



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**COMPARACIÓN DE LAS CAPACIDADES
ADAPTATIVAS DE CEPAS DE *HELICOBACTER
PYLORI* CON DIFERENTES PERFILES DE
SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA**

POR MACARENA BELÉN DERIDE ALEGRÍA

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Patrocinante y Guía

Apolinaria García Cancino
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Cristian Andrés Parra
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agosto, 2023
Concepción, Chile

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

© 2023, Macarena Belén Deride Alegría

Tesis dedicada a Silvio, aquí voy, por la vida
que merecemos.

I AGRADECIMIENTOS

No desaprovecharé la oportunidad de plasmar en esta página mis sentimientos de agradecimiento a cada uno de los personajes que de alguna u otra manera sus acciones y acompañamiento permitieron que yo finalizara esta última etapa académica que, debido a diversas circunstancias adversas, sentía imposible de terminar.

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Apolinaria Garcia Cancino, quien me recibió una vez más en las instalaciones de su laboratorio. Sus comentarios siempre estuvieron enfocados en la mejora continua de mi trabajo y recordándome continuamente que el trabajo con *H. pylori* no es fácil.

A Cristian Parra, quien me ha enseñado todo lo relacionado con el cultivo de *H. pylori*, quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Sus valiosas correcciones y orientación han contribuido de manera significativa a mi proceso de aprendizaje.

Al personal de laboratorio y del departamento, por su excelente disposición cuando necesite ayuda y orientación en el laboratorio.

A la comisión revisora, quiero expresar mi agradecimiento por su orientación y apoyo desde el inicio hasta la culminación de mi tesis.

A mis hermanos, quiero expresar mi profundo agradecimiento por su gran apañe los últimos años.

A mi padre, por su reconfortante amor y paciencia.

Y un muy especial reconocimiento a mi mejor amigo, Luciano Arellano, quien siempre se preocupaba por cómo estaba yo, más allá del progreso de mi tesis. Tu apoyo incondicional y tu interés genuino en mi bienestar fueron un gran impulso durante esta etapa.

Gracias a todos y todas.

II TABLA DE CONTENIDOS

III INDICE DE TABLAS	7
IV INDICE DE ILUSTRACIONES.....	8
V RESUMEN.....	9
VI INTRODUCCIÓN.....	10
6.1 <i>Helicobacter pylori</i>	10
6.2 El problema en el tratamiento de erradicación de <i>H. pylori</i>	11
6.3 Autovacuna como estrategia de tratamiento	18
6.4 Mecanismos adaptativos de <i>H. pylori</i>	20
6.4.1 Biopelícula.....	21
6.4.2 Cambio de morfología bacilar a cocoide	23
6.4.3 Ingreso a levaduras	24
VII PLANTEAMIENTO PROBLEMA	26
VIII HIPÓTESIS	27
IX OBJETIVOS	28
X MATERIALES Y MÉTODOS	29
10.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano.....	29
10.2 Cultivo de <i>Candida albicans</i>	29
10.3 Ensayo de formación de biopelícula.....	30
10.4 Ensayo de cambio a morfología cocoide	31
10.5 Ensayo ingreso a levaduras	32
10.6 Análisis de resultados.....	33
XI RESULTADOS	34
XII DISCUSIÓN.....	48
XIII CONCLUSIONES.....	56
XIV BIBLIOGRAFÍA	57

III INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de las cepas según producción de biopelícula.	31
Tabla 2: CMI de las cepas del estudio por el método de dilución en agar.	35
Tabla 3: D.O.c calculados	39
Tabla 4: Rangos de corte definidos para la clasificación tipo de productor de biopelícula.....	39

IV INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Algoritmos para el tratamiento de H. pylori	14
Ilustración 2: Esquema resumen con resistencia antibiótica en Chile.....	17
Ilustración 3: Recopilación imágenes de cultivo.....	36
Ilustración 4: Progreso de producción de biopelícula.....	38
Ilustración 5: Producción de biopelícula a las 24h.	40
Ilustración 6: Producción de biopelícula a las 48h.	41
Ilustración 7: Comparación de producción de biopelícula.....	42
Ilustración 8: Muestra con levaduras con CPB y control negativo.	43
Ilustración 9: Ingreso a levaduras en el tiempo.	44
<i>Ilustración 10:</i> Ingreso a levaduras en el tiempo del grupo resistente.	44
Ilustración 11: Ingreso a levaduras en el tiempo del grupo susceptible.	45
Ilustración 12: Cambio a morfología cocoide en el tiempo.....	46
<i>Ilustración 13:</i> Cambio a morfología cocoide grupo susceptible.	46
Ilustración 14: Cambio a morfología cocoide grupo resistente.	47

V RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria cosmopolita de alta prevalencia en Chile. Esta infección se relaciona a múltiples enfermedades gastrointestinales donde destaca su implicancia en el desarrollo de cáncer gástrico. Se ha reportado que ciertos mecanismos estarían implicados en la resistencia antibiótica y por ende en el fracaso terapéutico. Algunos de estos mecanismos son su capacidad para formar biopelícula, hacer ingreso a levaduras y cambiar su morfología. El objetivo de este estudio fue evaluar si existe una diferencia entre cepas catalogadas fenotípicamente como resistentes o susceptibles a antibióticos y su capacidad para desempeñar estos mecanismos. Se determinó que el 100% de las cepas clínicas del sur de Chile eran formadoras de biopelícula, hacían ingreso a levaduras a distintas magnitudes y presentaban una morfología cocoide en cultivos prolongados a distintos tiempos. Si bien no se encontró una diferencia significativa entre grupos de distinta susceptibilidad si se puede concluir que estas capacidades están presentes transversalmente en cepas de *H. pylori* de la región sur de Chile pudiendo favorecer su poder de infección, resistencia antibiótica y contribuyendo así a la falla en el tratamiento.

VI INTRODUCCIÓN

6.1 *Helicobacter pylori*

La bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fue identificada y cultivada por primera vez por Marshall y Warren en 1984 desde el estómago de pacientes con gastritis y ulceración péptica (Marshall & Warren, 1984). Hoy en día sabemos que es una bacteria Gram negativa microaerófila que es capaz de colonizar mucosa secretora de ácido del sistema gastrointestinal en humanos (Sachs *et al.*, 2011) y en otros animales (Dimola & Caruso, 1999).

Según un metaanálisis del año 2018, se estima que el 44,3 % de la población mundial estaría infectada con este patógeno (Zamani *et al.*, 2018), porcentaje que aumenta para países en desarrollo (de Martel *et al.*, 2012; Suerbaum & Michetti, 2002). Su incidencia está relacionada con el nivel socioeconómico de cada región geográfica y, por consiguiente, de su higiene alimentaria (Hooi *et al.*, 2017). En el caso de Chile, en el año 2007 la prevalencia para *H. pylori* reportada en adultos asintomáticos fue de un 73 % (Ferreccio *et al.*, 2007), siendo un problema de salud importante para el país.

La infección por *H. pylori* es motivo importante de estudio debido a que se le relaciona con diferentes patologías gastrointestinales desarrolladas por su presencia o bien agravadas por la misma, entre ellas: gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (tipo

MALT) (Bravo *et al.*, 2018). También se ha establecido su relación con otras patologías fuera del sistema digestivo como púrpura trombocitopénica idiopática, anemia ferropénica y deficiencia de vitamina B12 (Ramachandran *et al.*, 2021; Tsay & Hsu, 2018).

A *H. pylori* se le ha considerado desde el año 1994 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como un factor carcinógeno de Clase I para el cáncer gástrico y los linfomas de tejido linfoide asociados a la mucosa gástrica (Møller, 1994), enfermedades que son un problema grave de salud en la población. En Chile cerca de 3.317 personas fallecieron en el año 2020 a causa de cáncer gástrico, lo que vendría correspondiendo a la segunda causa de muerte por neoplasia maligna en Chile (Sung *et al.*, 2021). Además, al ser considerado un patógeno de tipo infeccioso y por recomendación del último reporte del consenso de Maastricht VI/Florence (Malfertheiner *et al.*, 2022) se establece que se debe erradicar la infección por esta bacteria siempre que se detecte su presencia, aun cuando el individuo se encuentre asintomático, este enfoque preventivo permite disminuir las tasas de cáncer gástrico y otras enfermedades gastrointestinales en la población.

6.2 El problema en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*

Actualmente los tratamientos para erradicar la infección por *H. pylori* consisten en la combinación de agentes antimicrobianos y agentes anti secretores de ácido clorhídrico, de estos últimos, los inhibidores de la bomba de protones son los más utilizados (Yang & Lin, 2010). El tratamiento antibiótico puede ser

complementado con probióticos que buscan principalmente proteger la microbiota del huésped y disminuir los efectos adversos propios del tratamiento, como lo es la diarrea. Aunque se ha estudiado ampliamente el uso de probióticos como complemento en el tratamiento de la infección, no se ha establecido de manera concluyente que su uso genere una mejora significativa en la tasa de erradicación de la infección por *H. pylori* (Cremonini *et al.*, 2002).

Se han establecido diferentes combinaciones de agentes antimicrobianos y agente anti secretores para la erradicación de la infección. Inicialmente, pautas internacionales consolidadas por expertos en microbiología destacaban como tratamiento de primera línea a la terapia triple estándar (TTE) basada en claritromicina (CLA), esta consiste en la administración de dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol principalmente), CLA es usada como antibiótico principal y amoxicilina (AMX) como segundo antibiótico en un periodo de 7 a 14 días.

Se ha propuesto evaluar los resultados de los regímenes terapéuticos mediante el uso de tarjetas de informe (Graham *et al.*, 2007) en donde según el porcentaje de erradicación logrado se etiquetaría como A Excelente (95% -100%), B o buena (90% -95%), C o regular (85% -89%), D pobre (81% -84%) y menor o igual a 80 % como F o inaceptable.

