12)

La evolución de *H. pylori* se da a través de mecanismos de transferencia horizontal, es decir, un factor de recombinación, que es el proceso donde dos moléculas separadas (ADN o ARN) intercambian regiones de sus secuencias, siendo la recombinación el mecanismo principal que dirige los cambios evolutivos de un microorganismo. (12)

Según Muñoz *et al.*, (2017) mencionan que hasta la fecha NCBI reporta 500 secuencias genómicas de *Helicobacter pylori* obtenidas de cepas de diferentes regiones geográficas

alrededor del mundo. El contenido de G-C es de 38.9%, el número total de pares de bases varía, *Helicobacter pylori* 26695 tienen 1,555 pb, un tamaño de 1.67 (Mb).(13)

3.2.4. Características Bioquímicas

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 *Helicobacter pylori* es capaz de oxidar la glucosa.(14)

La vía de la glucólisis-gluconeogénesis 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 pentosas fosfato y el ácido tricarbóxico están al menos parcialmente presentes. La gelatina, 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.(6)

La pared celular es lisa puede estar cubierta con una prominente glicocálix 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.(6)

El tejido blanco de *Helicobacter pylori* son la mucosa gástrica; vive principalmente en la superficie de la mucosa.(15) 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.(8)

3.3. EPIDEMIOLOGÍA

H. pylori está presente en más del 50% de la población mundial solo una pequeña parte de esta proporción de individuos infectados desarrollan alguna patología clínica que incluye úlceras gástricas, cáncer gástrico y MALT asociado a mucosa gástrica. La prevalencia de la infección está decreciendo en países desarrollados mientras que en países en vía de desarrollo permanece en un 80%.(16) En un estudio realizado por Bravo *et al.*, (2003) reportan una prevalencia de 69.1% en 16 ciudades de Colombia sin diferencias significativas según el género. Un estudio realizado por Correa *et al.* en el año 2015, determinaron la prevalencia de *H. pylori* en la ciudad de Medellín, está fue de 65% menor que la presentada por Bravo *et al.*(17)(18) La prevalencia de la enfermedad, se ha relacionado con el nivel de virulencia de la cepas y factores vinculados al huésped, es por esto, que la infección puede iniciar desde edades muy tempranas sin presentar sintomatología aparente y puede pasar toda la vida sin tratamiento o generar rápidamente enfermedades asociadas.(19) Por ejemplo, hay reportes en la literatura de mayor prevalencia de las cepas citotóxicas (cagA+, cagE+ y vacA s1/m1,) en pacientes con cáncer, metaplasia y úlcera en comparación con la observada en pacientes con gastritis no atrófica, lo que ha caracterizado los vacA s1/m1 y cagA como marcadores de virulencia.(20,21)

3.4. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN

Para el diagnóstico de la infección hay varios métodos que se pueden emplear a fin de revelar la presencia de *H. pylori*: directos/invasivos e indirectos/ no invasivos. Los invasivos requieren endoscopia y muestras de biopsia de mucosa gástrica y prueba rápida de la ureasa (PRU), examen histológico (EH), cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los métodos no invasivos incluyen la prueba de la urea en el aliento (urea breathtest: UBT), la demostración de antígenos de *H. pylori* en materia fecal (*H. pylori* stool antigen test, *H. pylori* SA test) y las pruebas serológicas que se basan en la detección específica de anticuerpos anti- *H. pylori*. En la tabla 1 se muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos anteriormente mencionados. Por esta razón el Grupo Europeo de estudio de *Helicobacter* (European Helicobacter Study Group) propuso adoptar como estándar de oro por lo menos dos pruebas diferentes positivas. (22–25)

Tabla 1, sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnósticos de *Helicobacter pylori*. (26)

Método	Sensibilidad	Especificidad
Test Rápido de la Ureasa	92-97%	90-95%
Cultivo	oscila de 60-98%	100%
Histología	85% al 90%	casi del 100%
Antígenos de <i>H. pylori</i> en heces fecales	>90%	>90%
Prueba de aliento con urea marcada con C13	88% a 95%	95% a 100%
Serología	90% a 100%	Varía entre 76% a 96%

EXÁMENES NO INVASIVOS

3.4.1.1. Serología

La resolución espontánea de la infección por *H. pylori* parece ser un evento muy infrecuente. Mediante ELISA se detectan IgG o IgA dirigidas contra varios antígenos específicos de *H. pylori*. La sensibilidad y especificidad superan el 90% y la erradicación de *H. pylori* se asocia a una lenta pero progresiva caída en los títulos, de modo que la mayoría de las pruebas serán negativas seis meses o un año después de una erradicación efectiva. La reinfección se asocia a una nueva elevación de los títulos.(27)

3.4.1.2. Pruebas en aire espirado (Breath Test)

Utilizando C 13 no radiactivo o C 14, que puede ser leído en un contador de centelleo, se detecta la descomposición, por la ureasa del *H. pylori*, de la urea marcada ingerida por el paciente. La sensibilidad y la especificidad son comparables a la serología, con la ventaja de poder confirmar la erradicación cuatro semanas después de terminada la terapia, sin necesidad de repetir la endoscopia.(27)

3.4.2. EXÁMENES INVASIVOS

3.4.2.1. Prueba de ureasa en biopsia antral

Constituye el método más rápido y práctico para detectar el *H. pylori* en pacientes sometidos a endoscopia. La ureasa producida por el *H. pylori* convierte la urea a amonio y CO₂, lo que modifica el pH del medio y provoca el cambio de color que define la reacción como positiva. Su sensibilidad y especificidad son comparables a las de los métodos anteriores. Un problema adicional lo constituye la posibilidad de falsos positivos debido a pinzas de biopsia o endoscopios contaminados.(27)

3.4.2.2. Histopatología

Constituye el Gold standard para definir la presencia o ausencia de *H. pylori*, tiñendo la muestra con Giemsa. Debe tomarse la muestra en mucosa antral sana, evitando la región prepilórica y la parte más baja de la curva menor. Es de utilidad en el diagnóstico inicial.

3.4.2.3. Características del cultivo *In vitro*

H. pylori es un microorganismo exigente que requiere medios complejos de crecimiento; estos medios deben ser suplementados con sangre o suero de cordero, oveja o caballo; estos suplementos actúan como fuentes adicionales de nutrientes y los protegen de los efectos tóxicos de cadenas largas de ácidos grasos. La anterior función mencionada también la realizan otros suplementos como IsovitaléX o carbón activado.(28)

El tiempo que tarda *H. pylori* en formar colonias es entre cuatro y siete días en condiciones de 5 a 10 % de O₂, de 5 a 10% de CO₂ y el 80 a 90% de N₂, humedad 95% y temperatura de 35 a 37°C. Comúnmente se usan medios sólidos como Columbia o brucella suplementados con sangre lisada o normal y/o suero fetal bovino; para realizar un aislamiento primario de este microorganismo, se adicionan antibióticos como el suplemento Dent (vancomicina, trimetoprim, polimixina B y amfotericina B) y como alternativa se emplea el suplemento Skirrow. También se utilizan medios líquidos tales como Mueller-Hinton o cerebro corazón suplementados con 2-10% de suero bovino o 0.2-10% de IsovitaléX adicionando como suplemento Dent o Skirrow.(29–31)

Cuando un cultivo alcanza la fase estacionaria, la dinámica del crecimiento disminuye rápidamente, ocurriendo un cambio morfológico a forma cocoide. Cuando el cultivo se ha

prolongado por mucho tiempo, no hay un incremento en el tamaño de colonia pero el cultivo transicional a una forma cocoide, siendo esta un estado no cultivable.(32)

3.4.2.4. Cultivo

El medio de cultivo es considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de *H. pylori*. La ventaja principal que posee este método es que puede estudiar la sensibilidad de las cepas a distintos agentes antimicrobianos y realizar distintos estudios con la cepa obtenida en dicho método; como desventaja se destaca que es lento para el diagnóstico por lo que puede demorarse varios días.(33) Este desempeña un papel importante en los laboratorios de microbiología, ya que proporciona las condiciones nutricionales necesarias para que los microorganismos crezcan y se reproduzcan. Cuando se habla de cultivo primario hace referencia a la primera siembra de un tejido o de una muestra.

