

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA RECUPERACIÓN DE *Helicobacter pylori*

EVALUATION OF PRODUCTIVITY OF THREE CULTURE MEANS FOR RECOVERY OF *Helicobacter pylori*

J. Navarro-Hernández, A.P. Perea-Triana, J.A. Pineda-Méndez, O. Díez-Arbeláez, M. Mercado-Reyes, A.A. Trespalacios-Rangel

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
Carrera 7 # 43-82, Bogotá, Colombia
alba.trespalacios@javeriana.edu.co*

Resumen

La infección por *Helicobacter pylori* desde su descubrimiento por los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren en 1982, ha sido uno de los fenómenos científicos de mayor importancia en la literatura biomédica mundial, ya que juega un papel significativo en la etiología y patogénesis de diversas enfermedades gastrointestinales como gastritis crónica y úlcera péptica, además de ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer gástrico. El método más específico de diagnóstico de este microorganismo es sin duda el cultivo. No obstante su sensibilidad varía notablemente en relación con diferentes variables: la colección, transporte, almacenamiento de la muestra; medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación. En este trabajo se evaluó la productividad de tres medios de cultivo para recuperar *H. pylori*, utilizando el método ecométrico. Los medios mostraron una baja productividad. Los valores de ICA fueron menores a 2,5, para cada uno de los medios de cultivo. La proporción de medios con ICA mediana y bajamente productivos fueron respectivamente los siguientes: Agar ATS: 7,6% y 92,3%, Agar BHI: 0% y 100%, Agar Brucella: 6,6% y 93,3%.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, medios de cultivo, método ecometrico, productividad

Abstract

Infection of *Helicobacter pylori* since its discovery by Australian doctors Barry Marshall and Robin Warren in 1982 has been one of the scientific phenomena of greater importance in world-wide biomedical literature. Since then, numerous investigations have been developed to study this bacterium because it plays a significant role in etiology and pathogenesis of diverse gastrointestinal diseases like chronic gastritis and peptic ulcer, in addition to being a factor of important risk for development of gastric cancer. Cultivation is the most specific method to diagnose this microorganism. Despite its sensibility it varies notably in relation to different variables: collection, transport and storage of samples; cultivation media and incubation conditions. This work evaluated the productivity of three culture media for *H. pylori* recovery by ecometric method. All culture media showed low productivity. ICA values were lower than 2,5 on all cultivation media. Culture media with ICA values of low and mid production were: Agar ATS: 7,6% and 92,3%, Agar BHI: 0% and 100%, Agar Brucella: 6,6% and 93,3%.

Key words: *Helicobacter pylori*, culture media, ecometric method, productivity.

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*), es un bacilo Gram negativo de forma espiral, mide de 2.5 a 5 micras, con 4 a 8 flagelos unipolares lo que lo hace altamente móvil. Desarrolla colonias pequeñas, grises, como gotas de rocío (Tummala *et al.*, 2007). Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono; la producción de amonio es un mecanismo importante para la supervivencia de la bacteria en un ambiente con pH tan ácido, como lo es el jugo gástrico (Rojas *et al.*, 2004). La resistencia para sobrevivir a estas condiciones extremas es un requisito previo para la supervivencia de esta bacteria en el estómago (Hofman *et al.*, 2004).

Para su desarrollo en medios de cultivo, *H. pylori* requiere de medios complejos ya sea sólidos o líquidos con suplementos como: sangre de caballo, hemoglobina, suero fetal bovino, carbón vegetal o emulsión de yema, además de nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, cloruro de sodio y bisulfito de sodio. Para una buena recuperación del microorganismo se adicionan antibióticos que minimizan la colonización de otras bacterias. Este microorganismo es de crecimiento lento, requiere de una temperatura de 35°C a 37°C en condiciones de microaerobiosis (5-10% de O₂, 5-10% de CO₂ y 80-90% de N₂), una humedad del 95%, un pH de 5,5 - 8,0 y un periodo de incubación de 3 a 10 días. (Bruce *et al.*, 1997). Dentro de los medios de cultivos sólidos más utilizados se encuentran el Agar Mueller Hinton y el Agar Columbia, suplementados con sangre o sus derivados. Otros suplementos y nutrientes usados son el suero de caballo, lisado de eritrocitos, hemina, extracto de levadura, peptona e isovitalex. Dos aspectos importantes a considerar en relación con la sangre es en pri-

mer lugar la cantidad utilizada, ya que un aumento en la proporción del 7-10% mejora significativamente el crecimiento en comparación al 5%. En segundo lugar el tipo de sangre utilizada, encontrándose un crecimiento más denso con sangre de caballo al 10% y lisada al 7% (Alarcón *et al.*, 2004). Los antibióticos adicionados a los medios de cultivo son: vancomicina, trimetropim sulfa, polimixina y anfotericina B (Kusters *et al.*, 2006).