Aunque la TTE demostró altos niveles de efectividad inicialmente, con porcentajes de erradicación superiores al 90%, en las últimas décadas y

especialmente con el aumento de la prevalencia de resistencia antibiótica, los porcentajes de erradicación han disminuido considerablemente, alcanzando niveles categorizados como inaceptables. Actualmente la TTE ha sido desplazada por las terapias consideradas como "de rescate" debido principalmente a la creciente resistencia a CLA en diferentes regiones (Yang *et al.*, 2014).

Ya en 2007 el American College of Gastroenterology (Chey *et al.*, 2007) informaba de tasas de erradicación del 70% al 85% a nivel mundial y si se consideraban a pacientes coinfectados con cepas multi resistentes este porcentaje podía disminuir a un 37 % (Feng *et al.*, 2016; Gatta *et al.*, 2013).

De esta manera, en zonas en donde la resistencia a CLA sea superior a un 15% se considerarán terapias de primera línea a la terapia cuádruple con Bismuto o cuádruple sin bismuto de acuerdo a la disponibilidad de éste, el bismuto permite entre otras cosas inducir la proliferación de bacterias, evento que favorece la actividad antibiótica (Dore *et al.*, 2016).

En caso de que la terapia de primera línea no sea efectiva, se considerará el uso de terapias de segunda, tercera y cuarta línea detalladas en la ilustración 1.