El cultivo de *Helicobacter pylori* es el método más específico en el diagnóstico de la bacteria, la sensibilidad de este se encuentra entre el 70% y 95% cuando se trata de material gástrico obtenido mediante biopsia, esto puede variar en relación a la toma, transporte y almacenamiento de la muestra, el medio de cultivo seleccionado y la incubación en cuestiones de porcentaje de dióxido de carbono y humedad, al igual que la inexperiencia en el cultivo de *H. pylori*. Normalmente, la muestra para el cultivo de *H. pylori* es la biopsia antral, debido a que el microorganismo se encuentra habitualmente en esa zona gástrica, exceptuando los pacientes tratados con inhibidores de bomba de protones y antihistamínicos en los cuales el microorganismo migra a cuerpo; en el transporte y conservación de la muestra se conoce que *H. pylori* es una bacteria delicada y al momento de procesarla se debe realizar de forma rápida, una vez se haya obtenido. (34)

El uso de inhibidores de bombas de protones puede ser uno de los factores que disminuya la sensibilidad del cultivo debido a que el consumo de estos inhiben el ácido gástrico suprimiendo así el crecimiento de *H. pylori* por efecto del pKa de la ureasa de la bacteria, disminuyendo la densidad de *H. pylori* a nivel de la mucosa gástrica.(35)

Además de *H. pylori*, *Helicobacter heilmannii* es la bacteria más común en la mucosa gástrica humana. *H. heilmannii* se encuentra generalmente en las células Foveolares asociadas con gastritis crónica leve, mientras que *H. pylori* se encuentra generalmente en el epitelio de la superficie asociada con gastritis severa. El contacto con las células epiteliales suele ser más superficial para *H. heilmannii* que para *H. pylori*. Ocasionalmente, *H. heilmannii* y *H. pylori* se encuentran simultáneamente.(36)

El cultivo por impresión consiste en el primer contacto de la mucosa del tejido obtenido con el medio de cultivo, es decir, un frotis del tejido en el medio dejando en el parte de la mucosa que recubre el tejido; también se puede realizar un cultivo primario por medio de la maceración de la muestra suspendida en solución salina y su posterior siembra en el medio de cultivo apropiado.

El sistema actualizado de Sydney recomienda que las biopsias deben ser tomadas a partir de cinco sitios diferentes (dos de antro, dos de cuerpo y una de incisura angularis). La toma de biopsia se puede realizar en diferentes zonas del estómago como antro cuerpo o fondo como se ha nombrado anteriormente, en algunos estudios se dice que la zona antral o angularis son altamente sensibles para detectar la infección por *H. pylori*; mientras que en otros estudios se evidencio que la zona con mejores resultados fue cuerpo. (37)

3.4.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa

Por su sensibilidad y especificidad podría transformarse en el método estándar futuro, aunque la ubicuidad de *H. pylori* puede generar problemas por falsos positivos. La posibilidad de estudiar diversos tipos de muestras, incluyendo tejido fijado en parafina, le abre importantes perspectivas en estudios retrospectivos y prospectivos.(27)

3.4.2.6. Helico Blot 2.1 Kit

Es un test serológico cualitativo usado para detectar anticuerpos de tipo IgG para antígenos específicos del *H. pylori*. (38)

A pesar de ello es habitual en la práctica clínica diaria usar una sola prueba para el diagnóstico de la infección, y ante esta situación lo importante es la elección de la “prueba correcta”, la cual debe considerar varios aspectos como la sensibilidad, especificidad, la situación clínica, la disponibilidad y costos de la prueba.(27)

La selección de la prueba diagnóstica debe considerar varios aspectos como la sensibilidad, especificidad, la condición clínica, la disponibilidad y costos de la prueba. En este estudio se utilizó como prueba de referencia el criterio de cultivo positivo o la concordancia de al menos dos métodos positivos (PRU, EH y la PCR). Aunque el cultivo tiene 100% de especificidad, la sensibilidad es variable. Existen numerosas causas que explican esta variabilidad como lo describen diferentes autores.(22,23,39)

La baja sensibilidad del cultivo en nuestro estudio se podría explicar por el tiempo que permanecieron las biopsias en la sala de endoscopia antes de ser transportadas al laboratorio. *H. pylori* es un microorganismo lábil y el procesamiento de la muestra debe realizarse de una forma rápida una vez que esta ha sido obtenida. *H. pylori* permanece viable en suero salino hasta 6 h o hasta 48 h si se conserva en nevera a 4° C en medio semisólido. No obstante, parece que la mejor alternativa es procesar la biopsia durante las cuatro horas posteriores a la recolección de la muestra.(40)

3.5. MEDIOS DE CULTIVO

Helicobacter pylori requiere de medios enriquecidos para ser cultivado; se puede cultivar tanto en medios sólidos como en medios líquidos. (41) Para el cultivo de *Helicobacter pylori* se utilizan medios base como:

- **Medio Tripticasa de Soya (TSA) o (TSB); Caldo Brucella (BB) o Agar Brucella (BA):** son medios utilizados con propósitos generales; la adición de sangre permite el aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.(42)
- **Caldo Mueller-Hinton (MHB) Y Agar Mueller Hinton (MHA):** Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los

antimicrobianos. Además, es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes. (43)

- **Agar Columbia:** Es una excelente base para el crecimiento de microorganismos exigentes y para la buena visualización de hemólisis con el agregado de sangre.(44)
- **Agar Skirrow:** Medio selectivo utilizado para el aislamiento de especies de *Campylobacter*.(45)
- **Agar Charcoal Campylobacter:** Es un medio selectivo para el aislamiento primario de especies de *Campylobacter*.(46)
- **Agar Johnson-Murano:** Medio selectivo para especies de *Campylobacter* y *Arcobacter* spp.(46)
- **Helicobacter pylori especial peptona (H. PYLORISP) y Medio Glupczynski:** Medios selectivo para *Helicobacter pylori*.(44)

En un estudio realizado por Botero. J., Cardona. M. en el 2017, donde buscaban comparar diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *Helicobacter pylori*, evaluaron tres medios de cultivos diferentes (A, B, C) con composiciones diferentes (tabla 2); la evaluación se realizó inoculando 100µl de diferentes aislamientos de *H. pylori* que se encontraban conservados en viales con caldo brucella y glicerol a -80°C. El método utilizado fue siembra en superficie (Figura 2).

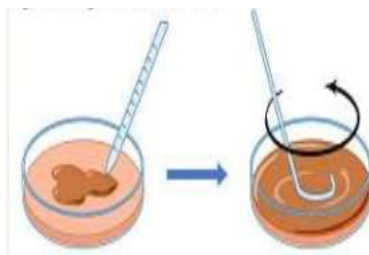


Figura 2, Siembra por superficie, (Izurieta, N.)

Tabla 2, Medios de cultivo A, B y C a evaluar

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

La tasa de recuperación de los medios A y C fue de un 52.54% mientras que el medio B presento una tasa de recuperación un poco más baja con un total de 45.7%; esta investigación demostró la baja sensibilidad del cultivo para recuperar *H. pylori*, ya que a pesar de utilizar tres medios de cultivo enriquecidos diferentes, la tasa de recuperación fue solo del 50%. El medio seleccionado para este proyecto fue el medio A, debido a su fácil preparación.

