



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

**Evaluación de protocolos de inactivación de cepas de *Helicobacter pylori*
y su efecto sobre integridad de membrana y citotoxicidad sobre la línea
celular AGS.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

LUCIANO ANDRÉS ARELLANO ARRIAGADA
CONCEPCIÓN-CHILE
2023

Profesor Guía: Apolinaria García Cancino
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Profesor Co-Guía: Felipe Zúñiga Arbalti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Felipe Zúñiga Arbalti
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Estefanía Nova Lamperti.
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Dr. Leonardo Gómez Roa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

DEDICATORIA

Dedicada a Solange Vergara y su apoyo incondicional a lo largo de este camino académico.

Que tu búsqueda por el conocimiento algún día te permita equiparlo a la grandeza de tu corazón.

AGRADECIMIENTOS

Si pudiera materializar mi agradecimiento hacia el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, esta sección sería más larga que todo el contenido asociado a estos dos años de investigación. Destacando a la Doctora Apolinaria García, sin su confianza, apoyo y paciencia, no me hubiera enamorado de la academia. A pesar de esto, aún queda pendiente enseñarme su capacidad de desdoblarse para cumplir con todas sus metas.

CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	25
OBJETIVOS.....	26
METODOLOGÍA.....	27
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIÓN.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i> según las guías del MINSAL ...	11
Tabla 2 Ensayos Clínicos con vacunas para el tratamiento contra <i>H. pylori</i>	13
Tabla 3: Ejemplos de autovacunas utilizadas comercialmente en el tratamiento de especies de granjas	20
Tabla 4-5: Recuento de colonias a lo largo del proceso de incubación de las cepas clínicas y comerciales de <i>H. pylori</i>	34
Tabla 6 : Cuantificación de estructuras extracelulares (ECS) sobre cepas de <i>H. pylori</i> sometidas a protocolos de inactivación.....	37
Tabla 7: Fotografías tomadas a muestras de cepas clínicas y comerciales de <i>H. pylori</i> marcadas con FITC y sometidas a distintos protocolos de inactivación...38	
Tabla 8: Fotografías tomadas a muestras de cepas clínicas y comerciales de <i>H. pylori</i> marcadas con DAPI y sometidas a distintos protocolos de inactivación....39	
Tabla 9: Cuantificación de ADN en el sobrenadante de muestras de <i>H. pylori</i> sometidas a distintos protocolos de inactivación.....	40

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Curvas de crecimiento de las muestras sometidas a los protocolos de inactivación y sus respectivos controles.	33
Gráficos 2: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS incubadas en conjunto con distintas densidades celulares de cepas clínicas y comerciales de <i>H. pylori</i>	41
Gráficos 3: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS en conjunto con cepas de <i>H. pylori</i> realizados densidades celulares de McFarland 2.....	42
Gráficos 4: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS en conjunto con cepas de <i>H. pylori</i> realizados densidades celulares de McFarland 1.....	43
Gráficos 5: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS en conjunto con cepas de <i>H. pylori</i> realizados densidades celulares de McFarland 0,5.	44

RESUMEN

Debido a que *Helicobacter pylori* presenta elevada resistencia antimicrobiana, se ha establecido como un microorganismo de alta prioridad para la Organización mundial de la salud. A raíz de esto, consensos internacionales han establecido los beneficios de desarrollar una vacuna contra el patógeno. Sin embargo, las distintas vacunas desarrolladas han fallado debido a la plasticidad de esta bacteria. Con el fin de ofrecer una alternativa terapéutica, este estudio se centró en la estandarización de los primeros pasos para el desarrollo de una autovacuna contra *H. pylori*, definida como vacunas constituidas por una cepa inactivada previamente aislada desde el paciente que presentó el foco infeccioso.

Para esto, se estandarizaron protocolos de inactivación basados en calor, formaldehído, NaOH y etanol y se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento de 5 cepas clínicas y 2 cepas comerciales de *H. pylori*, obteniendo una completa inhibición mediante los cuatro protocolos. Por otra parte, también se evaluó la agresividad de estos protocolos sobre la membrana mediante microscopía de fluorescencia y de barrido, donde los protocolos mediados por formaldehído y etanol presentaron un menor daño a nivel de la integridad de membrana. Finalmente, se evaluó la citotoxicidad de las muestras mediante Sulforodamina B, donde al utilizar una densidad celular McFarland 1, los protocolos que presentaron una menor citotoxicidad fueron los mediados por calor y formaldehído. Los resultados obtenidos sugieren que el protocolo más prometedor son los mediados por formaldehído.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa y microaerofila, la cual al someterse a los ensayos para evaluar ureasa, catalasa y oxidasa dará resultados positivos (Wroblewski *et al.*, 2010a). Este microorganismo coloniza el epitelio gastrointestinal provocando una serie de patologías gástricas, de las cuales podemos destacar gastritis crónica, linfoma MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), úlcera gástrica, úlcera duodenal y además de presentar relación directa con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (García, 2014). La prevalencia de esta bacteria está directamente relacionada con la situación socioeconómica de cada país, en donde los países en vías de desarrollo presentan una mayor prevalencia (50.8%) que los países ya considerados desarrollados (34,7%) (Zamani *et al.*, 2018), particularmente en Chile, se observa una prevalencia en adultos de un 73% (Arenas *et al.*, 2019).

Considerando el VI Consenso de Maastricht, realizado el año 2022, el cual establece que independiente de la sintomatología del paciente, si es confirmada la presencia de *H. pylori*, éste deberá recibir el tratamiento adecuado para erradicar al patógeno, todo esto con el fin de disminuir la incidencia de pacientes con cáncer gástrico (Malfertheiner *et al.*, 2022). En Chile, según las guías clínicas facilitadas por el Ministerio de Salud (Tabla 1) (MINSAL, 2013), el tratamiento de primera línea para la erradicación de *H. pylori*, consiste en una terapia triple,

basada en un inhibidor de la bomba de protones (IBP), Claritromicina y Amoxicilina. Este tratamiento ha presentado una disminución en su eficacia en el transcurso del tiempo, debido a la aparición de mecanismos de resistencia antibiótica (Power *et al.*, 2008.). En el caso de fallar o que la resistencia a claritromicina en la región sea superior a un 20%, se recomienda el uso de una terapia cuádruple, basada en un IBP, Bismuto, Metronidazol y Tetraciclina. A pesar de que la terapia cuádruple sea una terapia más agresiva y se ha demostrado su eficacia como tratamiento de primera línea, existen otras opciones para el tratamiento de *H. pylori* como es la terapia doble (IBP + Amoxicilina) o el uso de Vonoprazan (O'Connor *et al.*, 2020).

Tabla 1 Tratamiento de la infección por *H. pylori* según las guías del MINSAL

Combinación de Fármacos	Condiciones
IBP+ Claritromicina+ Amoxicilina o metronidazol (En alérgicos a penicilina)	Si la prevalencia a la resistencia de Claritromicina es < 20%
IBP+ Claritromicina+ Metronidazol	Preferible si hay una prevalencia de resistencia de Metronidazol < 40%
Terapias Cuádruples : IBP+ Bismuto + Metronidazol + Tetraciclina)	Si se dispone de Subcitrato de bismuto
Terapias cuádruples basadas en bismuto	Mejor terapia de 2 ^{da} línea (si dispone de bismuto)
IBP+ (amoxicilina o tetraciclina)+ metronidazol	Mejor terapia de 2 ^{da} línea (si no dispone de bismuto)

H. pylori ha desarrollado distintos mecanismos para desarrollar resistencia frente a los tratamientos antibióticos, donde podemos destacar las mutaciones puntuales asociadas a resistencia , esto debido a correlaciones estadísticamente

significativas entre el Gold standard y distintos análisis genotípicos utilizados para detectarlas (Masaoka *et al.*, 2004). Dentro de las mutaciones puntuales podemos encontrar la A2143G y la A2142G, ambas mutaciones presentes en el ARNr 23S, estas mutaciones generarían cambios conformacionales en la subunidad ribosomal 50S impidiendo la unión de macrólidos, específicamente Claritromicina, el antibiótico principal de la terapia triple (Sakinc *et al.*, 2012), cuya resistencia posiciona a *H. pylori* como un microorganismo de alta prioridad según la OMS (Tacconelli *et al.*, 2018). Si bien los patrones de resistencia son heterogéneos y dependen de la región donde se evalúe la susceptibilidad, en diversos estudios realizados a lo largo del país se ha visto un aumento considerable de la resistencia frente a Claritromicina (22.5% durante 2005-2007 y 29.2% durante 2015-2017) (Arenas *et al.*, 2019; Oporto *et al.*, 2019; Parra-Sepúlveda *et al.*, 2019), por lo que la terapia de primera línea debería ser la terapia cuádruple basada o no en bismuto. A pesar de lo anterior, en el caso de no obtener un resultado terapéutico favorable, debido a que los porcentajes de fracaso terapéutico alcanzan valores entre 20-30% (Gisbert *et al.*, 2008), se debería optar por una terapia de rescate basada en la quinolona Levofloxacin (Fallone *et al.*, 2016). La terapia basada en Levofloxacin presenta una baja tasa de erradicación, solamente alcanzando entre un 75-85% de efectividad (Fallone *et al.*, 2016), razón por la cual es utilizada como terapia de rescate; además, la resistencia frente a Levofloxacin es elevada a lo largo de nuestro país

alcanzando valores similares a los presentados frente a Claritromicina (Arenas *et al.*, 2019; Oporto *et al.*, 2019; Parra-Sepúlveda *et al.*, 2019).

A raíz de lo mencionado previamente, podemos concluir que dentro de las principales opciones terapéuticas para el tratamiento de *H. pylori*, en Chile sólo se podría utilizar la terapia cuádruple basada o no en bismuto. En el caso fallar, no habría opciones de tratamiento antibiótico con una tasa de erradicación adecuada para el patógeno (Fallone *et al.*, 2016). Debido a la alta tasa de resistencia de las cepas presentes en nuestra región (Parra-Sepúlveda *et al.*, 2019) y la alta prevalencia e incidencia de cáncer gástrico asociados a la bacteria, es necesario buscar alternativas terapéuticas para la erradicación de este patógeno tan arraigado en la población (Tacconelli *et al.*, 2018). Una de las alternativas que se ha estudiado profundamente es la generación de distintas vacunas dirigidas a la gran variedad de antígenos que presenta este patógeno (Tabla 2) (Abadi, 2016).