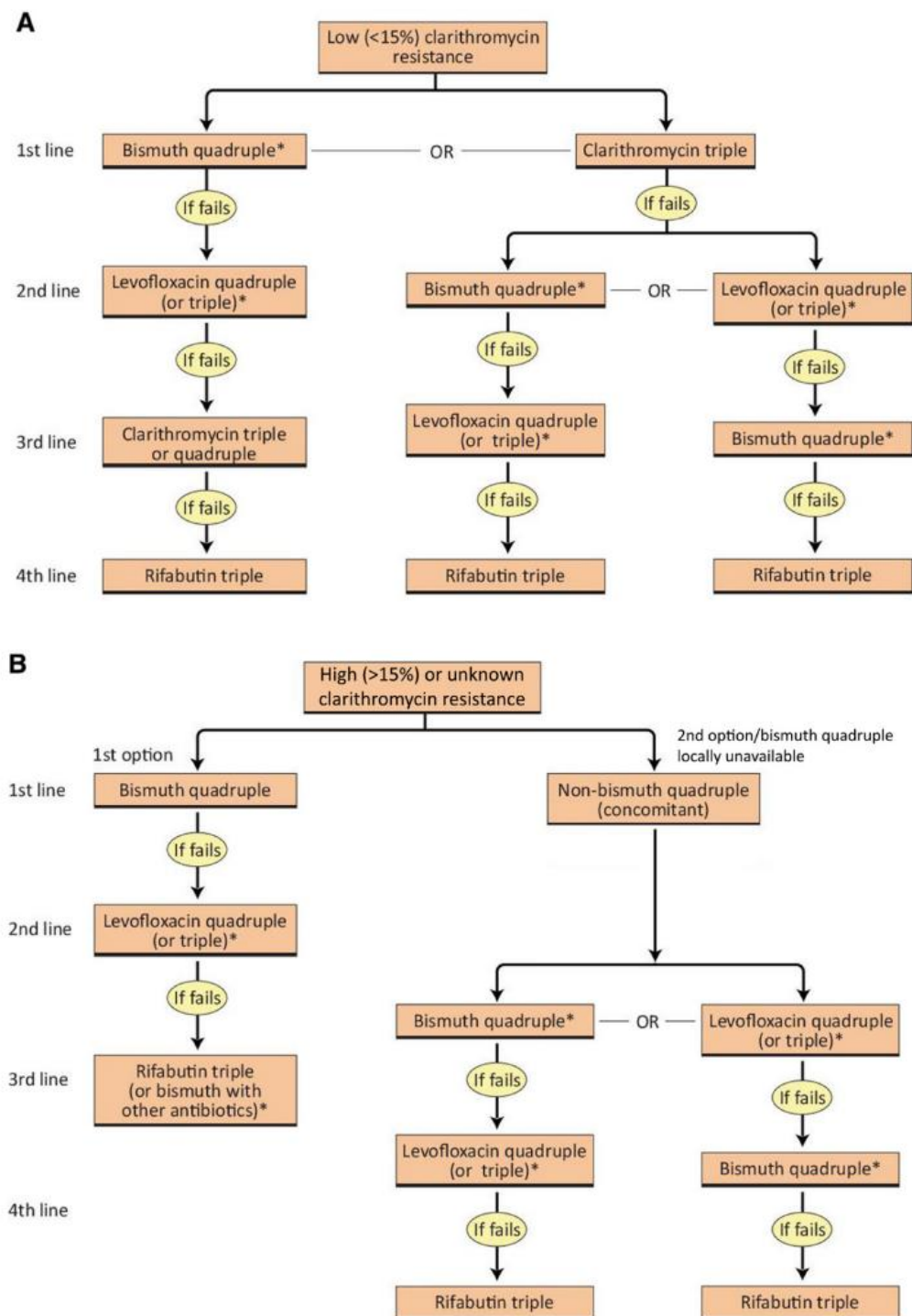


Ilustración 1: Algoritmos para el tratamiento de *H. pylori*

Algoritmos para el tratamiento de *H. pylori* según la resistencia local a

claritromicina. Fuente: Ilustración del último reporte del consenso de Maastricht VI/Florence (Malfertheiner *et al.*, 2022)

Considerando que el bajo porcentaje de erradicación contribuye a la prevalencia de la infección y por tanto a los altos índices de cáncer gástrico y otras enfermedades gastrointestinales en la población. En Chile, un país con alta prevalencia de estas enfermedades, existen limitados estudios que proporcionen información de este tipo (porcentajes de erradicación de los tratamientos); sin embargo, en otros estudios se ha encontrado un aumento en la prevalencia y tasas de resistencia a antibióticos. Datos de estudios de hace más de 10 años muestran tasas de erradicación que no superan el 90 % (Greenberg *et al.*, 2011; Riquelme *et al.*, 2007).

Los factores que afectan la efectividad del tratamiento son variados. Además de la adherencia del paciente al tratamiento, la efectividad de éste se puede ver afectada por polimorfismos genéticos (Sugimoto *et al.*, 2009; Yang & Lin, 2010), acidez gástrica (Yang *et al.*, 2011) y la propia resistencia a antibióticos (Fischbach & Evans, 2007). El factor que tiene mayor implicancia en la clínica es la resistencia antibiótica, y es este punto el que más se considera al momento de referir un tratamiento.

La resistencia antibiótica posee gran heterogeneidad geográfica y va variando con el tiempo. Se ha evidenciado un aumento considerado en la última década según múltiples estudios (Boyanova *et al.*, 2023; Sholeh *et al.*, 2023). De esta manera ha sido tal la urgencia sanitaria, que la Organización Mundial de Salud

ha reconocido a *H. pylori* como uno de los 12 patógenos prioritarios para los cuales se necesitan con urgencia nuevos antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2017).

La vigilancia epidemiológica también ha aumentado y el antibiótico más estudiado es CLA al ser el principal antibiótico internacionalmente utilizado para erradicar la infección; sin embargo, es a su vez uno de los antibióticos que mayor resistencia ha reportado en los estudios (Sholeh *et al.*, 2023), afectando las tasas de erradicación de la infección, así lo demuestra un meta análisis en donde se calculó que la resistencia a CLA provocó una reducción del 66% en la tasa de erradicación de la TTE (Fischbach & Evans, 2007).