3.5.1. Suplementos para el crecimiento de *Helicobacter pylori*

El cultivo de *H. pylori* es complicado de realizar debido a las exigencias que tiene este microorganismo para crecer, por lo que los medios base deben de ir acompañados de suplementos que ayudan al desarrollo de *H. pylori*.

- **IsoVitaleX:** Es un suplemento definido químicamente que se utiliza como un aditivo para medios de cultivo de microorganismos nutricionalmente fastidiosos. (BD) Mejorando significativamente el crecimiento de *H. pylori*. (28,46–48)

En la siguiente tabla se muestra la composición aproximada del IsoVitaleX por 1 litro de agua purificada.

Tabla 3, Composición IsoVitaleX, (fuente casa comercial BD)

Vitamina B12	0.01g
L-glutamina	10.0g
Adenina	1.0g
Hidrocloruro de guanina	0.03g
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	0.013g
Nicotinamida adenina dinucleótido	0.25g
Pirofosfato de tiamina	0.1g
Nitrato férrico	0.02g
Clorhidrato de tiamina	0.003g
Clorhidrato de L-Cisteína	25.9g
L-cistina	1.1g
Dextrosa	100.0g

- **Rojo de Tetrazolium:** Se utiliza para visualizar la actividad respiratoria de las células; se basa en la reacción química de algunas enzimas (deshidrogenasa) que se encuentran en las células vivas con la sal de tetrazolio. Inicialmente estas sales son incoloras pero al reducirse causa una precipitación insoluble de coloración intensa (rojo) conocido como formazan. Rojo de Tetrazolium se utiliza en una prueba de viabilidad bioquímica para las semillas. (49,50)

- **Suero fetal bovino (SFB):** Es uno de los productos biológicos más empleados en el mantenimiento de cultivos celulares, ya que aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos, proteínas, vitaminas, oligoelementos y otros micronutrientes que son esenciales e indispensables para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de las células; suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos para el cultivo celular, garantizando con esto la proliferación y la adhesión celular. (51,52)

- **Extracto de levadura:** Es un producto derivado de las células de la levadura que realiza una autólisis por enzimas naturales de la misma, los extractos producidos por este método son ricos en proteínas y aminoácidos libremente disponibles, al igual que tiene un alto contenido en vitaminas del complejo B; es utilizado en una amplia variedad de medios de cultivo como fuente de nutrientes. (53)

Tabla 4, Elementos del extracto de levadura, Fuente casa comercial (MCD Lab) (72)

Elementos	%
Calcio	0.1
Magnesio	0.1
Potasio	0.7
Sodio	0.3

Tabla 5, Composición Aminoácidos del extracto de levadura (72)

Aminoácidos	Total (g/100g)
Alanina	8.7
Arginina	5
Ácido aspártico	9.7
Cistina	0.8
Ácido Glutámico	16.1
Glicina	4.9
Histidina	2
Isoleucina	5.6
Leucina	7.6
Lisina	8
Metionina	1.3
Fenilalanina	3.8
Prolina	4
Serina	4.7
Treonina	4.4

Triptófano	1.2
Tirosina	2.3
Valina	5.8

- **Ciclodextrinas:** Son oligosacáridos cíclicos obtenidos mediante la degradación enzimática del almidón, en los últimos años ha incrementado su uso en el campo de la biotecnología. Se ha demostrado que las ciclodextrinas pueden sustituir el suero en los medios sólidos y líquidos para el crecimiento de *Helicobacter pylori*, estos medios pueden ser usados para el primer aislamiento de este microorganismo de biopsias gástricas. Las ciclodextrinas reducen la concentración de sustratos o productos que son tóxicos o inhibitorio para los microorganismos. (54,55)

- **Mucina:** Es una glicoproteína de alto peso molecular, sintetizadas por células epiteliales, algunos investigadores sugieren que los medios suplementados con mucina crean un ambiente favorable para *Helicobacter pylori* ya que está degradada enzimáticamente a la mucina y puede servir como un nutriente para el crecimiento de la misma; la mucina hace que el medio de cultivo tenga un alto nivel de viscosidad proporcionando unas condiciones microaeróbicas favorables para el crecimiento de *Helicobacter pylori*, pero también puede contrarrestar el efecto inhibitorio de algunos antibióticos usados para el medio selectivo de *H. pylori*. Para mejorar el crecimiento de este en medio líquido se puede realizar una combinación de piruvato de potasio y sulfato ferroso y mucina. (56,57)

- **Extracto de microalgas:** El extracto de cianobacterias es rico en aminoácidos, proteínas, carbohidratos y diferentes minerales que son importantes para el desarrollo de los microorganismos. Se ha demostrado que se puede reemplazar el suero fetal bovino por el extracto de cianobacterias en medios de cultivo líquido para *H. pylori*, ya que aumenta el crecimiento y la viabilidad celular, retrasando las formas cocoide consideradas células viables pero no cultivables. (58)

- **Sulfato ferroso:** Permite conocer si los microorganismos son capaces de producir H₂S (ácido sulfhídrico); en el medio utilizado para cultivar *H. pylori* es usado debido a que el

hierro presente en la molécula es usado por dicho microorganismo, 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.(57,59)

- **AlbuMaX II:** Hutton usó AlbuMaX II para el crecimiento del microorganismo, y reportó un buen crecimiento en *H. pylori*. (60)

- **Almidón:** El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. Se compone principalmente de amilosa, polímero lineal formado por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlace α -1-4 y , amilopectina, un polímero ramificado de glucosa en el cual las moléculas se unen mediante enlaces glucosídicos 1-4 en su porción recta y enlaces 1-6 en sus ramificaciones. Se ha reportado en diferentes estudios un buen crecimiento de *Helicobacter pylori* en almidón. (60)

- **Sangre:** es uno de los suplementos más importantes para el crecimiento de *Helicobacter pylori* debido al contenido de hierro, se ha reportado el uso de Sangre equina y sangre de cordero, así como sangre lisada y sangre completa para la elaboración de agar sangre y agar chocolate (46,61–66)

- **Suplemento selectivo DENT:** 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 Skirrow4 en el que se sustituye la polimixina B por cefsulodina y se añade anfotericina B para inhibir las especies de *Candida* (Oxoid).

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. La provisión de un buen medio selectivo para *H. pylori* ayudará a establecer el papel de este organismo en la etiología de la enfermedad gástrica. (TOKU-E)

Tabla 6, Composición DENT (Fuente Casa comercial Oxoid).

Contenido del vial.	Por vial.	Por litro.
Vancomycin	5.0mg	10.0mg
Trimethoprim	2.5mg	5.0mg
Cefsulodin	2.5mg	5.0mg
Amphotericina B	2.5mg	5.0mg

3.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

3.6.1. Ureasa

La ureasa es una enzima del grupo de las amidas, escinde enlaces C–N no peptídicos, cataliza la conversión de urea a amonio y carbamato. (67) 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. (68,69) Es un factor esencial para la colonización, ya que la actividad de dicha enzima proporciona un microambiente neutral para los microorganismos en el lumen gástrico. La ureasa es la enzima más abundante generada por *Helicobacter pylori*, tiene un peso molecular de 550kDa y está formada por dos subunidades UreA (30kDa) y UreB (62kDa).