Tabla 2 Ensayos Clínicos con vacunas para el tratamiento contra *H. pylori*

Year	Route	Antigens	Adjuvant	Timing	Challenge	Result
1999	Oral	Urease	LT mutant	Therapeutic	Natural	Significant reduction in bacterial load in some vaccine groups
2001	Oral	Whole cell	LT mutant	Therapeutic	Natural	No clearance
2008	Oral	Urease or Hp0231	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi Ty21a	Prophylactic	Experimental	Some clearance in both vaccine and control groups
2012	Intramuscular	CagA VacA Nap	Alum	Prophylactic	Experimental	Clearance equivalent between vaccine and controls groups
2014	Oral	Urease	Undisclosed	Prophylactic	Natural	Efficacy, 72%
2015	Oral	Urease	Undisclosed	Prophylactic	Experimental	Significant prevention of the infection in the children

Debido a que el ambiente asociado a la colonización de *H. pylori* presenta una alta dificultad para perpetuar su crecimiento, este patógeno posee distintos antígenos que facilitan este proceso (Yamaoka, 2010). Estos antígenos van desde adhesinas que facilitan su unión a células del epitelio gástrico, hasta oncoproteínas que generan distintas interrupciones a nivel de las rutas de señalización de las células expuestas al patógeno (Šterbenc *et al.*, 2019). Estas mismas proteínas, han sido vistas como una propuesta atractiva para formular distintas vacunas y de esta forma generar un tratamiento profiláctico o terapéutico para la erradicación adecuada de *H. pylori* (Sutton & Boag, 2019).

Entre las distintas vacunas que se han generado hasta la fecha, la mayoría ha sido dirigida específicamente a un antígeno, siendo el más característico la enzima ureasa (Keikha *et al.*, 2019). A pesar de que *H. pylori* es una bacteria que se desenvuelve en un ambiente que posee un pH ácido, es una bacteria neutrófila, a raíz de esto, presenta la proteína ureasa que permite la degradación de urea a amoníaco aumentando el pH del ambiente (Yamaoka, 2010). La mayoría de las vacunas generadas hasta la fecha, se han dirigido a esta proteína debido a su rol vital para la colonización del epitelio gástrico. A pesar de lo anterior, muy pocas vacunas han llegado a ensayos clínicos (Sutton & Boag, 2019). Resultados similares se pueden extrapolar a vacunas generadas a otros antígenos de *H. pylori*, por ejemplo, CagA, VacA o la enzima catalasa, donde las distintas vacunas generadas han llegado únicamente a ensayos clínicos de fase

1 (Keikha *et al.*, 2019). La única vacuna que ha logrado pasar a etapas clínicas más avanzadas fue la Wuhu Kangwei Biological technology, cuya composición constaba principalmente de la subunidad UreB de la enzima ureasa en conjunto con la subunidad B de la toxina susceptible a calor derivada de *E. coli* (Zeng *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos de fase 3, presentaron una reducción de la adquisición natural de *H. pylori* en un 71,8% a partir de un año después de la administración de la vacuna, que disminuye a un 55% al año siguiente. A pesar de que este estudio fue publicado el 2015, los ensayos fueron realizados el 2005-2007 y no se han publicado nuevos resultados en cuanto su actual proceso de desarrollo.

Uno de los principales problemas para el desarrollo de la vacuna contra este patógeno es la discrepancia entre los resultados obtenidos a partir de modelo animal y los distintos ensayos clínicos realizados hasta la fecha (Keikha *et al.*, 2019; Sutton & Boag, 2019). Existen diversos estudios realizados en modelos animales que presentan un alto porcentaje de inmunidad frente a la colonización de *H. pylori*. Sin embargo, los distintos ensayos clínicos han presentado resultados desalentadores en comparación con los realizados en modelo animal (Sutton & Chionh, 2013).

Si bien se han obtenido una gran variedad de resultados y en los últimos años se ha profundizado el conocimiento sobre la interacción entre *H. pylori* y nuestro sistema inmune, es necesario considerar que este patógeno es capaz de generar una respuesta inmune proinflamatoria prolongada), pero simultáneamente,

colonizar resistiendo este ambiente (Wilson *et al.*, 2007). Esta compleja respuesta inmune, en primera instancia, es mediada por la activación de neutrófilos mediante la interacción con la proteína NAP (neutrophil activating protein), lo cual deriva en una mayor producción IL-12 promoviendo una respuesta mediada por células Th1 (Wilson *et al.*, 2007). La respuesta mediada por células CD4+, es la principal razón por la que esta infección es crónica, esto debido al balance generado por la presencia de células Th1, Th17 y Treg. En el primer caso, las células Th1 y Th17 generan una respuesta proinflamatoria, cuyo rol debería ser erradicar al patógeno, pero debido a distintos mecanismos de evasión, esta respuesta solo deriva en daño a nivel del epitelio gástrico (Algood *et al.*, 2007). Por otra parte, proteínas efectoras de este patógeno fomentan una diferenciación a células Treg, las cuales generarían una respuesta antiinflamatoria permitiendo la supervivencia del patógeno (Wilson *et al.*, 2007).

En conjunto con lo anterior, dentro de los distintos mecanismos de evasión que presenta este patógeno, podemos encontrar, modificaciones estructurales, efectores que fomentan una respuesta antiinflamatoria y interrupciones de rutas de señalización en células del sistema inmune (Wilson *et al.*, 2007). Esta amplia gama de mecanismos de evasión de la respuesta inmune adaptativa es reconocida como una barrera al momento de generar una vacuna hacia al patógeno (Keikha *et al.*, 2019; Sutton & Boag, 2019; Sutton & Chionh, 2013).

A raíz de toda la información recolectada a lo largo de los distintos estudios realizados hasta la fecha, hay distintas consideraciones al momento de generar una vacuna dirigida hacia *H. pylori*. Dentro de estas, podemos destacar, la composición de la vacuna, ya que los distintos ensayos clínicos que se han realizado hasta la fecha, en su mayoría, han sido dirigidos hacia un antígeno ya sea ureasa, CagA o catalasa, esto deriva en que, debido a los distintos mecanismos de evasión de respuesta inmune adaptativa, la respuesta inmune generada no erradique al patógeno (Sutton & Boag, 2019). A raíz de esto, se ha propuesto el uso de vacunas de célula completa, vacunas basadas no solamente en una proteína presente en la bacteria, si no que, en la totalidad de la célula, esto permitiría según diversos estudios, generar una respuesta inmune que permita el reconocimiento y erradicación del patógeno, y que además impida la futura colonización de este en nuestro organismo (Kamiya & Backert, 2019). Debido a la gran heterogeneidad genotípica y fenotípica de las cepas de *H. pylori* alrededor del mundo, existe la posibilidad que al momento de generar una vacuna de célula completa no sea dirigida a los distintos antígenos que estén presentes de algunas cepas, y por lo tanto, la inoculación no generaría una respuesta inmune que supere los mecanismos de evasión del patógeno y logre su erradicación para generar inmunidad frente al patógeno (Kamiya & Backert, 2019).

Una alternativa frente a la problemática causada por la gran variedad fenotípica y genotípica presente en las cepas de *H. pylori*, es el uso de autovacunas, definidas como vacunas constituidas por una cepa inactivada, previamente aislada desde el paciente que presentó el foco infeccioso (Barnes *et al.*, 2021). Si bien, el mecanismo de acción de las autovacunas no se ha estudiado en profundidad, autores sugieren que estaría asociado a una mezcla de respuesta inmune específica y no específica (Giedrys-Kalemba *et al.*, 2018), esto debido a que posterior a la administración de la vacuna, se ve un aumento en la población de macrófagos en la región, los cuales presentarían los antígenos hacia las células Th1 derivando en una respuesta inmune adaptativa. A partir de lo anterior, las citoquinas producidas por las células Th1, ayudan a las células B a generar inmunoglobulinas que fomentan la respuesta mediada por neutrófilos y macrófagos (Giedrys-Kalemba *et al.*, 2018). Estos mecanismos se han visto en diversos estudios, por ejemplo, posterior a la administración de autovacunas dirigidas a las infecciones causadas por *Staphylococcus* spp, se ve un aumento en la actividad macrofágica, intensificación de aglutinación de anticuerpos y aumento de la respuesta mediada por células (Giedrys-Galant, 1977, Giedrys-Kalemba *et al.*, 2018). En conjunto con lo anterior, se han descrito un aumento de respuesta inmune específica mediada por anticuerpos dirigidos hacia *Propionibacterium acnés*, posterior a la administración de la autovacuna (Zaluga *et al.*, 1998, Giedrys-Kalemba *et al.*, 2018).

Distintas autovacunas (dirigidas a distintos patógenos, han sido generadas hasta la fecha, abarcando un amplio rango de tratamientos (Szkaradkiewicz *et al.*, 2013). Dentro de los cuales podemos mencionar, el tratamiento de ganado bovino, cerdos y aves de corral, obteniendo resultados bastante favorables, disminuyendo el uso de antibióticos y cumpliendo su rol como tratamiento terapéutico o profiláctico frente a estos patógenos (Andrew *et al.*, 2021). Por ejemplo, podemos mencionar el tratamiento profiláctico mediado por una autovacuna dirigida hacia *Staphylococcus hyicus*, donde se describe una disminución del 60% en el uso de antibióticos para el tratamiento de cerdos ((Arsenakis *et al.*, 2018). Es destacable la disminución del 60% en el uso de antibióticos para el tratamiento de *Staphylococcus hyicus* en cerdos (Arsenakis, *et al.*, 2018). Por otra parte, en la acuicultura, se han visto autovacunas dirigidas hacia *Yersinia ruckeri*, patógeno que aqueja distintas especies de peces, donde particularmente esta inmunización es realizada en la industria del salmón atlántico con resultados favorables (Barnes *et al.*, 2021).

Los resultados descritos previamente son extrapolables a una serie de especies utilizadas en granjas, de las cuales algunos se ven descritos en la Ilustración 1.

Tabla 3: Ejemplos de autovacunas utilizadas comercialmente en el tratamiento de especies de granjas. (Imagen adquirida desde Barnes *et al.*, 2021)

Pathogen	Vaccine type	Adjuvant: Route	Farmed species
Country: Australia			
<i>Vibrio anguillarum</i> (Anguillvac C)	Licensed killed whole cell	oil-emulsion: injection	Salmonids
<i>Yersinia ruckeri</i> (Yersinivac B)	Licensed killed whole cell	oil-emulsion: injection	Salmonids
<i>Y. ruckeri</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>Aeromonas</i> sp. (Tegovac)	Licensed killed whole cell	oil-emulsion: injection	Salmonids
Tasmanian Salmonid Rickettsia (Corrovac)	Licensed killed whole cell	oil-emulsion: injection	Salmonids
Salmon orthomyxovirus (Certovac)	Licensed inactivated	oil-emulsion: injection	Salmonids
<i>Streptococcus iniae</i>	Autogenous killed whole cell	oil-emulsion: injection	Barramundi (<i>L. calcarifer</i>)
Betanodavirus (RGNNV)	Recombinant protein	oil-emulsion: injection	Giant grouper (<i>E. lanceolatus</i>)
<i>Lactococcus garviae</i>	Autogenous killed whole cell	oil-emulsion: injection	Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> ssp <i>damsela</i>	Autogenous killed whole cell	oil-emulsion: injection	Yellowtail kingfish (<i>S. lalandi</i>)
Country: Indonesia			
<i>Streptococcus iniae</i>	Killed whole cell	Immersion and injection	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Killed whole cell	Immersion and injection	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
<i>Streptococcus agalactiae</i> serotype 1b	Killed whole cell	oil-emulsion: injection	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Killed whole cell	Immersion and injection	All freshwater fish
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Streptococcus agalactiae</i>	Killed whole cell	Immersion and injection	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Koi Herpesvirus	Attenuated vaccine	Immersion	Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) & Koi (<i>Cyprinus koi</i>)
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Killed whole cell	Immersion	Catfish (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)
Iridovirus	Inactivated	oil-emulsion: injection	Grouper
<i>V. campbelli</i> 2J2 (antigen O)	Killed whole cell	Oral, immersion and injection	Humpback grouper (<i>Cromileptes altivelis</i>)
<i>V. fluvialis</i> 24SK (antigen H)			
<i>V. fluvialis</i> 16G (antigen O)			
<i>V. fluvialis</i> 2SA (antigen H)			
<i>Streptococcus iniae</i> strain jeju-45	Killed whole cells	Injection	Aquaculture
<i>Streptococcus iniae</i> , <i>Lactococcus garviae</i>	Inactivated	Oral and immersion	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Country: Vietnam			
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Killed whole cell	Oil-emulsion: injection	Pangasius catfish (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Edwardsiella ictaluri</i>	Killed whole cell	Oil-emulsion: injection	Pangasius catfish (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Killed whole cell	Oil-emulsion: injection	Tilapia