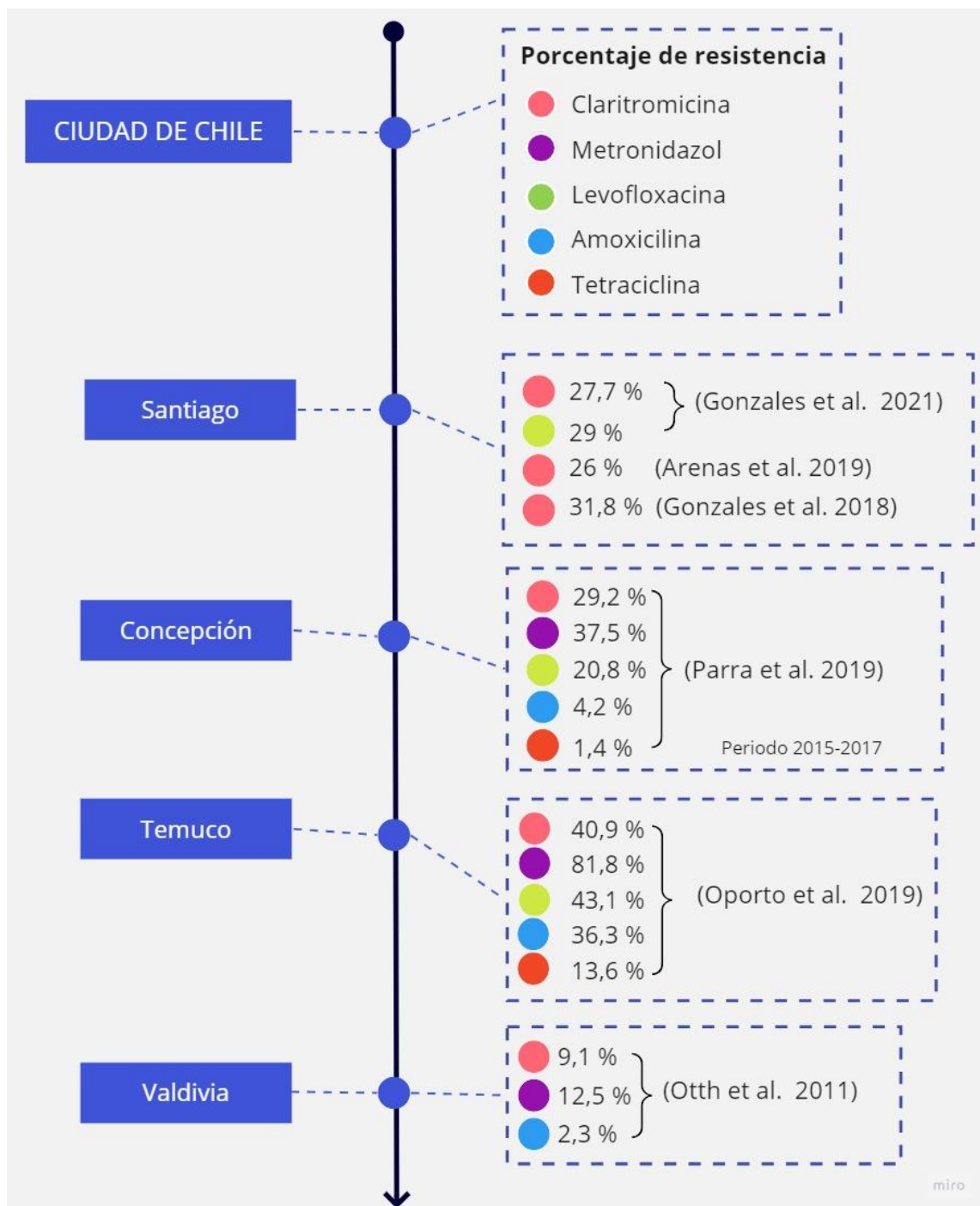


Ilustración 2: Esquema resumen con resistencia antibiótica en Chile.

Esquema resumen con porcentajes de resistencia que se registran en ciudades de Chile en estudios de los últimos 10 años. Claritromicina muestra un alto

porcentaje de resistencia en Santiago de Chile y en otras ciudades al sur del país, así como altos porcentajes para los antibióticos más usados como tratamiento. Fuente: Esquema de creación propia utilizando <http://www.miro.com/app/board> con información extraída de publicaciones citadas.

CLA no es el único antibiótico que presenta altas tasas de resistencia, en Chile destacan altas tasas de resistencia a otros antibióticos que son utilizados en regímenes de rescate lo que hace aún más difícil la erradicación de la infección. Para metronidazol (MTZ) las tasas de resistencia en América Latina en general son más altas que en países desarrollados debido a su amplio uso en el tratamiento controlado contra parásitos. Aunque la levofloxacina (LEV) aún tiene buenos resultados se debe evitar su uso debido a la rápida adquisición de resistencia a antibióticos quinolónicos (Davis & Bryson, 1994; Malfertheiner *et al.*, 2022).

En Chile la guía clínica del manejo de la infección sigue las recomendaciones universales. Sin embargo, en estas mismas pautas se destaca la importancia de no usar la TTE en regiones donde la resistencia antibiótica a CLA sea mayor a un 15%, y tal como se puede observar en la ilustración 2, este porcentaje ya ha sido sobrepasado según los reportes del último tiempo en las principales ciudades del país.

6.3 Autovacuna como estrategia de tratamiento

Debido a las problemáticas ya planteadas que socavan el éxito de las terapias de erradicación es que investigaciones se han enfocado en la búsqueda de

nuevas estrategias de tratamiento, como el uso de fitoquímicos con actividad antibacteriana (Ardalani *et al.*, 2020; Salehi *et al.*, 2018), probióticos (Shi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017) y la búsqueda de nuevas dianas moleculares (Roszczenko-Jasińska *et al.*, 2020). Esto con el fin de idear nuevas rutas de tratamiento de erradicación y mantener a raya el riesgo de cáncer que conlleva la infección por *H. pylori*.

Una de las alternativas que se plantean son las vacunas que por siglos han sido la manera más eficaz para el control de enfermedades infecciosas, siendo universalmente utilizadas como tratamiento profiláctico (Shukla & Shah, 2018); no obstante, no es inusual su uso como tratamiento de erradicación de una enfermedad. Para esto último, ha surgido el concepto de vacuna autógena o autovacuna como tratamiento de erradicación que consiste en la inoculación del individuo con el patógeno inactivado aislado de el mismo. Este procedimiento se ha visto particularmente mayor extendido en el campo de la veterinaria para enfermedades como la dermatitis, neumonías, metritis, osteomielitis, infecciones urinarias o diarreas, entre otras (Corsaut *et al.*, 2021; Kromann *et al.*, 2021; Nolte *et al.*, 2001). En humanos, los estudios son más limitados; sin embargo, se han encontrado efectos beneficiosos de las autovacunas en niños y ancianos con infecciones urinarias recurrentes, tratamiento contra asma por ácaros del polvo doméstico (Rose *et al.*, 2011) y contra patógenos del tracto respiratorio como *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos β -hemolítico (Zagólski *et al.*, 2015).