El hábitat natural de *H. pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad, el mecanismo que usa para protegerse consta de acumular una gran cantidad de ureasa en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que hidroliza la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono, necesita de iones níquel Ni²⁺ para su acción. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 o 7 en su entorno y neutralizando el ácido clorhídrico del estómago, lo que ocasiona de manera transitoria aclorhidria con un pH gástrico neutro; así pues este entorno le proporciona un microambiente que le permite sobrevivir mientras se mueve para llegar al epitelio gástrico. En las pruebas de detección típicas se adiciona un indicador de pH que vira de color con la alcalinización de la solución provocada por la liberación de los iones de amonio. (70)

3.6.2. Catalasa

La enzima catalasa, es una de las enzimas que se pueden encontrar en todos los seres vivos, es necesaria para descomponer el peróxido de hidrogeno y genera agua y oxígeno; en una prueba de laboratorio se visualiza con la producción de burbujas en la solución. *H. pylori* es una bacteria microaerófila vulnerable a la toxicidad de O₂, la catalasa cataliza la eliminación de las especies tóxicas del oxígeno permitiéndole sobrevivir a estos ambientes. (71)

3.6.3. Oxidasa

La reacción de la oxidasa se debe a un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular; de este modo el oxígeno actúa como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. La enzima está presente en aerobios, aerobios facultativos y microaerófilos pero es raro que se encuentren en anaerobios estrictos. Para la identificación bacteriana, la prueba de la oxidasa se fundamenta en que en presencia de oxígeno atmosférico la enzima citocromooxidasa presente en el microorganismo, oxida el reactivo fenilendiamina, encontrada en las tirillas utilizadas como test de oxidasa, y forma un compuesto de color púrpura (indofenol).(72)

3.6.4. Tinción de Gram

La aplicación de la tinción de Gram consiste en añadir cuatro reactivos en el siguiente orden Cristal violeta (2 min), Lugol (2 min), acetona (15 seg) y por último safranina o fucsina durante (2 min). *Helicobacter pylori* es Gram negativa, indica que sus colonias se observan de color rosa como resultado de la membrana externa y la delgada pared de peptidoglicano, su morfología son bacilos curvados cuando se encuentra viable (Figura 3); la morfología cambia a cocoide en medios de cultivo viejos que han sido incubados por más de 7 días. (73)

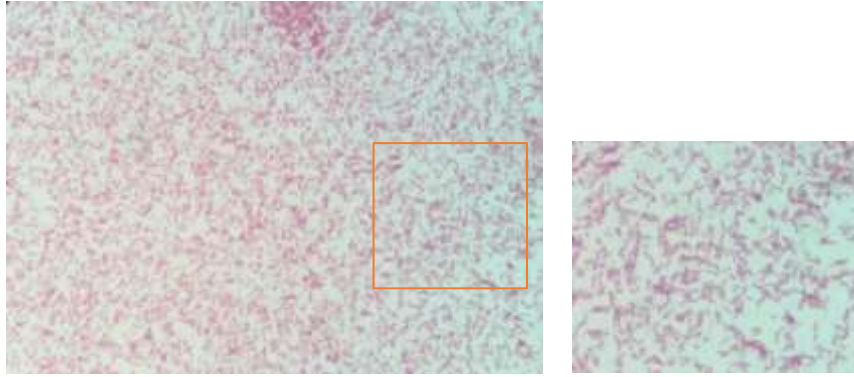


Figura 3, Microscopia de H. pylori, imagen tomada en el laboratorio de microbiología de la Universidad Libre Pereira.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL:

Comparar diferentes metodologías de siembra y zonas de toma de muestra gástrica para la detección de *H. pylori* por cultivo en pacientes que asisten a endoscopia de las ciudades de Pereira y Manizales

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia de detección de *Helicobacter pylori* mediante dos metodologías de siembra por cultivo en la población de estudio.
- Determinar la frecuencia de detección de *H. pylori* según la zona de muestreo de la mucosa gástrica en la población de estudio
- Establecer si hay diferencias en la frecuencia de detección de *H. pylori* según la metodología de siembra en la población estudio.
- Establecer si hay diferencias en la frecuencia de detección de *H. pylori* según la zona de muestreo de la mucosa gástrica en la población de estudio.

5. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo de corte transversal, llevado a cabo en las ciudades de Pereira y Manizales en un periodo de tiempo de enero a mayo del 2018.

5.2. MUESTRA POBLACIONAL:

Pacientes mayores de edad que asistieron a endoscopia digestiva alta en la ciudad de Pereira (Centro de Especialistas de Risaralda) y ciudad Manizales (Clínica San Marcel), el gastroenterólogo determinó cuales pacientes ameritaban toma de biopsia, los cuales debían cumplir con criterios de inclusión (mayor de 18 años, no consumo de ningún tipo de medicamento 15 días antes del procedimiento, aceptación voluntaria y la firma del consentimiento informado -ANEXO 1) y exclusión (embarazadas, lactantes y/o inmunosuprimidas).

5.3. TOMA DE MUESTRA

De cada paciente se tomaron biopsias (antro -A-, cuerpo -C- y fondo -F-). Las muestras fueron tomadas por los gastroenterólogos y almacenadas en caldo BHI con glicerol al 20% (medio de transporte), suplementado con antibióticos (vancomicina 10 mg/L, polimixina B 0,33 mg/L, bacitracina 1,07 mg/L y anfotericina B de 5 mg/L). Las biopsias se transportaron en forma refrigerada desde las unidades de endoscopia al laboratorio de microbiología para su posterior procesamiento.

5.4. CULTIVO DE LAS BIOPSIAS

Las biopsias se sembraron en agar Columbia (MERCK) suplementado con Sangre, IsoVitaleX y los mismos antibióticos utilizados en el medio de transporte e incubado bajo condiciones microaerófilas (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) a 37°C durante 7 a 14 días.

Las muestras se consideraron positivas si las UFC (unidades formadoras de colonia) eran bacilos Gram negativos en forma de espiral o curvo, oxidasa y ureasa positiva.

Coloración de Gram: mediante un asa microbiológica se tomó una colonia del medio de cultivo se llevó a un portaobjeto que previamente contenía solución salina, para ser sometido a los reactivos adecuados para este procedimiento, en el orden y tiempo establecidos anteriormente.

Pruebas bioquímicas: de la misma forma que en la coloración de Gram, se tomó una colonia para cada prueba bioquímica, en donde para oxidasa la colonia se dispuso en una tirilla y para ureasa la colonia se dispuso en un tubo eppendorf que contenía urea al 10% con el indicador de pH rojo de fenol.

5.5. METODOLOGÍAS DE SIEMBRA POR CULTIVO

5.5.1. Siembra de las biopsias por impresión

El medio de cultivo se dividió en tres segmentos (Figura 3) para sembrar las tres diferentes biopsias (A, C, F) o sin dividirse cuando era una sola biopsia. Las biopsias se retiraron del medio de transporte con una aguja estéril y el moco de la biopsia se froto sobre la superficie del medio de cultivo. Posteriormente se incubaron como se describe previamente.



Figura 3, Corte del medio de cultivo en tres secciones para las siembras de biopsias por impresión.

5.5.2. Siembra de las biopsias por MACERADO

En este caso se utilizó un medio de cultivo por biopsia (A, C, F). Las biopsias se sumergieron en 500 µL de solución salina estéril y se maceraron con un homogeneizador manual (Deltaware Pellet Pestle), del homogenizado se tomaron 100 µL y se inocularon sobre toda la superficie de los medios de cultivo. Las condiciones de incubación fueron las mismas descritas previamente y el tejido restante de la maceración se almaceno a -80°C en caldo BHI con glicerol.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La base de datos se realizó en una hoja de Excel en donde se consignaban los resultados de positivo o negativo para la bacteria según las diferentes zonas de la mucosa gástrica y la metodología de siembra. El análisis estadístico para establecer si había diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes zonas de mucosa gástrica y las metodologías de siembra se realizó con el paquete estadístico Statgraphics a través de un análisis multifactorial ANOVA.