Para la recuperación de la bacteria pueden utilizarse medios no selectivos y medios selectivos, dentro de los medios no selectivos se encuentran: Agar Columbia con 10% de sangre caballo o cordero, Agar chocolate con 1% de Isovitalex, Agar Columbia con 10% de yema de huevo, 1% Isovitalex y 0,04% de cloruro de trifetil tetrazolium; Agar infusión cerebro y corazón con 10% de suero fetal bovino, 1% de extracto de levadura y 0,04% de cloruro de trifetil tetrazolio. Dentro de los medios selectivos se encuentran: Agar de Wilkins-Chalgren con 10% de sangre (caballo o cordero) suplementado con antibiótico, Agar Columbia con 10% de sangre (caballo o cordero) suplementado con antibiótico y Agar Pylori, el cual contiene suero de caballo, extracto de levadura y suplementado con antibiótico, diseñado para aislamiento primario de *H. pylori* (Alarcón *et al.*, 2004). La identificación final del microorganismo se hace a través de la morfología de la colonia, tinción de Gram y características bioquímicas, en donde la prueba de la catalasa, oxidasa y ureasa son positivas.

Teniendo presente que en Colombia el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se realiza en biopsias tomadas por endoscopia, el cultivo sólo se recomienda para estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos, de manera rutinaria se recomienda utilizar medios de cultivo selectivos para recupe-

rar la bacteria a partir de las biopsias y el uso de medios no selectivos para el mantenimiento de las cepas recuperadas y para la realización de antibiogramas (McNulty *et al.*, 2002). En este estudio se evaluó la productividad de tres medios de cultivo: Agar Tripticasa Soya, Agar BHI y Agar Brucella, adicionándoles sangre de cordero al 5%, para seleccionar el medio o los medios que recuperen con mejor eficiencia aislamientos de *H. pylori* y que puedan ser utilizados para pruebas de susceptibilidad y mantenimiento de las cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se utilizaron en este estudio fueron *H. pylori* NCTC 11637, *H. influenzae* ATCC 33930 y *E. coli* CMDM – PUI 076, estas dos últimas se usaron como controles interferente y referente respectivamente.

Recuperación de la cepa *H. pylori* NCTC 11637

Un criovial con 2 ml de suspensión bacteriana a -70°C , fue descongelado a 37°C durante 5 minutos en incubadora y luego inoculado en su totalidad en medio selectivo Agar Wilkins-Chalgren-Brucella. La incubación se realizó por 3 días a 37°C , en campana de microaerofilia (Gas Pak EZ: ref. 260680). Luego del periodo de incubación el crecimiento en medio de cultivo fue confirmado por observación de colonias pequeñas, translúcidas o grises, Gram negativas y pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa positivas.

Recuperación de *H. influenzae* ATCC 33930

Un criovial con 2 ml de suspensión bacteriana a -70°C , fue descongelado a 37°C durante 5 minutos en incubadora y luego

inoculado en agar chocolate en ambiente microaerofílico e incubado a 37°C por 48 horas. La verificación de la cepa se realizó con el sistema RAPID™ NH (*Neisseriaceae*, *Haemophilus*) System – REMEL (ref. 8311001).

Recuperación de *E. coli* CMDM – PUI 076

Un criovial con 2 ml de suspensión bacteriana a -70°C , fue descongelado a 37°C durante 5 minutos incubadora y luego inoculado en agar tripticasa soya e incubado a 37°C , en ambiente aeróbico por 18 horas. La verificación de la cepa se realizó con el sistema RAPID ONE System (For the identification of Enterobacteriaceae) REMEL (ref. 8311006).