Aunque aún no existe una vacuna para *H. pylori*, las investigaciones en este campo son extensas (Ermak *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2015; Sutton & Boag, 2018; Yang *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015), se han probado distintos antígenos relacionados con *H. pylori* y aunque algunos de ellos han tenido efectos positivos aún no hay disponibilidad en el mercado mundial de una vacuna contra *H. pylori*. Las dificultades que han tenido que enfrentar los investigadores en torno a la vacuna se centran en los múltiples mecanismos que posee *H. pylori* para evadir el sistema inmunológico (Sutton & Chionh, 2013). Estos mecanismos incluyen diferentes capacidades para enfrentar el entorno e incluso permanecer en el mismo. En el caso de pacientes con cepas multi resistentes, en donde el uso de antibióticos ya no tiene la efectividad deseada, se considera una buena alternativa impulsar el sistema inmunológico del paciente de manera personalizada para la auto erradicación de la infección mediante el uso de una autovacuna.

6.4 Mecanismos adaptativos de *H. pylori*

Si bien el trabajo de estudio para una autovacuna ya está muy bien respaldado, se quiere hacer la distinción en que se usaría principalmente en pacientes cuyas cepas aisladas son multi resistentes, desde esta premisa resulta necesario tener una mayor comprensión del comportamiento de estas cepas y evaluar las diferencias que existan de ciertas características con cepas susceptibles a los antibióticos. Para efectos de esta tesis se han definido tres parámetros a evaluar y comparar, cuya relevancia se mencionarán a continuación.

6.4.1 Biopelícula

Una biopelícula se define como agregados de bacterias que se adhieren a una superficie biótica o abiótica, mediante la secreción de una matriz extracelular específica (Karygianni *et al.*, 2020). Se ha relacionado a la biopelícula con un mayor poder de supervivencia ambiental y en el caso de bacterias patógenas con una infección exitosa y más persistente (Awan *et al.*, 2019). Se cree que el vínculo entre bacterias asociadas a una biopelícula mejora la capacidad de adaptación de las bacterias mediante diferentes mecanismos (Krzyżek *et al.*, 2020).

A *H. pylori* se le ha atribuido la capacidad para generar biopelícula *in vitro* (Cole *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 1999) y también se le ha visualizado formando biopelícula en la mucosa gástrica de pacientes infectados (Carron *et al.*, 2006; Coticchia *et al.*, 2006). Esta característica ha cambiado el enfoque de estudio del problema de resistencia antibiótica, la persistencia de la infección, así como la recrudescencia en algunos pacientes. Esto debido a que las bacterias que están embebidas en una biopelícula (bacterias sésiles) presentan propiedades distintas a las de bacterias libres (planctónicas), hay diferencias en los patrones de expresión génica, morfología y se ha reportado una mayor resistencia a antimicrobianos en biopelícula (Mah & O'Toole, 2001; Prosser *et al.*, 1987) en comparación con cultivos planctónicos.

Respecto a la capacidad de formación de biopelícula por parte de *H. pylori*, sabemos que en general *H. pylori* es un buen formador de biopelícula, pero aún se desconocen todos los mecanismos específicos que estarían involucrados en

el proceso.

Wong y colaboradores encontraron distintas capacidades de formación de biopelícula en las cepas que estudiaron, revelando así múltiples genes asociados a la formación de biopelícula (Wong *et al.*, 2016).

Yonezawa y colaboradores evaluaron la capacidad de formación de biopelícula de diferentes aislados clínicos (Yonezawa *et al.*, 2015) y encontraron que una cepa en particular formaba una biopelícula particularmente fuerte. Al visualizar al microscopio electrónico de barrido y compararla con una cepa estándar visualizaron que la cepa TK1402, aislada de un paciente japonés con úlceras duodenales y gástricas, presentaba una morfología bacilar claramente delineada a diferencia de las formas amorfas que mostraban otras cepas. Respecto a la influencia de la biopelícula a la resistencia antibiótica Yonezawa y colaboradores. encontraron un aumento en los niveles de resistencia en biopelícula de 2 días de hasta 4 veces, y hasta 16 veces para biopelícula de 3 días (maduras).

Cole y colaboradores por otra parte, lograron evaluar que todas las cepas de los aislados clínicos que estudiaron lograban formar biopelícula en superficies de vidrio (Cole *et al.*, 2004). De la misma forma, Fauzia y colaboradores determinaron que el 93.1 % de sus cepas estudiadas eran formadoras de biopelícula y además compararon cepas resistentes y susceptibles a antibióticos; sin embargo, no encontraron diferencias significativas en la cantidad producida entre ambos grupos, pero si se correlacionó positivamente la formación de

biopelícula fuertes con la alta resistencia antibióticas de las cepas (Fauzia *et al.*, 2020). Además, encontraron que la MBEC (concentración mínima de erradicación de la biopelícula) era significativamente mayor a la MIC (concentración mínima inhibitoria, en bacterias libres). Este resultado sugiere que la formación de biopelícula aumenta la supervivencia bacteriana luego de la exposición a los antibióticos.