5.7. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS:

El proyecto marco “Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *H. pylori* en pacientes dispépticos del eje cafetero” con código 14010102, cuenta con aval bioético del comité de bioética de la UTP. (ANEXO 2)

6. RESULTADOS

6.1. MUESTRA POBLACIONAL

Entre los meses de Enero y mayo del 2018 se obtuvieron 41 pacientes que cumplieron con los requisitos establecidos para ingresar al estudio.

6.2. TOMA DE MUESTRA

De los 41 pacientes, 30 eran de la ciudad de Pereira (73.2%) y 11 en la ciudad de Manizales (26.8%). En la tabla 7 se describen las variables de las muestras tomadas.

Tabla 7, Variantes de las muestras

Variables	Nº Pacientes	%	IC
A-C-F	38	92.7	[84.7-100%]
A+C+F	2	4,9	[43.5-73.6%]
A+C	1	2,4	[43.5-73.6%]

A-C-F muestras por separado por vial; A+C+F muestras en un solo vial; A+C muestras en un solo vial.

6.3. FRECUENCIA DE DETECCIÓN POR CULTIVO DE IMPRESIÓN Y MACERADO

En la tabla 8 se describen las frecuencias de detección de las dos metodologías de siembra.

Tabla 8, Frecuencia del cultivo por Impresión

Metodología de cultivo	Positivo	Negativo	Total de muestras	Porcentaje (%)	Intervalo de confianza
Impresión	23	18	41	56.1	[41-71.3%]
Macerado	24	17	41	58,5	[43-74%]
Consolidado	28	13	41	68.3	[54 – 82.6%]

El porcentaje y el intervalo de confianza corresponden al número de muestra con presencia

6.4. FRECUENCIA DE DETECCIÓN POR ZONA GÁSTRICA Y METODOLOGÍA DE SIEMBRA

En la tabla 9 se describen las frecuencias de detección de las dos metodologías de siembra.

Tabla 9, Descripción de las frecuencias de cada zona gástrica mediante las dos metodologías de siembra empleadas.

Metodología de siembra	Macerado			Impresión			
	Z. G	n	F %	IC	Z.G	n	F%
Antro	20 (38)	52.6	[36.7-68.5]	Antro	22 (38)	57.9	[42.2-73.6]
Cuerpo	22 (38)	57.9	[42.2-73.6]	Cuerpo	21 (38)	55.3	[39.4-71]
Fondo	19 (38)	50	[34,1 – 66]	Fondo	23 (38)	60.5	[45-76]

Z.G: Zona gástrica, n: número de pacientes positivos con respecto al total, F%: porcentaje de frecuencia, IC: Intervalos de confianza.

6.5. Comparación de métodos de siembra

Con los datos obtenidos previamente en la frecuencia de la infección de la población estudiada, se obtuvo por maceración 58.5% (24) positivos con respecto a un total de 41 pacientes; en contraste a lo obtenido en cultivo por Impresión el cual fue un 56.1% (23) positivos.

H0: No existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

H1: Existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

Regla de decisión: si $p\text{value} < \alpha (0,05)$ se rechaza H0

Tabla 10, tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0487805	2	0,0243902	0,10	0,9087
Intra grupos	30,5366	120	0,254472		
Total (Corr.)	30,5854	122			

Tabla 11, resumen estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Macerado	41	0,560976	0,502433	89,5642%
Impresión	41	0,536585	0,504854	94,0865%
Total	82	0,54878	0,500677	91,2345%

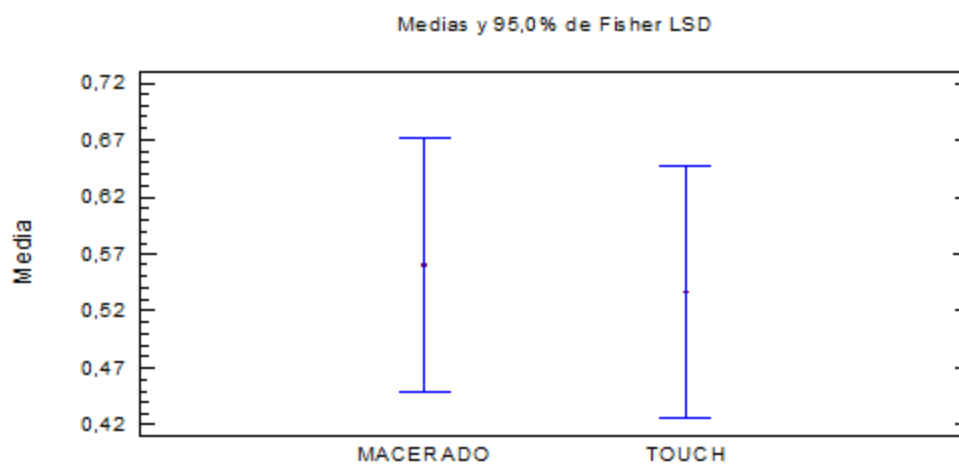


Figura 4, medias MACERADO vs IMPRESIÓN

6.5.1. Análisis estadístico

La razón-F, que en este caso es igual a 0,0480769, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, se puede inferir con un nivel del 95,0% de confianza que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables analizadas de manera comparativa.

6.6. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN IMPRESIÓN Y MACERADO

H0: No existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

H1: Existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

Regla de decisión: si $p\text{value} < \alpha (0,05)$ se rechaza H_0

Tabla 12, tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0487805	2	0,0243902	0,10	0,9087
Intra grupos	30,5366	120	0,254472		
Total (Corr.)	30,5854	122			

Tabla 13, resumen estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
A Impresión	41	0,536585	0,504854	94,0865%
C Impresión	41	0,512195	0,506061	98,8024%
F Impresión	41	0,560976	0,502433	89,5642%
Total	123	0,536585	0,500699	93,3121%

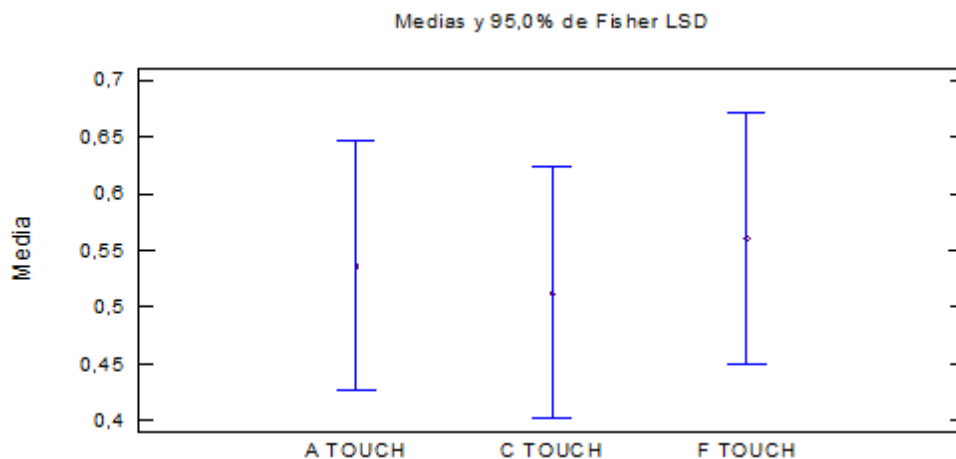


Figura 5, medias Impresión

6.6.1. Análisis estadístico

La razón-F, que en este caso es igual a 0,0958466, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, se puede inferir con un nivel del 95,0% de confianza, que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables para la metodología IMPRESIÓN (A, C y F).

6.7. COMPARACIÓN DE A, C Y F PARA MACERADO

H0: No existe diferencia significativa en los resultados de la detección de *H. pylori* en las muestras A, C y F.

H1: Existe diferencia significativa en los resultados de la detección de *H. pylori* para al menos 1 de las muestras A, C y F.