Método ecométrico

Para evaluar la productividad de los medios de cultivo se utilizó la técnica cuantitativa de siembra por estría, denominada método ecométrico (Mossel *et al.*, 1983). Para ello, luego de confirmar la pureza de las cepas, se procedió a hacer un inóculo en caldo Brucella ajustándolo al patrón n° 3 de la escala de Mac-Farland con cada una de las cepas a utilizar: *H. pylori* NCTC 11637 (microorganismo prueba), *H. influenzae* ATCC 33930 (microorganismo interferente) y *E. coli* CMDM – PUI 076 (microorganismo referente). Para *H. pylori* se sembraron en 15 cajas de petri con Agar Brucella, Agar BHI y Agar Tripticasa Soya, todos suplementados con 5% de sangre de cordero. Para los microorganismos referente e interferente se sembraron 10 cajas de petri con los tres medios en estudio. Cada medio de cultivo fue sembrado con 10 μl de suspensión bacteriana con asa calibrada desechable. Los medios de cultivo sembrados con *H. pylori* se incubaron por 3 días a 37°C en microaerofilia (Gas Pak EZ: ref. 260680), los medios de cultivo sembrados con *H. influenzae* se incubaron por 48 ho-

ras en microaerofilia a 37°C y los medios sembrados con *E. coli* se incubaron por 18 horas en aerobiosis a 37°C. Para verificar la viabilidad de *H. pylori* tres cajas con agar selectivo Wilkins-Chalgren- Brucella, fueron inoculadas e incubadas bajo las mismas condiciones de microaerofilia y temperatura descritas anteriormente, la viabilidad de las cepas de *H. influenzae* ATCC 33930 se realizó en tres cajas de agar chocolate en condiciones de microaerofilia y para *E. coli* CMDM – PUJ 076, se sembraron tres cajas de agar tripticosa soya.

Sistema de análisis

Después de la incubación se observó el crecimiento en cada una de los medios estudiados, en donde se consideró valida cualquier estría que tuviera más del 25% de crecimiento (Mossel *et al.*, 1983). Para evaluar la productividad de los medios de cultivo se calculo el índice de crecimiento absoluto (ICA); éste se obtuvo de la sumatoria de cada una de las 20 líneas de los 4 cuadrantes (cada línea posee un valor de 0,2), más la línea central con un valor de 1. Los medios se clasificaron de acuerdo a su capacidad de recuperación del microorganismos en: bajamente productivos (ICA menor a 2,5),

medianamente productivos (ICA entre 2,5-4,0) y altamente productivos (ICA mayor a 4,0).

Diseño de la investigación

Este fue un estudio de tipo observacional descriptivo. Para el análisis de los datos obtenidos, se utilizó una estadística descriptiva para variables categóricas y se realizó un análisis de proporciones para los resultados con alta y mediana productividad.

Hipótesis

La proporción de medios de cultivo con resultados altos y medianamente productivos es mayor al 90%.

RESULTADOS

Recuperación y viabilidad de la cepa

Se confirmó la pureza de la cepa de *H. pylori* NCTC 11637, la cual mostró a la coloración de Gram bacilos curvos Gram negativos. Las pruebas de oxidasa, ureasa y catalasa fueron positivas. Los paneles de REMEL para identificación bioquímica de *E. coli* y *H. influenzae* confirmaron la pureza de estas dos cepas. *H. pylori*, creció al

Tabla 1
Recuperación del microorganismo interferente (*H. influenzae* ATCC 33930) en los medios en estudio

Réplica	ICA		
	Medio de Cultivo		
	TSA + Sangre de cordero 5%	BHI + Sangre de cordero 5%	A. Brucella + Sangre de cordero 5%
1	0	0,2	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

Tabla 2
Recuperación del microorganismo referente (*E. coli* CMDM – PUJ 076) en los medios en estudio

Réplica	ICA		
	Medio de Cultivo		
	TSA + Sangre de cordero 5%	BHI + Sangre de cordero 5%	A. Brucella + Sangre de cordero 5%
1	1,8	2,6	3,2
2	4,2	4,6	3,2
3	3,6	4,6	3,6
4	4,2	4,6	2,4
5	3,0	2,4	3,4
6	1,2	3,6	3,2
7	3,6	4,8	4,6
8	2,4	5,0	4,2
9	2,8	3,8	3,8
10	5,0	4,0	3,0

Tabla 3
Recuperación del microorganismo prueba (*H. pylori* NCTC 11637) en los medios en estudio

Réplica	ICA		
	Medio de Cultivo		
	TSA + Sangre de cordero 5%	BHI + Sangre de cordero 5%	A. Brucella + Sangre de cordero 5%
1	2,0	0,0	1,4
2	1,0	0,2	0,0
3	1,2	0,0	3,0
4	0,8	0,0	0,2
5	1,6	0,2	0,0
6	2,2	0,0	0,0
7	2,4	0,0	2,0
8	0,6	0,0	0,0
9	0,0	0,0	1,2
10	0,8	0,2	1,0
11	3,0	0,6	0,2
12	0,8	0,0	2,2
13	2,2	0,0	1,4
14	0,0	0,2	1,0
15	1,0	0,4	0,8

tercer día en todos los medios con Wilkins-Chalgren- Brucella verificando la viabilidad de la cepa.