Yonesawa y colaboradores han resumido en tres los mecanismos por los cuales la biopelícula podría aumentar la resistencia a los antibióticos: 1) falla en la penetración a la biopelícula, 2) hay un crecimiento lento de las bacterias dentro de la biopelícula debido a una limitante en los nutrientes y 3) activación de una respuesta general al estrés (Yonezawa *et al.*, 2015). Además, dentro de la biopelícula hay condiciones estresantes que podrían aumentar la frecuencia de mutación y contribuir a la aparición de cepas mutantes resistentes a antibióticos (Bernier *et al.*, 2013; Hathroubi *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2011).

6.4.2 Cambio de morfología bacilar a cocoide

Se ha reportado una forma no cultivable de *H. pylori* (Cellini *et al.*, 1994) en donde algunos autores la han definido como la forma morfológica de muerte de la bacteria; sin embargo, hoy en día se sabe que puede corresponder a una forma latente que está potencialmente relacionada con las formas de transmisión de *H. pylori* (Santiago *et al.*, 2015) y con la recaída de una paciente post terapia antibiótica (Kusters *et al.*, 1997). Esta capacidad se ve relacionada a su vez con la formación de biopelícula en donde se ha visto un aumento de las formas

cocoides en cultivos prolongados de biopelícula, siendo consideradas células persistentes que contribuirían a la falla en el tratamiento por lo que son un aspecto importante a evaluar en conjunto (Krzyżek *et al.*, 2020). Esta morfología se caracteriza por tener una mayor tolerancia a factores estresantes externos contribuyendo así a la resistencia antibiótica. Los cambios fisiológicos que esto conlleva hacen que se pierda la propiedad de ser células nuevamente cultivables (Dong *et al.*, 2019); sin embargo, se cree que *H. pylori* tiene los mecanismos para revertirlo, así lo insinúan los estudios de Cellini y colaboradores (Cellini *et al.*, 1994). Además, esta morfología tiene una fuerte relevancia con la transmisión de la infección, resistencia antibiótica y podría estar firmemente relacionada con una recrudescencia de la infección, por lo que se prevé evaluar si existen diferencias entre bacterias susceptibles y resistentes y su capacidad para pasar a morfología cocoide mediante cultivos prolongados.

6.4.3 Ingreso a levaduras

Candida albicans (*C. albicans*) es un hongo dimórfico ampliamente distribuido en el cuerpo humano compartiendo nicho con *H. pylori*. Se ha visto que *C. albicans* puede favorecer la colonización de *H. pylori* y aumentar su patogenicidad, así como proteger la bacteria de factores externos estresantes (Xi and Zhou, 2021). Se ha correlacionado positivamente a *H. pylori* con *C. albicans* en enfermedades gástricas y lesiones ulcerativas (Karczewska *et al.*, 2009; Ramaswamy *et al.*, 2007).

Los mecanismos por los que podría ingresar *H. pylori* a las levaduras son en

general por factores estresantes del medio, como lo son el pH, antibióticos, deficiencia de nutrientes, temperatura y presión de oxígeno (Sánchez-Alonzo, Arellano-Arriagada *et al.*, 2021; Sánchez-Alonzo, Belmar *et al.*, 2021; Sánchez-Alonzo *et al.*, 2020; Sánchez-Alonzo, Silva-Mieres *et al.*, 2021; Sánchez-Alonzo *et al.*, 2022). Esta capacidad de ingreso permite a *H. pylori* sobrevivir bajo diversas condiciones, por lo que se propone estudiar si existen diferencias entre bacterias resistentes y susceptibles, esto nos permitirá tener una aproximación para en un futuro evaluar los mecanismos que usa *H. pylori* para evadir el tratamiento antibiótico.

Se propone entonces que no sólo los mecanismos clásicos descritos en la literatura (mutaciones que otorgan resistencia) serían responsables de conferir resistencia antibiótica. Sino que otros mecanismos de carácter adaptativos estarían participando en la adquisición de tolerancia y/o resistencia antibiótica y, por ende, serían responsables de un porcentaje del fracaso terapéutico.

VII PLANTEAMIENTO PROBLEMA

Para el estudio de nuevas estrategias de tratamiento cómo la autovacuna, hace falta tener mayor información del comportamiento de cepas multi resistentes y las diferencias que pueda haber con cepas susceptibles. Aunque se pueden encontrar trabajos que de manera independiente relacionan ciertos parámetros con la adquisición de resistencia, no hay alguno que resuma y compare cepas resistentes y susceptibles en los parámetros propuestos.