Regla de decisión: si $P\text{value} < \alpha$ (0,05) se rechaza H0

Tabla 14, tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,113821	2	0,0569106	0,22	0,8005
Intra grupos	30,6341	120	0,255285		
Total (Corr.)	30,748	122			

Tabla 15, resumen estadístico

	Recuento	Promedio	D.E	C.V
A macerado	41	0,487805	0,506061	103,742%
C macerado	41	0,536585	0,504854	94,0865%
F macerado	41	0,463415	0,504854	108,942%
Total	123	0,495935	0,502028	101,229%

DS: Desviación estándar, C.V: Coeficiente de variación

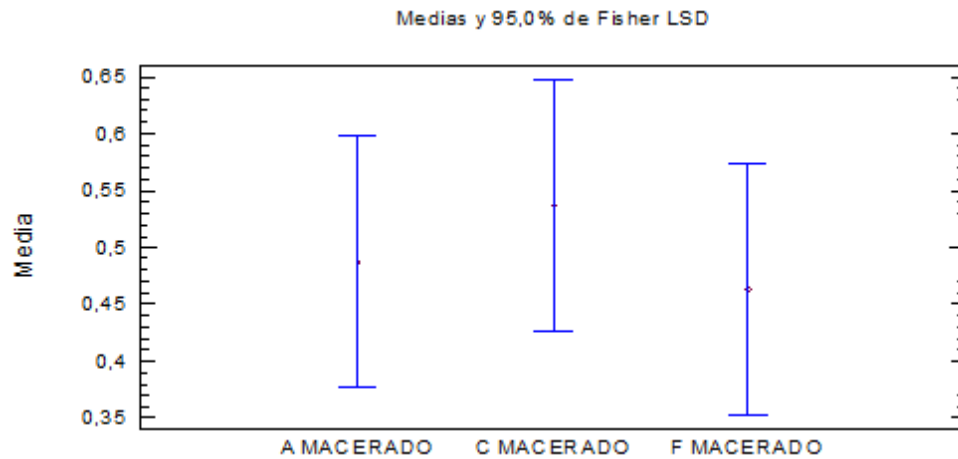


Figura 6, figura de medias MACERADO

6.7.1. Análisis estadístico

La razón-F, que en este caso es igual a 0,22293, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, se puede inferir con un nivel del 95,0% de confianza que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables para la metodología MACERADO (A, C y F).

7. DISCUSIÓN

Según Hoda M. Malaty en su revisión del 2007 acerca de la epidemiología de la infección por *H. pylori*, la frecuencia de infección en los países desarrollados oscila entre el 20-40%, y en los países en vía de desarrollo entre 70-90%.(74) Junto a esto, en Cuba se realizó una investigación de infección por *H. pylori* en pacientes atendidos en consulta de gastroenterología, donde se encontró que el 85% eran afectados por el microorganismo.(75) Los resultados obtenidos no corresponden a los porcentajes esperados para una zona poblacional como la estudiada, debido a que la frecuencia del consolidado (68.3%) se encuentra por encima de los porcentajes para países desarrollados y por debajo del porcentaje esperado para países en vía de desarrollo; esto puede deberse a que el medio de cultivo en el que se realizó el estudio fue obtenido a partir de una investigación previa “Comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *H. pylori*”, donde no se obtuvo una tasa de recuperación totalmente satisfactoria, de lo que se puede deducir que el medio utilizado no contó con la sensibilidad esperada para la detección dependiente de algunos factores que pudieron afectar la muestra, como en la toma de muestra, transporte, almacenamiento, auto-medicación, inconvenientes en el transporte, inexperiencia del lector o por fallas en las condiciones de microaerofilia.

En un estudio realizado por Daisy Azaña *et al* en el 2012, se evidenció que la sensibilidad de la biopsia gástrica se puede ver afectada por el uso de inhibidores de bombas de protones (IBP), debido a que estos inhibidores afecta la densidad de *H. pylori* en el tejido.(35) Existen diferentes estudios donde se considera que el uso de IBP aumenta la tasa de falsos negativos en la detección de *H. pylori* por biopsias gástricas.(76,77) Los resultados negativos obtenidos en el estudio, pudieron ser afectados debido a que probablemente los pacientes no interrumpieron la toma de medicamento como IBP y antibióticos, por lo cual existe la posibilidad que de que en el estudio se encuentren pacientes positivos no detectados por el método de diagnóstico.

Como se dijo anteriormente, *H. pylori* puede encontrarse en la mucosa gástrica junto con otra especie de *Helicobacter*; esto es debido a que la adherencia a la mucosa gástrica es un paso fundamental para la colonización de *H. pylori*; la bacteria nada a través de la mucosa gástrica viscosa, impulsada por su flagelos polares y se adhiere a las células epiteliales gástricas. Dado

que el epitelio gástrico y la mucosidad están en recambio continuo y la peristalsis (una serie de contracciones musculares, como oleadas) asegura un movimiento constante de los alimentos y los desechos celulares, *H. pylori* ha desarrollado mecanismos de adherencia y colonización para mantenerse específicamente en la mucosa gástrica. (36,78) debido a la información expuesta y a los resultados obtenidos, se puede deducir que el método por impresión de la mucosa gástrica, la cual alberga mayor densidad de dicha bacteria, es un método eficiente para la detección de *H. pylori* al igual que por el método de maceración; sin embargo, en este estudio no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la comparación de las dos metodologías implementadas, lo cual indica que ambos son similares en la detección de *H. pylori*; pero si se realiza un análisis más detallado del número de pacientes positivos en ambas metodologías, se puede encontrar que si no se hubiera realizado la implementación del método por macerado, un paciente positivos para *H. pylori* no hubiese ingresado al estudio.

Debido a los resultados expuestos anteriormente, se deduce que cualquiera de los dos métodos de siembra son útiles para el diagnóstico por cultivo de *H. pylori*. Las ventajas que reluce este estudio son que debido al gasto de medios de cultivo por el método de maceración, es más económico realizar el método de siembra por impresión.

Según las recomendaciones dadas por el sistema actualizado de Sídney, para una evaluación optima de la gastritis y la infección por *H. pylori*, se deben obtener las muestras de biopsia de antro, cuerpo e incisura angularis(79), pero contrario a esto, las investigaciones que han evaluado los diferentes métodos de detección de la bacteria han evidenciado la especificidad y la sensibilidad de más de 90% de biopsia antral;(80,81) aunque en otros estudios también se identificó que la muestra de antro no fue suficiente y se determinó que cuerpo era un mejor sitio para la detección de *H. pylori*.(37) los resultados obtenidos en este estudio, demostraron que contrario a la literatura consultada, antro no fue la mejor zona para la detección de *H. pylori*, dando mejores resultados en cuerpo para el método por macerado y en fondo por impresión. Aunque, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las zonas gástricas en ambas metodologías, cabe destacar que al tomar las tres biopsias se minimizo el riesgo de que pacientes infectados no ingresaran al estudio por falsos negativos.

También, en una investigación denominada “Detección de sitios intragástricos en el cual *Helicobacter pylori* evade el tratamiento con amoxicilina y cimetidina”, se encontró mediante métodos convencionales y PCR la presencia de *H. pylori* en fondo 13, cuerpo 10 y antro tres de 22 pacientes como total, donde la diferencia entre fondo y antro fue significativa, por lo cual concluyeron en el estudio que la Amoxicilina y Cimetidina son relativamente efectivos para eliminar a *H. pylori* de la zona gástrica de antro, pero este tratamiento no lo elimina, sino que obliga a la bacteria a un desplazamiento hacia las zonas gástricas de cuerpo y especialmente fondo. (82) A pesar de que en este estudio no hubo diferencia significativa entre antro, cuerpo y fondo, si se detectó mayor porcentaje de frecuencia en cuerpo y fondo en ambos métodos. La investigación anteriormente descrita permite establecer un fundamento para suponer que la alta detección de *H. pylori* en las zonas de cuerpo y fondo se debió a la probabilidad de que los pacientes ingresados al estudio no cumplieron con uno de los requisitos de no continuar consumiendo medicamentos.