También se han utilizado autovacunas en tratamiento para patógenos humanos (Giedrys-Kalemba *et al.*, 2018), como, por ejemplo, infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* como infecciones del sitio quirúrgico, osteomielitis y

sinusitis. También se han utilizado en infecciones recurrentes del tracto urinario, observándose una alta erradicación de *E. coli* uropatógena y disminuyendo casi en su totalidad la incidencia de este tipo de infección en los pacientes tratados (López-Martín *et al.*, 2019). Es importante destacar que las autovacunas presentan diversas ventajas, además de ser efectivas, presentan una alta flexibilidad para producir vacunas en respuesta a la variabilidad fenotípica de las cepas como en el caso de *H. pylori*, menor tiempo de desarrollo, lo que conlleva a menores gastos de fabricación, menos reactógenas y más seguras (Barnes *et al.*, 2021).

A pesar de lo anterior, aún no se ha comenzado el desarrollo de una autovacuna contra *H. pylori*, esto debido a distintos factores ya sea económicos o de logística (Sutton & Chionh, 2013). Por otra parte, extrapolar la información recopilada hasta la fecha, podemos concluir que, si bien ocho vacunas dirigidas hacia *H. pylori* han llegado a ensayos clínicos (Sutton & Boag, 2019), ninguna ha presentado resultados que permitan concluir que un tratamiento mediado por una formulación y administración adecuada genere una inmunidad que logre erradicar al patógeno debido a su gran variabilidad genotípica y fenotípica, aun así, la generación de una autovacuna para el tratamiento y erradicación de *H. pylori* se ve como una alternativa prometedora.

A pesar de que una autovacuna puede ser considerada una vía alternativa al tratamiento antibiótico, el desarrollo de ésta requiere bastantes recursos y tiempo, esto con el fin de desarrollar ensayos *in vitro*, ensayos en modelo animal y finalmente ensayos clínicos. A raíz de lo anterior, este estudio se centrará en la estandarización del protocolo de inactivación, evaluación de la integridad de la membrana posterior a los tratamientos de inactivación y evaluación de la citotoxicidad de los protocolos mencionados previamente. Todo esto con el fin de dar los primeros pasos para futuros proyectos asociados al desarrollo de una autovacuna contra *H. pylori*.

El proceso de inactivación bacteriana es conocido como la metodología que finaliza el proceso de crecimiento o síntesis proteica, resultando usualmente en daño a nivel celular (Taddese *et al.*, 2021). Este daño en la integridad de membrana puede resultar en la limitación de la preservación de la inmunogenicidad, debido al daño en epítopes esenciales para generar inmunidad (Camacho *et al.*, 2013). Por otra parte, la agresividad de los distintos protocolos puede variar dependiendo de la especie bacteriana (Taddese *et al.*, 2021). A raíz de lo anterior, es necesario estandarizar el protocolo de inactivación, con el fin de reducir los daños hacia los potenciales agentes que fomenten la inmunización frente al patógeno.

Particularmente en este trabajo, nos centraremos en protocolos descritos por Taddese *et al.*, basados en calor, formaldehído, etanol y NaOH. Estos distintos protocolos, han sido ampliamente utilizados en la generación de vacunas, pero

como se ha mencionado previamente, varían según su agresividad sobre la integridad de la membrana, donde los protocolos mediados por formaldehído y etanol generan un menor daño en comparación con los protocolos mediados por calor e NaOH (Elveborg *et al.*, 2022; Taddese *et al.*, 2021). Simultáneamente, protocolos mediados por formaldehído han sido utilizados en la generación de vacunas de célula completa dirigidos hacia *H. pylori*, presentando antecedentes favorables para la estandarización del protocolo (Sutton & Chionh, 2013).

Por otra parte, es importante considerar la potencial citotoxicidad de las metodologías utilizadas, esto debido a características de los reactivos en los distintos protocolos. Por ejemplo, en los casos del formaldehído y etanol, su uso puede tener efectos citotóxicos en diferentes tipos de líneas celulares (Lovschall *et al.*, 2002). Se ha demostrado que estos reactivos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y derivando en daño a nivel de ADN, alteración en la estructura celular y la disminución de la viabilidad (Ke *et al.*, 2014).

En conjunto con lo anterior, es importante destacar la estrecha relación de la citotoxicidad de *H. pylori* sobre la línea celular AGS, derivada de cáncer gástrico. Este patógeno presenta una gran cantidad de antígenos y proteínas efectoras que la facultan con la capacidad de inducir distintas rutas de señalización perjudiciales para el huésped, donde podemos destacar la proteína CagA (Hatakeyama *et al.*, 2014), la cual es la primera oncoproteína descrita. A raíz de

lo anterior, esta línea celular se ha utilizado ampliamente como modelo de estudio para el patógeno. Por lo tanto, es necesario realizar los ensayos que permitan evaluar la citotoxicidad de los protocolos en línea celular, para poder discriminar si estos protocolos disminuyen la citotoxicidad del patógeno, o si, por otra parte, presentan efectos citotóxicos por si solos.

HIPOTESIS DE TRABAJO:

Los protocolos de inactivación mediados por formaldehído y etanol generan menor daño a nivel de la integridad de membrana de cepas clínicas de *Helicobacter pylori*, sin aumentar su citotoxicidad sobre la línea celular AGS, en comparación con los protocolos mediados por NaOH y calor.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el efecto de los protocolos de inactivación mediados por calor, etanol, NaOH o formaldehído sobre la integridad de membrana y citotoxicidad en cepas clínicas de *Helicobacter pylori*.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar la viabilidad de cepas clínicas de *Helicobacter pylori* inactivadas utilizando tratamiento con calor, etanol, NaOH o formalina.
- 2) Determinar la integridad de membrana de las cepas de *Helicobacter pylori* previamente inactivadas.
- 3) Evaluar el efecto citotóxico de cepas clínicas de *Helicobacter pylori* previamente inactivadas sobre la línea celular AGS.

METODOLOGIA:

5.1 Cultivo a partir de cepario

A partir del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción, se cultivaron las cepas a evaluar, las cuales corresponden a 5 cepas clínicas de *H. pylori* aisladas en la región del Biobío, denominadas bajo los códigos 879,780,78,138 y 124, y las cepas de referencia o controles ATCC 43504 y J99. El cultivo se efectuó en agar Columbia (OXOID, Basingstoke, UK) suplementado con 5% de sangre de caballo, donde posterior a esto, fue llevado a condiciones de microaerobiosis en una temperatura de 37 °C (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durante 5-7 días. A partir de lo anterior, se realizó un traspaso bajo las mismas condiciones hasta obtener un crecimiento que permita generar las soluciones McFarland a utilizar.

5.2 Inactivación

Ya realizada la incubación, se inoculó el crecimiento obtenido a un tubo eppendorf con suero fisiológico, para luego ser llevado a centrifugación a 16,100xg por 10 minutos (Eppendorf, San Diego, CA, USA). El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el pellet en formaldehído al 70%, etanol al 70% o

NaOH 6 mg/mL (0,15M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) según corresponda, ajustando a una densidad óptica de 1.0 a 620nm (TECAN, Männedorf, Switzerland). En el caso puntual de la inactivación por calor, el pellet generado se resuspendió en suero fisiológico para después ser incubado a 70°C por 30 minutos, posteriormente fue almacenado en hielo hasta su uso (Taddese *et al*, 2021).

Una vez llevado a cabo los procesos de inactivación, se evaluó la viabilidad de cada muestra realizando 8 diluciones seriadas 1:10 en suero fisiológico. A partir de cada dilución, se tomaron 10 uL por triplicado y fueron inoculados en placas de agar columbia suplementada con 5% de sangre de caballo, las cuales fueron llevadas a condiciones de microaerobiosis a 37°C por 48-72 h. Finalmente, se realizó el recuento correspondiente y se calculó la relación UFC/mL.

5.4.1 Evaluación de la integridad celular mediante FITC y DAPI

A partir de un cultivo generado previamente, se ajustó a 1.0 a una OD_{620nm}, se centrifugó a 16,100 x g por 3 minutos y en paralelo se disolvió el FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en DMSO 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para luego diluido en PBS a 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Una vez realizada la centrifugación, el pellet obtenido fue resuspendido en la solución FITC/PBS mencionada previamente, e incubada en rotación y

oscuridad durante 30 minutos. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS intercalados con centrifugaciones a 16,100 x g por 3 minutos cada una.

Finalmente, se realizó el marcaje con FITC, se llevaron a cabo los distintos procesos de inactivación y fueron centrifugados a 16,100 g x 3 minutos, donde los pellets obtenidos se resuspendieron en formalina y se realizaron lavados con PBS intercalados con centrifugaciones 16,100 x g por 3 minutos cada una. Una vez lavada la formalina, se resuspendió el pellet obtenido en PBS y se efectuaron dos diluciones seriadas 1:10, para colocar 5uL de cada muestra en los portaobjetos. Una vez secas, se agregaron 1-2 gotas de DAPI (10ug/mL) y fueron visualizadas bajo microscopía de fluorescencia (Motic, Viking Way, Richmond, VA, Canadá).

Los controles negativos de este ensayo correspondieron a bacterias que no pasaron por el proceso de inactivación y solamente fueron teñidas con FITC. Simultáneamente, los controles positivos correspondieron a bacterias que no fueron sometidas a protocolos de inactivación y solo fueron teñidas con DAPI

5.4.2 Cuantificación de ADN en el sobrenadante

Con el fin de complementar los resultados obtenidos, se cuantificó el ADN presente en el sobrenadante de las muestras, posterior a los protocolos de inactivación. Para esto, se tomó la fracción superior de los sobrenadantes y se

medió la concentración de ADN en la relación 260/280 nm (TECAN, Männedorf, Switzerland).

5.5 Evaluación de la integridad bacteriana mediante microscopía electrónica

Ya realizados los distintos procesos de inactivación, los sobrenadantes fueron removidos y los pellets obtenidos fueron llevados a los laboratorios de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción para visualización mediante microscopía electrónica (JEOL modelo JSM 6010 PLUS/LA) utilizando el protocolo para la visualización de las muestras de Anderson T (Anderson, 1951). A partir de esto se realizó un recuento de estructuras extracelulares presentes en las membranas de 50 células bacterianas.