Análisis ecométrico

Los microorganismos referente e interferente funcionaron adecuadamente observándose que *H. influenzae*, no creció en

ninguno de los tres medios en estudio luego de 48 horas de incubación, con un ICA promedio de 0 (tabla 1). *E. coli* creció en los tres medios en estudio con valores de ICA altamente productivos (tabla 2).

La recuperación del microorganismo prueba "*H. pylori*" fue baja en los tres medios de cultivo en estudio y se correlacionó con

Tabla 4

Proporción de medios con productividad alta, media y baja para *Helicobacter pylori*

Medio de cultivo	Porcentaje de productividad		
	Alta (%)	Media (%)	Baja (%)
TSA + Sangre de cordero 5%	0	7,6	92,3
TSA + Sangre de cordero 5%	0	0	100
TSA + Sangre de cordero 5%	0	6,6	93,3

valores de ICA por debajo de 2,5, mostrando una baja productividad de estos medios para este microorganismo (tabla 3).

Evaluación de la productividad en los tres medios

La capacidad de recuperación de los tres medios para *H. pylori* NCTC 11637 fue baja y se correlaciona con un ICA por debajo de 2,5. Estos resultados indican que ninguno de los medios de cultivo pueden ser recomendados para la recuperación de *H. pylori* (tabla 4).

DISCUSIÓN

Hasta el momento no se habían hecho estudios en nuestro país que evaluaran la productividad de los medios de cultivo usados para la recuperación de *H. pylori*. Por ello en este trabajo se evaluó la productividad de tres medios de cultivo no selectivos como Agar Tripticasa Soya, Agar BHI, Agar Brucella suplementados con sangre de cordero al 5%. Se encontró que los medios de cultivo utilizados en este trabajo, no tienen buena capacidad para recuperar *H. pylori*. Por tanto se debe rechazar el uso de éstos para la recuperación de este microorganismo.

Lo anterior puede deberse a que la cantidad de sangre adicionada no es suficiente para obtener un buen crecimiento de la bacteria, lo cual hace pensar que sería mejor utilizar medios con concentraciones superiores de sangre más la adición de otros

nutrientes como isovitalex para garantizar una mejor recuperación de esta bacteria (Hachem *et al.*, 1995). Por ello es recomendable medir la productividad de medios a los que se les adicione suero, sangre de cordero o de caballo, yema de huevo o ciclodextrinas, determinando además, el efecto de diferentes concentraciones de estos suplementos (Hachem *et al.*, 1995). Estudios hechos por Yuen y colaboradores en 2005, demostraron que los medios selectivos contienen suplementos que favorecen el crecimiento de *H. pylori*, conllevando a altas tasas de recuperación.

El medio usado en la fase inicial para la recuperación de *H. pylori*, Wilkins-Chalgren – Brucella, es un medio diseñado para la recuperación de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas y no puede ser utilizado en ensayos de susceptibilidad a los antibióticos; por tanto este medio selectivo no puede ser comparado con los medios no selectivos descritos en la literatura y con los evaluados en este estudio (McNulty *et al.*, 2002).

De los tres medios de cultivo estudiados, el Agar BHI con sangre de cordero al 5% fue el de menor productividad con una proporción de 0%. Llama la atención un estudio realizado por Hachem y colaboradores (1995), en donde se demuestra que el Agar BHI recién preparado con sangre de caballo al 7%, demostró ser el mejor y el más sensible para el aislamiento primario de *H. pylori* de biopsias congeladas de la muco-

sa gástrica, recuperándose la bacteria a partir de 474 muestras histológicas (93%) de un total de 508 muestras. Esta diferencia en los resultados puede deberse al mayor porcentaje de sangre utilizada en dicho estudio.