Debido a la literatura investigada y a los resultados obtenidos, cabe la controversia sobre que sitio de biopsia es mejor para la detección y así obtener un mejor diagnóstico de *H. pylori*.

8. CONCLUSIONES

- La detección de *H. pylori* por cultivo fue menor a lo esperado en una población donde se considera que debe estar por encima del 80%.
- El método de maceración permitió detectar un paciente más frente al método de impresión, lo cual aseguró el ingreso del individuo al estudio.
- Todavía se encuentran deficiencias en la detección de *H. pylori* por cultivo, debido al bajo porcentaje de frecuencia del consolidado (68.3%) encontrado en la población de estudio.
- El hecho de haber tomado más de una muestra de zona gástrica, aumentó la detección de *H. pylori* tanto por el método maceración como por el método por impresión.
- Gracias a la implementación de ambas metodologías, cuatro pacientes adicionales pudieron ingresar al estudio, los cuales hubiesen sido descartados utilizando un solo método de detección de la infección.

9. PERSPECTIVAS

- Debe seguir en curso una investigación que permita mejorar la sensibilidad del cultivo para la detección de *H. pylori*, independientemente de que el individuo este medicado.
- Poder implementar los análisis de sangre para comprobar que los pacientes no hayan consumido medicamentos que puedan afectar la detección de *H. pylori*.
- Mediante análisis molecular poder determinar que especie de *Helicobacter* predomina en la mucosa gástrica de la población de estudio.

10. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por permitirnos llegar hasta aquí, por hacer realidad este sueño anhelado.

A nuestra directora de trabajo de grado, Doctora Adalucy Alvares Aldana por su esfuerzo, dedicación y apoyo incondicional, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación, ha logrado con total éxito ejecución de este trabajo de grado, sin su ayuda esto no hubiera sido posible.

A nuestro co-asesor y maestro Eleazar Vargas Mena por brindarnos su apoyo y conocimiento para el desarrollo de la fase estadística del proyecto.

A la Universidad Libre seccional Pereira por brindarnos las herramientas para el desarrollo de la investigación.

A la Universidad Tecnológica de Pereira, al Doctor Jose Ignacio Moncayo y la Doctora Gina M. Guaca por brindarnos el material necesario para la ejecución del proyecto.

A nuestros padres, amigos y familiares por sus consejos, apoyo, persistencia y motivación, sin ustedes este sueño que estamos cumpliendo no sería realidad, gracias por formar parte de nosotras y por todo lo que nos han brindado.

11. ANEXOS

ANEXO 1:



Seño: ORIGINAL

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
COMITÉ DE BIOÉTICA

Código: CBE-SYR-232016



Página: 1 de 1

Pereira, 13 de Octubre de 2017

Señor
Jorge Javier Santa Cruz
Investigador Principal

El Comité de Bioética de la UTP (CBE-UTP) considera que no es necesario modificar el aval dado al proyecto "**Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos del Eje cafetero**", según acta No.16, punto 03, numeral 27 del 12 de septiembre de 2016, con código CBE-SYR-162016, porque no se hace ningún cambio sustancial al proyecto, sino que simplemente se incrementa el tamaño de la muestra, lo cual fortalece la investigación.

Carlos Alberto Isaza Mejía
Presidente del CBE-UTP

12. REFERENCIAS

1. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, et al. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis.* 2000;181(1):273–82.
2. Ahmed N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: is the debate over? *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2005;4(17).
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):449–90.
4. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984;1(8390):1311–5.
5. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol.* 1985;19(2):257–67.
6. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): American Society for Microbiology; 2001.
7. Banks L, Carbone A, Blum H, Cesarman E. *Helicobacter Pylori* Biological agents. *Fr Int Agency Res Cancer.* 2012;
8. Owen RJ. Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1995;9(3):415–46.
9. Catrenich CE, Makin KM. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1991;(181):58–64.
10. Dus I, Dobosz T, Manzin A, Loi G, Serra C, Radwan-Oczko M. 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.* 2013;67:261–8.
11. Nell S, Estibariz I, Krebs J, Bunk B, Graham DY, Overmann J, et al. Genome and

- Methylome Variation in *Helicobacter pylori* With a *cag* Pathogenicity Island During Early Stages of Human Infection. *Gastroenterology* [Internet]. 2018;154(3):612–623.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.014>
12. Micro-evolución genómica de *Helicobacter pylori*. 2010;
 13. Munoz-Ramirez, Z. Y. Mendez-Tenorio A, Kato I, Bravo MM, Rizzato C, Thorell K, Torres J. Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analysis Show *Helicobacter pylori* Strains from Latin America Have Followed a Unique Evolution Pathway. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(50).
 14. Semillero N, De NG, Investigación L De, Proyecto T, Libre U, Pereira S, et al. Comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *Helicobacter pylori*.
 15. Humans IWG o. t. E o. CR t. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans. 2010;94(1):412.
 16. Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez RL, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes Control*. 2013;24(2):209–15.
 17. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colomb Med*. 2003;
 18. Correa S, Cardona AF, Correa T, Correa LA, Garcia H. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y características histopatológicas en biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos en un centro de referencia de Medellín. *Rev Colomb Gastronterología*. 2016;31(1):9–15.
 19. Choi SS, Chivers PT, Berg DE. Point Mutations in *Helicobacter pylori*'s *fur* Regulatory Gene that Alter Resistance to Metronidazole, a Prodrug Activated by Chemical Reduction. *PLOS ONE*. 2011;6.
 20. Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y

cagE de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica*. 2005;25:325–34.

21. Galvis Arevalo A. Prevalencia de los genotipos de virulencia de *Helicobacter pylori* CagA, VacA, BabA2 e IceA en pacientes colombianos con dispepsia funcional. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.; 2010.
22. Burette A. How (who ?) and when to test or retest for *H. pylori*. *Gastroenterol Hepatol*. 1998;61:336–43.
23. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007;55(6):772–81.
24. Moncayo JI, Alvarez A, Santacruz JJ, Santacoloma M, Arturo BL, Giraldo L, et al. Evaluación de diferentes pruebas para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. *Rev Científicas América Lat*. 2011;13:23.
25. Vakil N, Vaira D. Non-Invasive Tests for the Diagnosis of *H.pylori* Infection. *Medreviews Gastroenterol Disord*. 2004;4(1):1–6.
26. Leyva LM, Belinda D, Cowan G, Luis B, Zamora OR, Linares YV, et al. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* mediante serología , histología y cultivo Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by serology , histology and culture. 2016;45(3):344–53.
27. Zuñiga JR, Bosques F, Perez G, Rolando T, Flores JP, Maldonado H, et al. Diagnostic Utility of Invasive Tests and Serology for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Different Clinical Presentations. *Inst Mex del seguro Soc*. 2006;37(1):123–8.
28. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988;7:555–8.
29. Taneera J, Moran A., Hynes SO, Nilsson HO, Al-Soud W, Wadstrom T. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. *Microbiology*. 2002;148:677–

84.