5.6 Evaluación de la citotoxicidad

Este ensayo se realizó con el fin de identificar la concentración de bacteria inactivada a utilizar además de la posible citotoxicidad de los protocolos de inactivación utilizados. Se evaluó su citotoxicidad en líneas celulares mediante la técnica de Sulforodamina B descrita por Vichai & Kirtikara.

La línea celulares AGS, fue incubada en placas de 96 pocillos durante 24 horas utilizando 15.000 células por pocillo. Posteriormente, fue incubada en conjunto con distintas concentraciones (McFarland 0,5 ,1 ,2 y 3) de las bacterias inactivadas durante 24 horas, ensayo que fue realizado por triplicado. A partir de lo anterior, a cada pocillo se le agregó 100 uL de ácido tricloroacético (Winkler) al 10% p/v y se llevó a incubación durante 1 hora a 4°C. Luego, se realizaron 4 lavados con ácido acético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez realizados los lavados, se adicionaron 100 uL de solución de Sulforodamina B al 0,057% p/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparada previamente en ácido acético al 1% v/v y se llevaron a incubación por 30 minutos en temperatura ambiente. Ya finalizada la incubación, nuevamente se realizaron 4 lavados con ácido acético al 1% v/v.

Se adicionaron 200 uL de solución Tris Base 10 mM pH 10,5(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dejando la placa en agitación durante 5 minutos. La lectura de resultados fue realizada mediante cuantificación de absorbancia a 510 nm. El protocolo fue repetido para las concentraciones de McFarland 0.5,1 y 2 que fueron sometidas a los distintos protocolos de inactivación.

5.7 Análisis estadísticos

Se realizaron los análisis estadísticos utilizando el programa Graphpad Prism versión 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Los resultados fueron comparados mediante el análisis estadístico one-way ANOVA y Test de Tukey realizado mediante el mismo software.

RESULTADOS

6.1 Evaluación de la viabilidad

Una vez incubadas las cepas sometidas a los distintos protocolos de inactivación, se cuantificaron las colonias presentes en las placas donde fueron inoculadas las diluciones. A partir de lo anterior, una vez realizado el procesamiento de los datos (tablas 3 y 4) bajo la ecuación 1, se graficaron los resultados obtenidos (Figura 1).

Figura 1 :Curvas de crecimiento de las muestras sometidas a los protocolos de inactivación y sus respectivos controles.

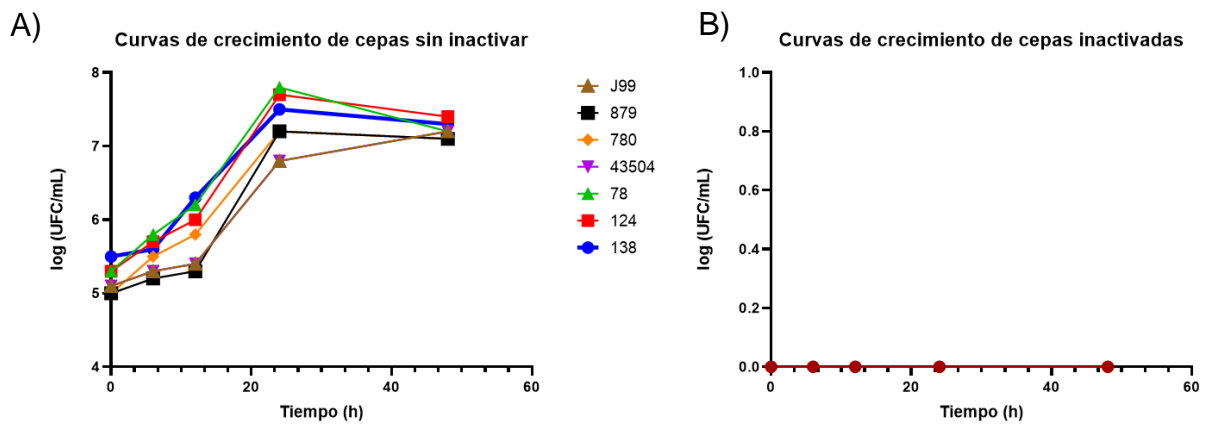


Tabla 3: Recuento de colonias a lo largo del proceso de incubación de las cepas clínicas y comerciales de *H. pylori*.

Cepa	43504		780		879	
	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)
0	10x10 ²	5	10x10 ²	5	12x10 ²	5,1
6	32x10 ²	5,5	22x10 ²	5,2	27x10 ²	5,3
12	45x10 ²	5,8	27x10 ³	5,3	30x10 ²	5,4
24	18x10 ⁴	7,2	17x10 ⁴	7,2	58x10 ⁴	6,8
48	15x10 ⁴	7,1	15x10 ⁴	7,1	18x10 ⁴	7,2

Tabla 4: Recuento de colonias a lo largo del proceso de incubación de las cepas clínicas y comerciales de *H. pylori*.

Cepa	138		124		J99		78	
	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)	Recuento x Dilución	log (UFC/mL)
0	30x10 ²	5,5	27x10 ²	5,3	26x10 ²	5,3	12x 10 ²	5,1
6	40x10 ²	5,6	43x10 ²	5,7	45x10 ²	5,8	27x10 ²	5,3
12	20x10 ³	6,3	10x10 ³	6	15x10 ³	6,2	30x10 ²	5,4
24	30x10 ⁴	7,5	52x10 ⁴	7,7	55x10 ⁴	7,8	57x10 ³	6,8
48	20x10 ⁴	7,3	28x10 ⁴	7,4	17x10 ⁴	7,2	18x10 ⁴	7,2

Ecuación 1: Ecuación utilizada para la transformación del recuento realizado hacia Unidades formadoras de colonias (UFC).

$$\frac{\text{Cuantificación de colonias} \times 10^{\text{dilución utilizada}}}{0,010}$$

Dentro de los resultados obtenidos se comprobó que no hubo crecimiento posterior a los 4 protocolos de inactivación realizados (Gráficos 1), sugiriendo que todos los protocolos lograron matar patógeno

6.1 Evaluación de la integridad de membrana

6.1.1 Microscopía electrónica de barrido

Dentro de los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido, si observamos las fotografías asociadas a los controles de la cepa clínica y cepa comercial podemos identificar que las membranas de las células no presentan irregularidades y sin la presencia de cuerpos extracelulares, los cuales, en el caso de estar presentes, se vinculan a daño de la integridad de la membrana. En el caso del análisis de realizado mediante microscopía electrónica de barrido tomadas posterior al tratamiento con calor, se puede observar una mayor presencia de células cocoides, membrana irregular y además un elevado número

de cuerpos extracelulares (tabla 5). Al momento de comparar estos resultados con las fotografías tomadas a las muestras sometidas a los otros protocolos inactivación (Ilustración 1), el tratamiento con calor e hidróxido de sodio fueron los que provocaron una mayor cantidad de irregularidades al momento de observar la membrana. A pesar de lo anterior, etanol y NaOH presentaron porcentajes similares de estructuras extracelulares. Finalmente, el tratamiento con formaldehído fue el menos agresivo según los criterios mencionados previamente.

Figura 2: Fotografías de microscopía electrónica de barrido sobre muestras de *H. pylori* sometidas a 4 protocolos de inactivación. En estas fotografías se pueden

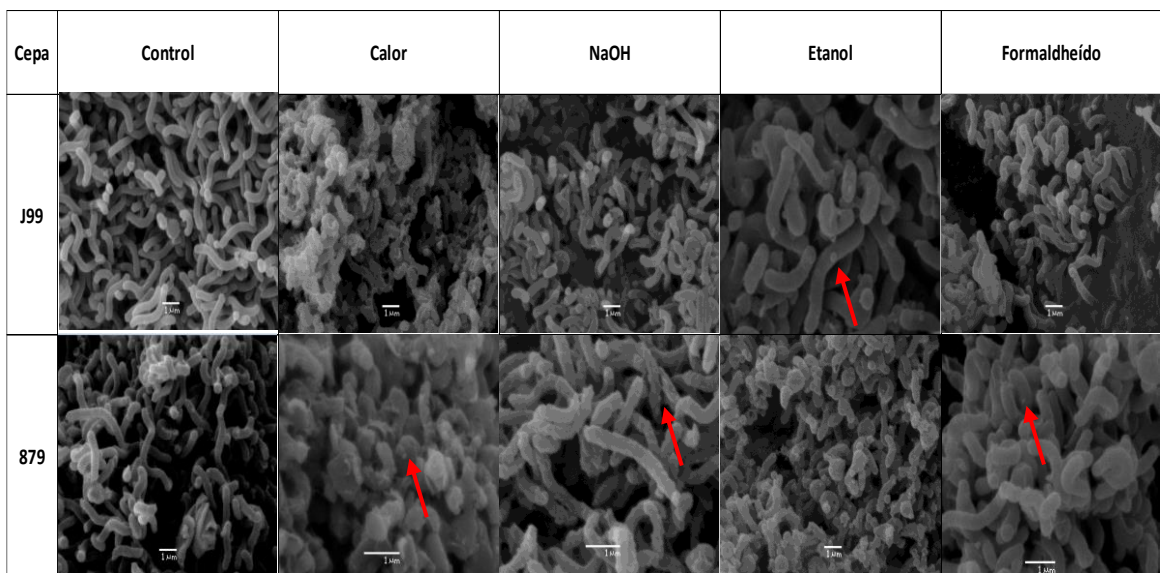


Tabla 6: Cuantificación de estructuras extracelulares (ECS) sobre cepas de *H. pylori* sometidas a protocolos de inactivación. Se realizó el análisis estadístico Test de Tukey, que permite la comparación de los distintos protocolos con respecto al control, en este caso el único que no presento diferencias estadísticamente significativas ($> 0,05$) fue el tratamiento mediado por formaldehído.

	J99			Test de Tukey
	0 ECS	≥ 1 ECS	%	
Control	37	1	2,6	N/A
Calor	16	28	63,6	$< 0,05$
Etanol	21	9	30	$< 0,05$
NaOH	28	16	36,4	$< 0,05$
Formaldehído	28	5	15,15	$> 0,05$

	879			Test de Tukey
	0 ECS	≥ 1 ECS	%	
Control	28	2	6,6	N/A
Calor	15	27	64,2	$< 0,05$
Etanol	32	14	30,4	$< 0,05$
NaOH	32	16	33,3	$< 0,05$
Formaldehído	32	7	17,9	$> 0,05$

6.1.2 Microscopía de fluorescencia

Posterior a la incubación a 37°C durante 48 horas, las muestras fueron observadas bajo microscopía de fluorescencia donde en la tabla 6 se presenta los resultados obtenidos bajo el filtro dirigido hacia FITC y en la tabla 7 se observa el mismo campo, pero utilizando el filtro dirigido hacia DAPI. En la primera columna de imágenes se encuentran las muestras que no fueron sometidas a ningún protocolo de inactivación y solamente fueron teñidas con DAPI o FITC, respectivamente. Dentro de los resultados obtenidos, destacan los tratamientos mediados por formaldehído y etanol, los cuales presentan una mayor cantidad de fluorescencia, lo cual sugiere un tratamiento menos agresivo, debido a la unión y señal de los marcadores FITC/DAPI y en las células. Estos resultados se correlacionan con los descritos en la tabla 8, donde la mayor cantidad de sobrenadante obtenido fue en las muestras sometidas a los protocolos de inactivación mediados por calor y NaOH.