En cuanto a los medios de cultivo ATS y Brucella, la bacteria mostró un mejor comportamiento que en el medio de cultivo BHI pero igualmente siguen teniendo una baja productividad para recuperar cepas de *H. pylori* NCTC 11637, mostrando similitud con un estudio en el que *H. pylori* no crece en Agar Tripticosa Soya o Agar Brucella sin suplementos (Buck y Smith, 1987). En otro estudio Boyanova y colaboradores (2003), demostraron que de 102 aislamientos de biopsias gástricas, se aisló la bacteria en medios selectivos en el 31,4% y en medios no selectivos en 14,7% de los casos (Wee *et al.*, 1991; Ansorg *et al.*, 1991).

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo Agar Brucella, Agar BHI y Agar Tripticosa Soya suplementados con 5% de sangre de cordero no cumplen con los requerimientos mínimos para la recuperación de cepas puras de *H. pylori* NCTC 11637.

Los tres medios de cultivo usados tuvieron ICA por debajo de 2,5; su productividad fue baja y por consiguiente a la recuperación del microorganismo escasa.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la utilización de medios de cultivo Agar BHI, Agar Tripticosa Soya y Agar Brucella, adicionándoles suplementos con Isovitalax, suero fetal bovino, carbón activado, sangre de caballo entre 7-10%, para garantizar una mejor recuperación de *H. pylori*.

BIBLIOGRAFÍA

- ALARCÓN, T., BAQUERO, M., DOMINGO, D., LÓPEZ, M y ROYO, G. *Procedimientos en microbiología clínica. Diagnostico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori*, 1ª edición, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, España. 2004, 27.
- ANSORG, R., VON RECKLINGHAUSEN, G., POMARIUS, R y SCHMID, N. Evaluation of Techniques for Isolation, Subcultivation, and Preservation of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, Jan, 51-3.
- BOYANOVA, L., KOUMANOVA, R., LAZAROVA, E y JELEV, C. *Helicobacter pylori* and *Helicobacter heilmannii* in children. A Bulgarian study. *Diagnostic Microbiology Disease*, 2003, Aug, 46(4), 249-52.
- BRUCE, E., DUNN, N., HARTLEY, C y BLASER, M.J. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10(4), 720-74.
- BUCK, G.E y SMITH, J.S. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, Apr; 25 (4), 597-9.
- HACHEM, C.Y., CLARRIDGE, J.E., EVANS, D.G y GRAHAM, D.Y. Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *Journal Clinical Pathology*, 1995, 48, 714-6.
- HOFMAN, P., WAIDNER, B., HOFMAN, V., BERESWILL, S., BREST, P y KIST, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2004, 9(1), 15-22.

- KUSTERS, G.J., VAN VLIET, H.M., ARNOUD, A., KUIPERS, J y ERNST, J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology*, 2006, July, 449-90.
- MCNULTY, C., OWEN, R., TOMPKINS, D., HAWTIN, P., MCCOLL, K., PRICE, A., SMITH, G y TEARE, L. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, April, 49 (4), 6001-9.
- MOSSEL, D.A., BONANTS-VAN, L., LIGTENBERG, M y WERDLER, M.E. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. *Journal Applied Bacteriology*, 1983, 54(3), 313-27.
- ROJAS, G., CASTILLO, A., MAZARÍ-HIRIART, M, y LÓPEZ-VIDAL, Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública México*, 2004, 46, 538-48.
- TUMMALA, S., SHETH, S.G., GOLD-SMITH, J.D., GOLDAR-NAJAFI, A., MURPHY, C.K., OSBURNE, M.S., MULLIN, S., BUXTON, D., WAGNER, DA, y KELLY, C.P. Quantifying Gastric *Helicobacter pylori* infection: A comparison of Quantitative Culture, Urease Breath Testing and Histology. *Digestive Diseases and Sciences*, 2007, 52, 396-401.
- WEE, T., STEPHEN, F., RICHARD, S. y BRIAN, D. Comparative Evaluation of Three Selective Media and a Nonselective Medium for the Culture of *Helicobacter pylori* from Gastric Biopsies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, Nov, 2587-9.
- YUEN, B., ZBINDEN, R., FRIED, M., BAUERFEIND, P. y BERNARDI, M. Cultural recovery and determination of antimicrobial susceptibility in *Helicobacter pylori* by using commercial transport and isolation media. *Infection*, 2005, 33(2), 77-81.

Recibido: 22-02-2007

Aprobado: 30-08-2007