30. Skirrow MB. Campylobacter enteritis: a new” disease. Br Med J. 1977;2:9–11.
31. Reynolds DJ, Penn CW. Characteristics of Helicobacter pylori growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. Microbiology. 1994;140:2649–56.
32. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp, J.A Vandenbroucke-Grauls CM. Coccoid Forms of Helicobacter pylori Are the Morphologic Manifestation of Cell Death. Infect Immun. 1997;3672–9.
33. Pena. ESTUDIO MOLECULAR DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA Y DE LA RESISTENCIA A CLARITROMICINA EN LA INFECCIÓN POR Helicobacter pylori. [Internet]. Kas.Unibe.Ch. 2010. 211 p. Available from: http://www.kas.unibe.ch/logo2013/Abstracts/PrimoCano_Carlos.pdf
34. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori. Procedimientos en Microbiol Clínica [Internet]. 2004;1–25. Available from: www.seimc.org
35. Egoavil M, Soto L. Sensibilidad de la biopsia gástrica en la detección de Helicobacter pylori en pacientes en tratamiento con inhibidores de la bomba de. 2012;11–5.
36. Andersen LP, Wadstrom T. Helicobacter pylori: Physiology and Genetics. 2001.
37. Kim CG, Choi IJ, Lee JY, Cho S-J, Nam B-H, Kook M-C, et al. Biopsy site for detecting Helicobacter pylori infection in patients with gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2009;24(3):469–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2008.05679.x>
38. Lu CY, Kuo CH, Lo YC, Chuang HY, Yang YC, Wu IC, et al. The best method of detecting prior Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol. 2005;11(36):5672–6.
39. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of Helicobacter pylori: invasive and non-

- invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(2):299–313.
40. Cantón R, Aznar J, Cercenado E, Cisterna R, Romo FG, Rubio C, et al. Sensibilidad de microorganismos gramnegativos de infecciones intraabdominales y evolución de los aislados con β -lactamasas de espectro extendido en el estudio SMART en España (2002-2010). *Rev Esp Quimioter.* 2011;24(4):223–32.
 41. Iu LK, Leung WK, Cheng AF, Sung JY, Ling TK, Ling JM, et al. Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1998;
 42. Bessa LJ, Grande R, Di Iorio D, Di Giulio M, Di Campli E, Cellini L. *Helicobacter pylori* free-living and biofilm modes of growth: behavior in response to different culture media. 2013;
 43. Vega AE, Silva HJ, Cortinas TI. 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 J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;
 44. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol.* 2000;
 45. Krajden S, Bohnen J, Anderson J, Kempston J, Fuksa M, Matlow A. Comparison of selective and nonselective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. *J Clin Microbiol.* 1987;
 46. Cover TL. Perspectives on methodology for in vitro culture of *Helicobacter pylori*. *Methods Mol Biol.* 2012;
 47. Vega AE, Cortinas TI, Mattana CM, Silva HJ, Puig De Centorbi O. Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with cyanobacterial extract. *J Clin Microbiol.* 2003;
 48. Westblom TU, Madan E, Midkiff BR. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1991;

49. Parte C. Actividad Metabolica. Mater Didáctico. 1AD;7.
50. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169920320004>. 2006;
51. Cortés Araya YA. Efecto de la suplementación de suero fetal bovino y ácido ascórbico sobre la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (CMM) bovinas. 2013; Available from: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131544>
52. Escobar L, Morantes S, Cordero CP, Aristizábal FA. Implementación de estrategias in vitro para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2011;40(2):201–21.
53. Autolisado RM. Extracto de levadura - composición. :1.
54. Name L, Name F, Training O, Training P, Darin C, Training RO, et al. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. Rev Colomb Gastroenterol [Internet]. 2013;28(1):1–5. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572013000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es
55. Martínez G, Gómez MA. Ciclodextrinas : Complejos De Inclusión Con Polímeros. 2007;8(4):300–12.
56. Majalca-Martínez C. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. Bioquímica [Internet]. 2001;26:85–9. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611574003>
57. Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol [Internet]. 2000;38(5):1984–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86644&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Vega AE, Persia F a, Salinas-ibañez G a, Alarcón T, Estrada SMCL, Cortiñas I, et al. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Gene Expression on Abiotic Surfaces Using a Cyanobacterial Extract. 2012;6(April):1317–27.

59. Medina M. Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. Rev Invest (Guadalajara) [Internet]. 2012;2(4):1–42. Available from: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
60. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. The use of AlbuMAX II((R)) as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2012;
61. Westblom TU, Madan E, Midkiff BR. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1991;
62. Tee W, Fairley S, Smallwood R, Dwyer B. omparative evaluation of three selective media and a nonselective medium for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *J Clin Microbiol*. 1991;
63. Olivieri R, Bugnoli M, Armellini D, Bianciardi S, Rappuoli R, Bayeli PF. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J Clin Microbiol*. 1993;
64. Rajden S, Bohnen J, Anderson J, Kempston J, Fuksa M, Matlow, A. . . . et al. Comparison of selective and nonselective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. *J Clin Microbiol*. 1987;
65. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988;
66. Coudron PE, Stratton CW. actors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol*. 1995;
67. García Borges L, Rodríguez Fernández B, Aja Maza G, Pérez Carrasco JA, Russeaux Guía N, Valdés Diez L, et al. Desarrollo de una formulaci??n estable de ureasa l??quida para la determinaci??n de urea en suero. *Rev Cuba Farm*. 2014;48(3):396–404.
68. Dorrell N, Crabtree JE, Wren BW. Host-bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infectio. *Trends Microbiol*. 1998;
69. Blaser MJ. The Bacteria Behind Ulcers. *Sci Am*. 1996;

70. Cervantes-garcía E. Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad. Rev Latinoam Patol Clin Med LAB. 2016;63(2):100–9.
71. Amat Marco Aida Ivars Rodríguez IES ALCÁCER Valencia M. Cómo motivar a los estudiantes mediante actividades científicas atractivas ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA. 2014;1–6. Available from: <http://www.cac.es/cursomotivar/resources/document/2010/1.pdf>
72. Fernández Olmos A, García de la Fuente C, Saéz Nieto JA, Valdezate Ramos S. Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Vol. 37, Procedimientos en Microbiología Clínica. 2010. 1-28 p.
73. TINCIÓN DE GRAM Tinción de Gram. 1884; Available from: <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Tincion-de-Gram.pdf>
74. Malaty HM. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21(2):205–14.
75. Capote EG, Ramírez EC, Guanche H. Infección por Helicobacter pylori en pacientes atendidos en consulta de gastroenterología Helicobacter pylori infection in patients who attended the gastroenterology office. Rev Ciencias Médicas Pinar del Río [Internet]. 2014;18(3):1–9. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942014000300009
76. Dickey W, Kenny B, MacConnell J. Effect of proton pump inhibitors on the detection of Helicobacter pylori in gastric biopsies. Aliment Pharmacol Ther. 1996;
77. Logan RPH, Walker MM, Misiewicz JJ, Gummett PA, Karim QN, Baron JH. Changes in the intragastric distribution of Helicobacter pylori during treatment with omeprazole. Gut. 1995;36(1):12–6.
78. Hazell S, Lee A, Brady L, Hennessy W. Campylobacter pyloridis and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. J Infect Dis. 1986;
79. Dixon MF, Genta R, Yardley J, Correa P. Classification and Grading of Gastritis:

The Updated Sydney System. *Am J Surg Pathol.* 20(10):1161–81.

80. Cutler A, Havstad S, Ma C, Blaser M, Perez-Perez G, Schubert T. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 1995;
81. Laheij R, de Boer W, Jansen J, van Lier H, Sneeberger P, Verbeek A. Diagnostic performance of biopsy-based methods for determination of *Helicobacter pylori* infection without a reference standard. *J Clin Epidemiol.* 2000;
82. Atherton JC, Cockayne A, Balsitis M, Kirk GE, Hawkey CJ, Spiller RC. Detection of the intragastric sites at which *Helicobacter pylori* evades treatment with amoxicillin and cimetidine. *Gut.* 1995;36(12):670–4.