Tabla 7: Fotografías tomadas a muestras de cepas clínicas y comerciales de *H. pylori* marcadas con FITC utilizando objetivo 100x y sometidas a distintos protocolos de inactivación. El color verde presente en las bacterias se asocia con un mayor nivel en la integridad de membrana, al mismo tiempo, una baja señal de la tinción se relaciona con un mayor daño.

	Control	Formaldehído	Etanol	NaOH	Calor
J99					
43504					
78					
124					
138					
780					
879					

Tabla 8: Fotografías tomadas a muestras de cepas clínicas y comerciales de *H. pylori* marcadas con DAPI, utilizando un aumento 100x y sometidas a distintos protocolos de inactivación. El color azul presente en las bacterias se asocia con una mayor cantidad de ADN intracelular, al mismo tiempo, una baja señal de la tinción se relaciona con daño a nivel de la membrana y por lo tanto una mayor salida del material genético.

	Control	Formaldeido	Etanol	NaOH	Calor
J99					
43504					
78					
124					
138					
780					
879					

Tabla 9: Cuantificación de ADN en el sobrenadante de muestras de *H. pylori* sometidas a distintos protocolos de inactivación.

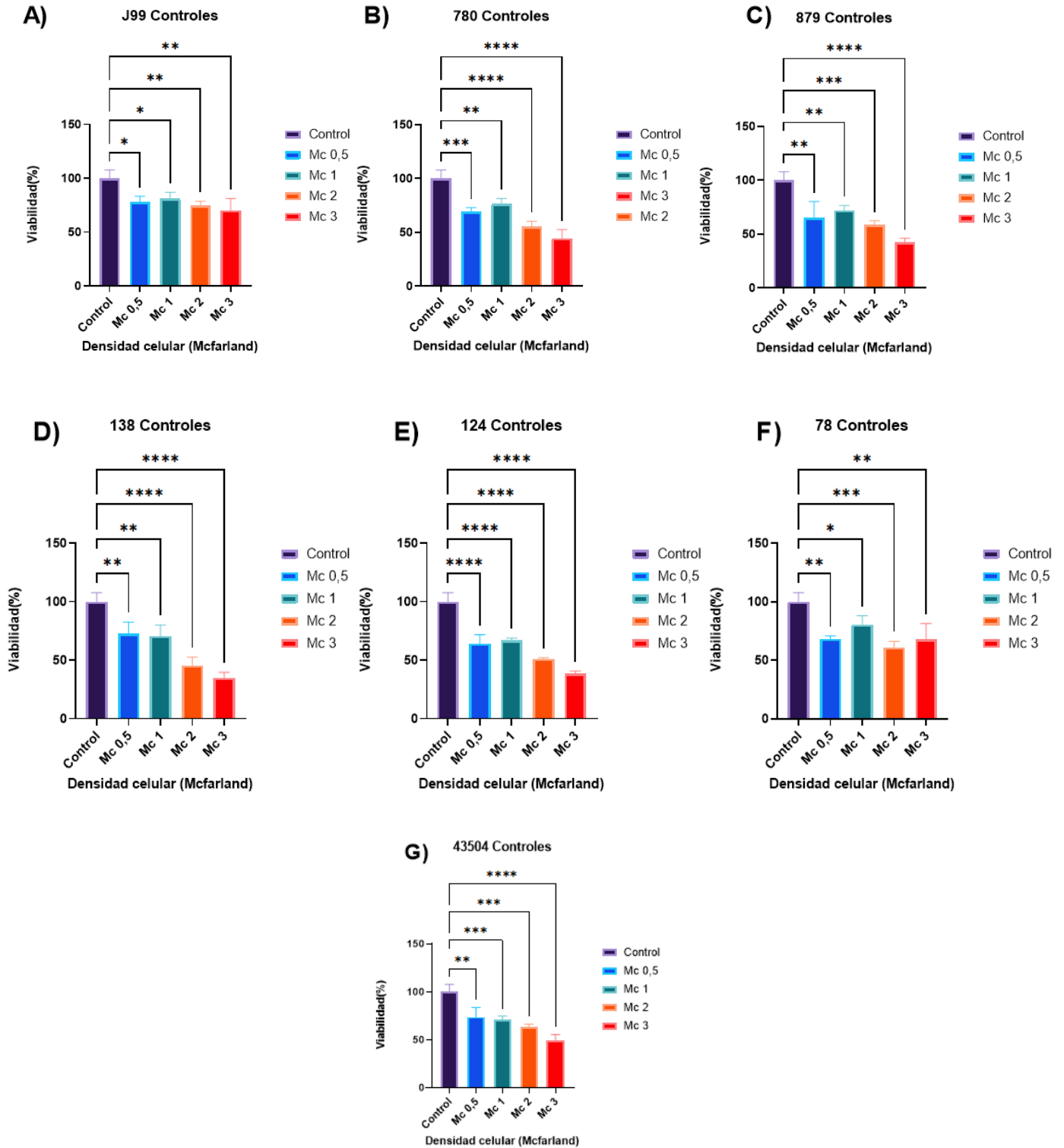
Cepa/(ng/ μ l)	Control	Calor	Etanol	NaOH	Formaldehído
J99	19,1	45,7	18,7	122,7	36,7
43504	23	26,3	18,5	100,9	19,8
124	20,3	48,9	13,9	197,7	21
138	18,2	55,3	15,5	182,3	20
780	17,2	45,3	16,8	120,9	20,2
879	14,4	60,8	15,2	186,9	22,5
78	13,5	84,9	11,2	144,4	21
X	15,68	52,5	17,95	150,1	20,4
SD	2,64	17,9	3,3	38,9	10

6.1.2 Evaluación de citotoxicidad

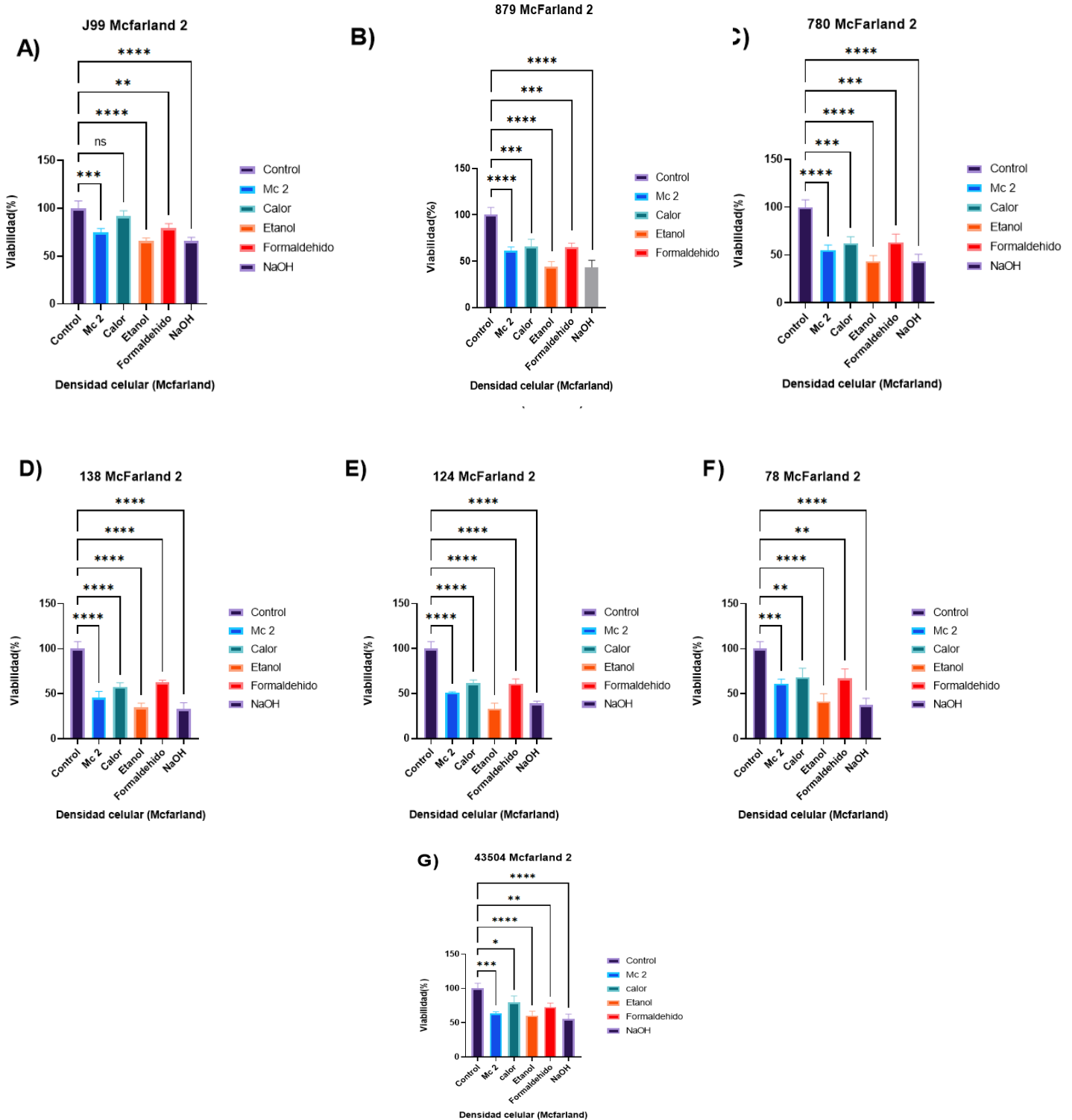
A raíz de las características potencialmente nocivas de los reactivos utilizados, es necesario evaluar su citotoxicidad para poder escalar estos ensayos en un futuro.

Dentro de los resultados obtenidos, al utilizar una densidad celular McFarland 2, se ve diferencia estadísticamente significativa entre el control y las muestras donde se utilizó el patógeno. Al momento de disminuir la densidad celular a McFarland 1 y 0,5, no existe diferencia entre el control y los protocolos de inactivación mediados por calor y/o formaldehído en el caso de las cepas 78 ,138 780, esto implicaría una baja citotoxicidad en estos casos.

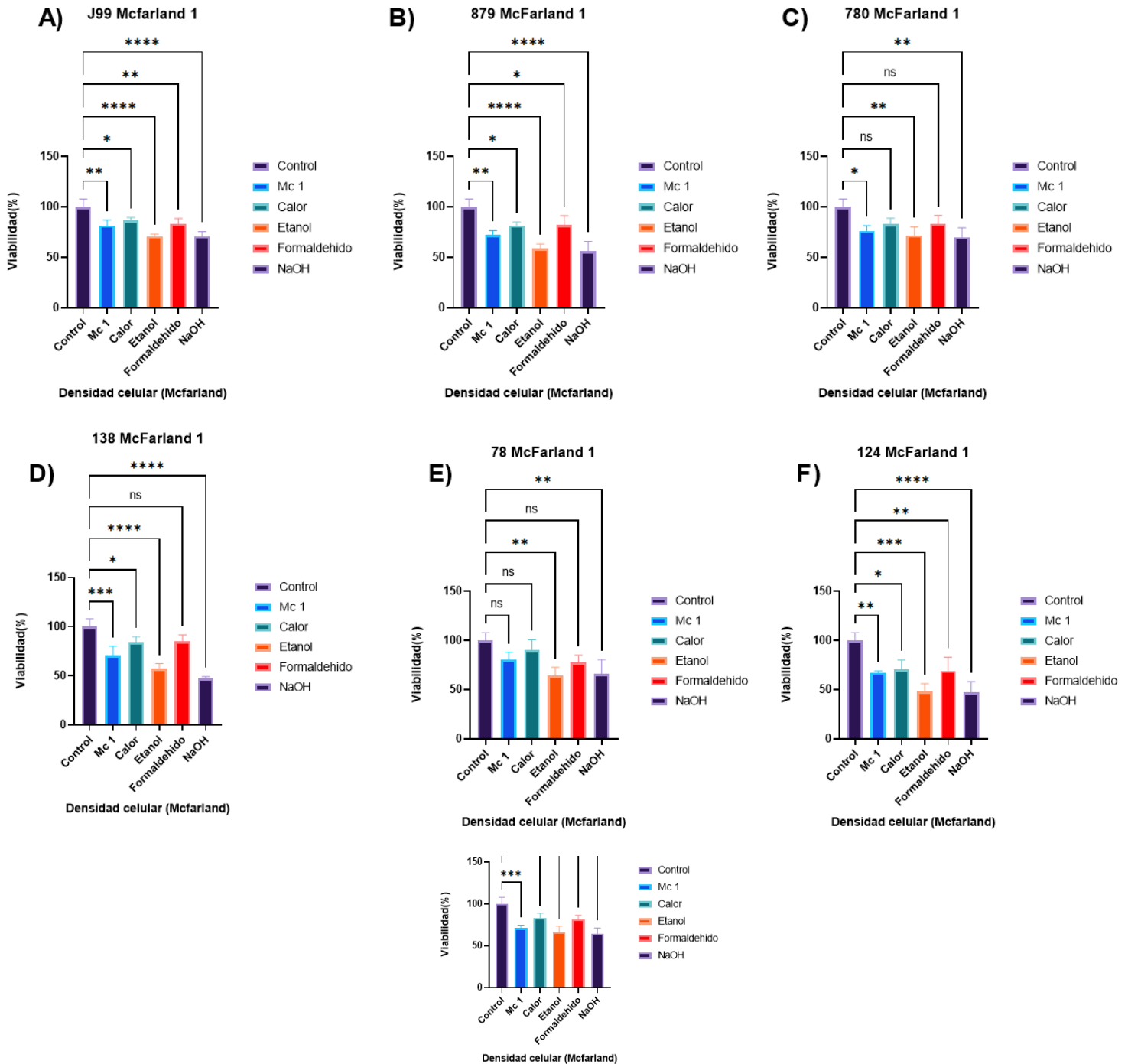
Gráficos 5: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS incubadas en conjunto con distintas densidades celulares (Mcfarland) de cepas clínicas y comerciales de *H. pylori*. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el análisis ANOVA one way donde la diferencia significativa con respecto al control fue representada mediante * $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,0005$.



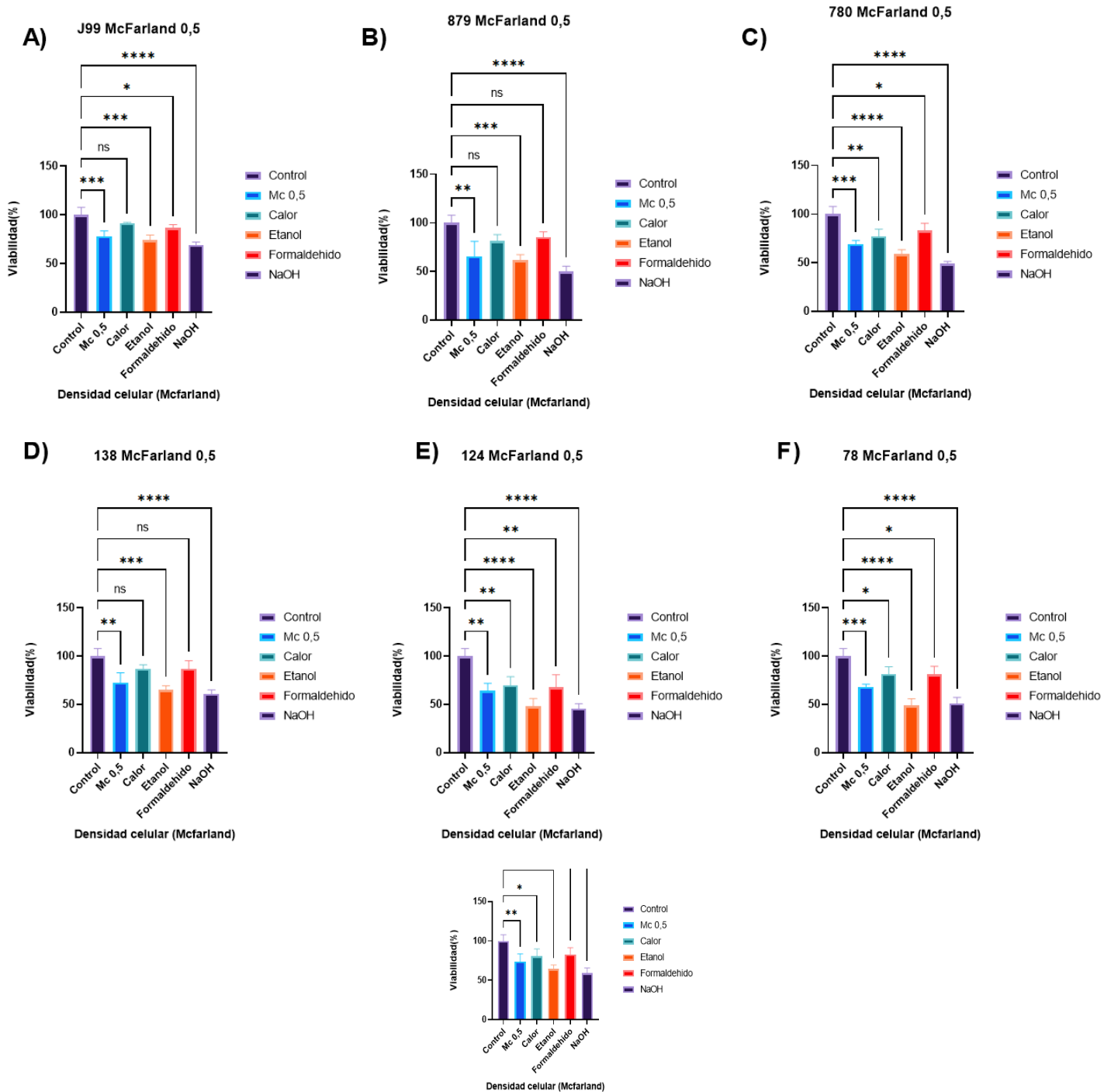
Gráficos 14: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS en conjunto con cepas de *H. pylori* sometidas a distintos protocolos de inactivación. Estos ensayos fueron realizados a densidades celulares de McFarland 2. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el análisis ANOVA one way donde la diferencia significativa con respecto al control fue representada mediante: * $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,0005$.



Gráficos 23: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS en conjunto con cepas de *H. pylori* sometidas a distintos protocolos de inactivación. Estos ensayos fueron realizados a densidades celulares de McFarland 1. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el análisis ANOVA one way donde la diferencia significativa con respecto al control fue representada mediante * $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,0005$.



Gráficos 30: Resultados de viabilidad (Ensayo de Sulforodamina B) de células AGS en conjunto con cepas de *H. pylori* sometidas a distintos protocolos de inactivación. Estos ensayos fueron realizados a densidades celulares de McFarland 0,5. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el análisis ANOVA one way donde la diferencia significativa con respecto al control fue representada mediante * $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,0005$.



DISCUSIÓN

H. pylori es considerado un organismo de alta prioridad según la OMS (Tacconelli *et al.*, 2018), esto debido a su resistencia frente a claritromicina. Cabe mencionar los altos niveles de resistencia de *H. pylori* en nuestro país frente a los demás antibióticos, donde podemos destacar la resistencia frente a levofloxacina (20,8%), alcanzado niveles igual de relevantes que frente al macrólido (29,2%) (Arenas *et al.*, 2019; Oporto *et al.*, 2019; Parra-Sepúlveda *et al.*, 2019). A raíz de esto, nuevamente es importante recalcar que debido a los estudios epidemiológicos y según la bibliografía reciente, nuestro país debería utilizar la terapia cuádruple como terapia de primera línea, pero en el caso de fallar, no tendríamos opciones terapéuticas confiables para erradicar al patógeno (Fallone *et al.*, 2016). Es por esto que en los últimos consensos de Maastricht (Malfertheiner *et al.*, 2022), se ha establecido que la generación de una vacuna ya sea profiláctica o terapéutica, sería una contribución especialmente importante para tratamiento de este patógeno tan ligado al cáncer gástrico (Wroblewski *et al.*, 2010).

A raíz de esto, en este trabajo nos centramos en los primeros pasos para el desarrollo de una vacuna contra esta bacteria, donde debido a su plasticidad genética y fenotípica, decidimos estandarizar un protocolo de inactivación de *H. pylori*, para posteriormente proponer la creación de una autovacuna contra el patógeno, y de esta forma realizar un tratamiento terapéutico efectivo y dirigido.

Para llevar esto a cabo, se utilizaron y estandarizaron protocolos de inactivación descritos previamente en literatura (Taddese *et al.*, 2021). Para generar los distintos puntos de comparación y poder discriminar las ventajas sobre uno u el otro, se realizaron los distintos ensayos descritos a lo largo de este trabajo. Donde en primera instancia, con el fin de comprobar la eficacia de los protocolos utilizados, se evaluó la viabilidad posterior a cada protocolo de inactivación utilizado. Se realizaron curvas de crecimiento del patógeno (Gráficos 1), en donde todos los protocolos utilizados lograron inhibir el crecimiento del patógeno durante 48 horas. En paralelo, podemos observar el crecimiento de las muestras que no fueron sometidas a ningún protocolo de inactivación, asociadas a las 7 cepas utilizadas. En todas podemos observar su fase exponencial comienza a las 12 horas, lo cual se correlaciona con literatura (Sánchez-Alonzo *et al.*, 2021). Estos resultados implican que todos los protocolos estarían cumpliendo su función principal, matar al patógeno. En comparación con lo descrito por Tadesse y colaboradores, podemos encontrar correlación con los resultados obtenidos, en donde la mayoría de los protocolos, presentan un recuento de 0 UFC/mL.

Si bien estos ensayos demostraron la capacidad de inactivación de todos los protocolos, los resultados no mostraron diferencias entre ellos, esto es relevante debido a que es necesario diferenciar las ventajas o desventajas entre los protocolos. Para esto, se evaluó la agresividad de los distintos protocolos sobre

la integridad de la membrana de las cepas evaluadas, con el fin de identificar y generar la relación con el daño a nivel de los antígenos presentes.

Para ello se utilizaron dos metodologías, la primera se basó en el marcaje con FITC y DAPI, donde utilizando marcaje de FITC, el cual se une a las proteínas de membrana, reaccionando con los enlaces amino primarios uniéndose covalentemente (Mao & Mullins, 2010), a raíz de esto, podríamos generar una analogía para evaluar el daño a nivel de la membrana, donde a un mayor grado de fluorescencia, implicará una mayor integridad de membrana. Por otra parte, DAPI, se une a las regiones ricas en AT del ADN (Glavin *et al.*, 2004), el cual nos permite identificar si el ADN se mantiene al interior de las células evaluadas. A partir de lo anterior, podemos interpretar si la integridad de membrana se vio afectada debido a la relación con la salida del ADN hacia el medio extracelular.

Interpretando los resultados obtenidos, podemos observar ciertos patrones, en donde podemos observar que los resultados asociados a FITC (Tabla 6) denotan una clara fluorescencia en el caso de las muestras tratadas con etanol y formaldehído. Cabe mencionar que ambos reactivos, a pesar de ser fijadores, no presentan ninguna interferencia en las muestras sometidas a los protocolos de inactivación y los controles (Taddese *et al.*, 2021).

.Por otra parte, en el caso de las muestras inactivadas por calor, se observan resultados similares exceptuando la cepa 879, donde se una disminución de fluorescencia. Finalmente, en el caso de NaOH, podemos observar una muy baja fluorescencia en todas las cepas. A partir de lo anterior, podemos inferir que los

protocolos menos agresivos bajo este concepto son etanol y formaldehído, resultados que nuevamente se correlacionan con los descritos previamente (Taddese *et al.*, 2021) no se menciona el efecto del fijador en la fluorescencia. Al momento de comparar estos resultados con los obtenidos mediante la tinción con DAPI, podemos observar resultados que se correlacionan entre sí, donde nuevamente el marcaje a las muestras de formaldehído y etanol fueron los que presentaron resultados más favorables en comparación con NaOH y calor. El reactivo formaldehído es ampliamente utilizado en la fijación de muestras para su posterior visualización, esta molécula interactúa principalmente con las aminas primarias, ácidos grasos, ácidos nucleicos, deteniendo distintos procesos metabólicos generando la inactivación del patógeno, al mismo tiempo debido a su pequeño tamaño no afecta de gran manera la integridad de la membrana (Chua *et al.*, 2019), lo cual se relaciona con los resultados obtenidos. Por otra parte, previamente se ha descrito la efectividad del etanol al inactivar a bacterias manteniendo el ADN al interior de las células, esto mediante la interacción con las proteínas de membrana y deshidratando a la bacteria (McDonnell & Russell, 1999). A pesar de lo anterior y que mostró resultados favorables, se ha descrito (Taddese *et al.*, 2021) que el etanol posee la capacidad de romper lipoproteínas de la membrana, disminuyendo la producción de antígenos y por lo tanto la inmunización (Chao and Zhang, 2011; Kniggendorf *et al.*, 2011). En el caso puntual de NaOH, los resultados se pueden justificar debido a que las moléculas de este reactivo entran a la membrana mediante la generación de poros a nivel

de la estructura, liberando el contenido celular y generando fantasmas (Taddese *et al.*, 2021). Finalmente, en el caso del calor, los cambios a nivel de la estructura son derivados del cambio conformacional generado por las altas temperaturas empleadas, deformando la membrana y derivando en la salida del contenido intracelular (Smelt & Brul, 2014). Con el fin de relacionar los análisis realizados bajo microscopía de fluorescencia, se cuantificó el ADN en el sobrenadante (Tabla 8), resultados que presentaron una correlación con los ensayos descritos en las tablas 6 y 7, donde una mayor cantidad de ADN en el sobrenadante se vio en el caso de la inactivación mediada por NaOH y calor.

En paralelo a los ensayos descritos previamente, se evaluó la integridad de membrana mediante microscopía electrónica de barrido, donde cuantificaron la presencia de estructuras extracelulares, las cuales se asocian a daño a nivel de la membrana. En este ensayo nuevamente vemos una correlación con los resultados descritos previamente, donde se puede observar que la integridad de membrana de las muestras tratadas con etanol y formaldehído se ven más íntegras que las tratadas con calor, con menor cantidad de irregularidades (Ilustración 1) y al mismo tiempo, al momento de cuantificar la presencia de ECS, se ve un menor porcentaje (Tabla 5). El resultado que más destaca es la estrecha diferencia entre la presencia de ECS de las muestras inactivadas mediante NaOH y etanol. A partir de todo lo mencionado previamente, podemos justificar los resultados obtenidos debido a los mecanismos por los cuales inactivan al

patógeno, donde la inactivación mediada por formaldehído es la menos agresiva en comparación con los demás tratamientos (Kniggendorf *et al.*, 2011; Smelt & Brul, 2014; Taddese *et al.*, 2021).

Finalmente, una vez realizado los ensayos de viabilidad y evaluación de integridad de membrana. Estos ensayos se efectuaron con el fin de servir como piloto para futuros ensayos en modelo animal. Para llevar esto a cabo, se realizó el ensayo de Sulforodamina B(SRB), este ensayo se basa en la habilidad de unirse a componentes proteicos de las células previamente fijadas en placas de cultivo con TCA (Vichai & Kirtikara, 2006). En primera instancia, se decidió estandarizar el protocolo a distintas concentraciones de densidad celular basadas en la escala McFarland, en donde en la mayoría de las cepas se ve una disminución gradual de la viabilidad celular a excepción de casos puntuales (Conjunto de gráficos 2), lo cual sugiere que al aumentar la concentración de células bacterianas, disminuye la viabilidad celular, esto sigue la lógica debido a la gran variabilidad de proteínas potencialmente citotóxicas presente en las cepas de *H. pylori* (Yamaoka, 2010). Posterior a la estandarización, se repitieron los ensayos a distintas densidades celulares con los protocolos de inactivación. En los Gráficos 3, podemos observar diferencia estadísticamente significativa entre el control y la muestra sin inactivar a concentraciones McFarland 2. En conjunto con lo anterior, en la mayoría de los casos de los protocolos de inactivación, a pesar de haberse comprobado la efectividad de éstos, se obtuvieron resultados de citotoxicidad estadísticamente iguales a la muestra que no sufrió ningún

protocolo de inactivación, esto se puede asociar a la densidad utilizada, donde en paralelo, residuos de los reactivos utilizados pudieron quedar en la muestra. Si bien, el protocolo de inactivación es bastante similar a ensayos descritos en literatura (Raghavan *et al.*, 2002), la densidad celular y la concentración de los reactivos puede diferir, futuros ensayos en modelo animal deben ser realizados con el fin de llegar a resultados concluyentes.

Por último, al momento de analizar la citotoxicidad de las muestras inactivadas por calor y formaldehído, al reducir la densidad celular, protocolos de inactivación no presentaron diferencias significativas con relación al control, como es el caso de la cepa 138,78 y 780. A raíz de esto, los resultados sugieren que es necesario evaluar otras densidades celulares con el fin de generar resultados lo menos citotóxicos posibles. A raíz de lo anterior, es importante considerar los resultados entregados por la inactivación mediada por formaldehído, ya que se puede observar que a las densidades celulares de McFarland 1 y 0,5, cepas presentaron resultados estadísticamente iguales a la muestra control, sugiriendo una baja citotoxicidad y por lo tanto resultados prometedores para ser efectuados en modelo animal.

CONCLUSIÓN

1. Los resultados sugieren que el protocolo que inactiva al patógeno, mantiene su integridad de membrana y posee un bajo potencial de citotoxicidad, es el mediado por formaldehído; sin embargo, es necesario realizar ensayos en modelo animal y con un mayor número de cepas para llegar a resultados concluyentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abadi, A. T. B. (2016). Vaccine against *Helicobacter pylori*: Inevitable approach. *World Journal of Gastroenterology*, 22(11), 3150. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i11.3150>
2. Arsenakis I, Boyen F, Haesebrouck F, Maes DGD. Autogenous vaccination reduces antimicrobial usage and mortality rates in a herd facing severe exudative epidermitis outbreaks in weaned pigs. *Vet Rec.* 2018; 182(26): 744.
3. Malfertheiner, P., Megraud, F., Rokkas, T., Gisbert, J. P., Liou, J.-M., Schulz, C., Gasbarrini, A., Hunt, R. H., Leja, M., O'Morain, C., Rugge, M., Suerbaum, S., Tilg, H., Sugano, K., & El-Omar, E. M. (2022). Management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*, 71(9), 1724-1762. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745>
4. Arenas, A., Serrano, C., Quiñones, L., Harris, P., Sandoval, M., Lavanderos, M., Sepúlveda, R., Maquilón, S., Echeverría, A., Ríos, C., Fuentes-López, E., Rojas, L., Jorquera, A., Pizarro, M., Camargo, M. C., & Riquelme, A. (2019a). High prevalence of clarithromycin resistance and effect on *Helicobacter pylori* eradication in a population from Santiago, Chile: Cohort study and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 20070. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56399-7>

5. Arenas, A., Serrano, C., Quiñones, L., Harris, P., Sandoval, M., Lavanderos, M., Sepúlveda, R., Maquilón, S., Echeverría, A., Ríos, C., Fuentes-López, E., Rojas, L., Jorquera, A., Pizarro, M., Camargo, M. C., & Riquelme, A. (2019b). High prevalence of clarithromycin resistance and effect on *Helicobacter pylori* eradication in a population from Santiago, Chile: Cohort study and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 20070.
6. Camacho, A. I., Souza-Rebouças, J., Irache, J. M., & Gamazo, C. (2013). Towards a non-living vaccine against *Shigella flexneri*: From the inactivation procedure to protection studies. *Methods*, 60(3), 264–268. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.008
7. Cefai, C., Richards, J., Gould, F. K., & McPeake, P. (1990a). An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *Journal of Hospital Infection*, 15(2), 177-182. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(90\)90128-B](https://doi.org/10.1016/0195-6701(90)90128-B)
8. Cefai, C., Richards, J., Gould, F. K., & McPeake, P. (1990b). An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *Journal of Hospital Infection*, 15(2), 177-182. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(90\)90128-B](https://doi.org/10.1016/0195-6701(90)90128-B)
9. Cefai, C., Richards, J., Gould, F. K., & McPeake, P. (1990c). An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *Journal of Hospital Infection*, 15(2), 177-182. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(90\)90128-B](https://doi.org/10.1016/0195-6701(90)90128-B)

10. Chua, J., Bozue, J. A., Klimko, C. P., Shoe, J. L., Ruiz, S. I., Jensen, C. L., Tobery, S. A., Crumpler, J. M., Chabot, D. J., Quirk, A. V., Hunter, M., Harbour, D. E., Friedlander, A. M., & Cote, C. K. (2019). Formaldehyde and Glutaraldehyde Inactivation of Bacterial Tier 1 Select Agents in Tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 25(5), 919-926. <https://doi.org/10.3201/eid2505.180928>
11. Elveborg S, Monteil VM, Mirazimi A. Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes. *Pathogens*. 2022 Feb 19;11(2):271. doi: 10.3390/pathogens11020271.
12. Fallone, C. A., Chiba, N., van Zanten, S. V., Fischbach, L., Gisbert, J. P., Hunt, R. H., Jones, N. L., Render, C., Leontiadis, G. I., Moayyedi, P., & Marshall, J. K. (2016). The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology*, 151(1), 51-69.e14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.006>
13. García, A. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5632. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5632>
14. Gerrits, M. M., de Zoete, M. R., Arents, N. L. A., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2002). 16S rRNA Mutation-Mediated Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2996-3000. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2996-3000.2002>

15. Giedrys-Galant S. Effect of autovaccine on various immunologic indices in chronic staphylococcal infections, *Annales Academiae Medicae Stetinensis*. 1977 ;23:279-303. PMID: 606004.
16. Gisbert JP. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J Gastroenterol*. 2008 Sep 21;14(35):5385-402. doi: 10.3748/wjg.14.5385.
17. Glavin, D. P., Cleaves, H. J., Schubert, M., Aubrey, A., & Bada, J. L. (2004). New method for estimating bacterial cell abundances in natural samples by use of sublimation. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5923-5928. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5923-5928.2004>
18. Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. del L. (2012). Review: Efficiency of Physical and Chemical Treatments on the Inactivation of Dairy Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00282>
19. Hałasa J, Giedrys-Galant S, Podkowińska I, et al. Evaluation of certain immunological parameters in the course of autovaccine treatment in patients with chronic ostitis and carbunculus. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 1978 ;26(1-6):589-593.
20. Hatakeyama, M. (2004). *Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein*. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 688–694. doi:10.1038/nrc1433
21. Kamiya, S., & Backert, S. (Eds.). (2019). *Helicobacter pylori in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*

Volume 11 (Vol. 1149). Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-21916-1>

22. Keikha, M., Eslami, M., Yousefi, B., Ghasemian, A., & Karbalaei, M. (2019). Potential antigen candidates for subunit vaccine development against *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Cellular Physiology*, 234(12), 21460-21470. <https://doi.org/10.1002/jcp.28870>
23. Ke, Y. J., Qin, X. D., Zhang, Y. C., Li, H., Li, R., Yuan, J. L., ... & Ding, S. M. (2014). In vitro study on cytotoxicity and intracellular formaldehyde concentration changes after exposure to formaldehyde and its derivatives. *Human & experimental toxicology*, 33(8), 822-830.
24. Kniggendorf, A.-K., Gaul, T. W., & Meinhardt-Wollweber, M. (2011). Effects of ethanol, formaldehyde, and gentle heat fixation in confocal resonance Raman microscopy of purple nonsulfur bacteria. *Microscopy Research and Technique*, 74(2), 177-183. <https://doi.org/10.1002/jemt.20889>
25. Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P. H., Stremmel, W., & Rudi, J. (2001). Vacuolating Cytotoxin of *Helicobacter pylori* Induces Apoptosis in the Human Gastric Epithelial Cell Line AGS. *Infection and Immunity*, 69(8), 5080-5087. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5080-5087.2001>
26. López-Martín, L., Alcover-Díaz, J., Charry-Gónima, P., González-López, R., Rodríguez-Gil, D., Palacios-Peláez, R., & González-Enguita, C. (2019). Prospective Observational Cohort Study of the Efficacy of Bacterial Immune Prophylaxis in the Prevention of Uncomplicated, Recurrent Urinary Tract

- Infections. *Urologia Internationalis*, 102(4), 449-455.
<https://doi.org/10.1159/000497107>
27. Lovschall, H., Eiskjaer, M., & Arenholt-Bindslev, D. (2002). *Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. Toxicology in Vitro*, 16(1), 63–69. doi:10.1016/s0887-2333(01)00093-5
28. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D. Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., & El-Omar, E. M. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, 66(1), 6-30.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
29. Malfertheiner, P., Megraud, F., Rokkas, T., Gisbert, J. P., Liou, J.-M., Schulz, C., Gasbarrini, A., Hunt, R. H., Leja, M., O'Morain, C., Rugge, M., Suerbaum, S., Tilg, H., Sugano, K., & El-Omar, E. M. (2022). Management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*, 71(9), 1724-1762. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745>
30. Masaoka, T., Suzuki, H., Kamiya, A. G., & Ishii, H. (2004). *Second-line treatment of Helicobacter pylori infection after dilution agar methods and PCR-RFLP analysis. Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 20(s1), 68–73.
31. Mao, S.-Y., & Mullins, J. M. (2010). Conjugation of Fluorochromes to Antibodies. En C. Oliver & M. C. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods*

- and Protocols* (pp. 43-48). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_6
32. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
33. Miyachi, H., Miki, I., Aoyama, N., Shirasaka, D., Matsumoto, Y., Toyoda, M., Mitani, T., Morita, Y., Tamura, T., Kinoshita, S., Okano, Y., Kumagai, S., & Kasuga, M. (2006). Primary Levofloxacin Resistance and *gyrA/B* Mutations Among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter*, 11(4), 243-249. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00415.x>
34. O'Connor, A., Furuta, T., Gisbert, J. P., & O'Morain, C. (2020). Review – Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2020. *Helicobacter*, 25(S1). <https://doi.org/10.1111/hel.12743>
35. Oporto, M., Pavez, M., Troncoso, C., Cerda, A., Hofmann, E., Sierralta, A., Rios, E., Coppelli, L., & Barrientos, L. (2019). Prevalence of Infection and Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*: An Evaluation in Public and Private Health Systems of Southern Chile. *Pathogens*, 8(4), 226. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040226>
36. Parra-Sepúlveda, C., Merino, J. S., Sáez-Carrillo, K., González, C., & García-Cancino, A. (2019). antibiotic resistance surveillance of *helicobacter pylori* at the biobío region (chile) in a decade. *Archivos de Gastroenterología*, 56(4), 361-366. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.201900000-72>

37. Pourakbari, B., Mahmoudi, S., Parhiz, J., Sadeghi, R., Monajemzadeh, M., & Mamishi, S. (2018a). High frequency of metronidazole and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *British Journal of Biomedical Science*, 75(2), 61-65. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1391466>
38. Pourakbari, B., Mahmoudi, S., Parhiz, J., Sadeghi, R., Monajemzadeh, M., & Mamishi, S. (2018b). High frequency of metronidazole and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *British Journal of Biomedical Science*, 75(2), 61-65. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1391466>
39. Power, M. H., Zamora, O. R., & Rodríguez, B. L. (s. f.). *La resistencia a antibióticos en Helicobacter pylori*. 13.
40. Preda, Mădălina, Mara Mădălina Mihai, and Mircea Ioan Popa. "Clinical effects of bacterial autologous vaccine in dermatological persistent infections." *Romanian Archives of Microbiology and Immunology* 79.3 (2020): 165-169.
41. Raghavan, S., Hjulström, M., Holmgren, J., & Svennerholm, A.-M. (2002). Protection against Experimental *Helicobacter pylori* Infection after Immunization with Inactivated *H. pylori* Whole-Cell Vaccines. *Infection and Immunity*, 70(11), 6383-6388. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6383-6388.2002>

42. Sakinc, T., Baars, B., Wüppenhorst, N., Kist, M., Huebner, J., & Opferkuch, W. (2012). Influence of a 23S ribosomal RNA mutation in *Helicobacter pylori* strains on the in vitro synergistic effect of clarithromycin and amoxicillin. *BMC Research Notes*, 5(1), 603. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-603>
43. Sánchez-Alonzo, K., Arellano-Arriagada, L., Castro-Seriche, S., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Benavidez-Hernández, H., Campos, V. L., Sáez, K., Smith, C. T., & García-Cancino, A. (2021). Temperatures Outside the Optimal Range for *Helicobacter pylori* Increase Its Harboring within Candida Yeast Cells. *Biology*, 10(9), 915. <https://doi.org/10.3390/biology10090915>
44. Saracino, I. M., Pavoni, M., Zullo, A., Fiorini, G., Lazzarotto, T., Borghi, C., & Vaira, D. (2021). Next Generation Sequencing for the Prediction of the Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Literature Review. *Antibiotics*, 10(4), 437. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040437>
45. Scott Algood, H. M., Gallo-Romero, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., & Cover, T. L. (2007). Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(3), 577–586. doi:10.1111/j.1574-695x.2007.00338.x
46. Smelt, J. P. P. M., & Brul, S. (2014). Thermal Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(10), 1371-1385. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.637645>

47. Šterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., & Homan, M. (2019). *Helicobacter pylori* virulence genes. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(33), 4870-4884. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i33.4870>
48. Sutton, P., & Boag, J. M. (2019). Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. *Vaccine*, *37*(50), 7295-7299. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.001>
49. Sutton, P., & Chionh, Y. T. (2013). Why can't we make an effective vaccine against *Helicobacter pylori*? *Expert Review of Vaccines*, *12*(4), 433-441. <https://doi.org/10.1586/erv.13.20>
50. Szkaradkiewicz, A., Karpiński, T. M., Goślińska-Pawłowska, O., Szkaradkiewicz, A. K., & Giedrys-Kalemba, S. (2013). Cytokine Response in Autovaccine-Treated Patients with Chronic *Staphylococcus Aureus* Infections. *European Journal of Inflammation*, *11*(1), 103-110. <https://doi.org/10.1177/1721727X1301100110>
51. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

52. Taddese, R., Belzer, C., Aalvink, S., de Jonge, M. I., Nagtegaal, I. D., Dutilh, B. E., & Boleij, A. (2021a). Production of inactivated gram-positive and gram-negative species with preserved cellular morphology and integrity. *Journal of Microbiological Methods*, *184*, 106208. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106208>
53. Taddese, R., Belzer, C., Aalvink, S., de Jonge, M. I., Nagtegaal, I. D., Dutilh, B. E., & Boleij, A. (2021b). Production of inactivated gram-positive and gram-negative species with preserved cellular morphology and integrity. *Journal of Microbiological Methods*, *184*, 106208. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106208>
54. Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006a). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112-1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
55. Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006b). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112-1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
56. Wilson, K. T., & Crabtree, J. E. (2007). *Immunology of Helicobacter pylori: Insights Into the Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies*. *Gastroenterology*, *133*(1), 288–308. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.008
57. Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010a). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(4), 713-739. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>

58. Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010b). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713-739. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>
59. Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(11), 629-641. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.154>
60. Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W. H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., & Derakhshan, M. H. (2018). Systematic review with meta-analysis: The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47(7), 868-876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>
61. Załuga E. Odczyny, Skin reactions to antigens of propionibacterium acnes in patients with acne vulgaris treated with autovaccine. *Ann Acad Med Stetin*. 1998; 44:65-85.
62. Zeng, M., Mao, X.-H., Li, J.-X., Tong, W.-D., Wang, B., Zhang, Y.-J., Guo, G., Zhao, Z.-J., Li, L., Wu, D.-L., Lu, D.-S., Tan, Z.-M., Liang, H.-Y., Wu, C., Li, D.-H., Luo, P., Zeng, H., Zhang, W.-J., Zhang, J.-Y., ... Zou, Q.-M. (2015). Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 386(10002), 1457-1464. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60310-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60310-5)