VIII HIPÓTESIS

Las cepas multi resistentes de *Helicobacter pylori* presentan mecanismos adaptativos más eficientes que cepas susceptibles.

IX OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar tres capacidades adaptativas entre cepas multi resistentes y susceptibles de *Helicobacter pylori*.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar la capacidad de formación de biopelículas de cepas con distinta susceptibilidad antibiótica.
- 2.- Determinar la capacidad de pasar de forma bacilar a cocoide de cepas con distinta susceptibilidad antibiótica.
- 3.- Determinar la capacidad de ingreso a levaduras de cepas con distinta susceptibilidad antibiótica.

X MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Se utilizaron cepas de *H. pylori* aisladas de la región del Biobío que son parte del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción. Las bacterias se cultivaron de manera rutinaria en agar sangre Columbia de OXOID (CM0331B) suplementado con sangre de equino al 5% o con suero fetal bovino según disponibilidad, además del suplemento selectivo Dent (Thermo Scientific, código de catálogo SR0147E) en condiciones microaeróbicas (85 % N₂, 10 % CO₂, 5 % O₂) a 37°C. Se seleccionaron al azar tres cepas con multi resistencia (resistencia a 3 o más antibióticos) de la región del Biobío, tres cepas resistentes para 1 o 2 antibióticos y tres cepas susceptibles a todos los antibióticos de uso común en Chile (claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina y levofloxacina). Además de utilizar las cepas referenciales (comerciales) J99 y ATCC 43504 (AmericanType Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.). Los cultivos bacterianos utilizados tenían entre 48h a 72h.

10.2 Cultivo de *Candida albicans*

Para el ensayo de ingreso a levaduras se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC 90028 que se encuentra dentro del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, esta cepa de referencia suele ser utilizada en investigaciones de

microbiología al ser capaz de colonizar a humanos, estar ampliamente caracterizada y su utilidad ante la comparación de resultados entre estudios. Se cultivó en condiciones de aerobiosis en medio agar glucosa 4 % según Sabouraud de Merck (105438) a 37 °C. Se utilizaron cultivos de 24 a 48 horas.

10.3 Ensayo de formación de biopelícula

Para la evaluación de la formación de biopelícula por parte de las cepas estudiadas, se utilizó el método del cristal violeta siguiendo el protocolo descrito por Lebeer y colaboradores (Lebeer *et al.*, 2007) modificando los medios de cultivos y algunos tiempos de incubación adecuados para *H. pylori*. Se utilizaron placas tipo Wells de 24 pocillos de fondo plano, cada pocillo contenía un cubre objeto de vidrio estéril para permitir la formación de biopelícula en interfaz líquido-sólido. Se depositaron 700 µL de suspensión bacteriana preparada previamente en caldo de Brucella (CAT 211088) a un Mcfarland 2 (6×10^8 UFC/ml) desde un cultivo puro de 48 h. Cada cepa se evaluó por triplicado para obtener un promedio de estas mediciones. Se incluyó un control negativo que consistía únicamente en caldo Brucella. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerobiosis. Posteriormente se evaluó la formación de biopelícula a las 12, 24 y 48 h. Para la medición se retiraron las células planctónicas mediante aspiración y se procedió a lavar el pocillo tres veces con tampón fosfato salino (PBS) de Sigma-Aldrich (P4417), dejando secar al aire durante 10 minutos. Las bacterias adheridas a la superficie de vidrio se tiñeron con 800 µL de Cristal

Violeta al 0,1% p/v por 20 min a temperatura ambiente, se descartó la solución no adherida y se dejó secar nuevamente 10 minutos, luego se procedió a realizar 4 lavados con PBS para retirar el exceso de cristal violeta no adherido. El colorante adherido se solubilizó en 800 µl de mezcla etanol acetona (80:20) y se leyó la densidad óptica (D.O.) a 590 nm.

Los resultados de las mediciones de cada cepa se expresaron como D.O. y se estableció una D.O. de corte de la siguiente manera:

$$D.O.c = \frac{\sum_1^n D.O. control negativo}{n} + 3 \times S.D. (D.O. control negativo)$$

S.D: desviación estandar

Se consideraron cómo formadoras de biopelícula siguiendo las recomendaciones de Stepanović y colaboradores (Stepanović *et al.*, 2007):

Tabla 1: Clasificación de las cepas según producción de biopelícula.

Rango de corte	Productor
D.O. ≤ D.O.c	No productor
D.O.c < D.O. ≤ 2×D.O.c	Débil
2×D.O.c < D.O. ≤ 4×D.O.c	Moderado
D.O. > 4×D.O.c	Fuerte

10.4 Ensayo de cambio a morfología cocoide

Para inducir el paso de morfología bacilar a cocoide en las cepas de *H. pylori* se realizaron cultivos prolongados en placas con agar Columbia suplementado con sangre de equino al 5% y suplemento Dent (Thermo Scientific, código de catálogo SR0147E). Se incubó a 37°C en condiciones de microaerobiosis y se contabilizó

cuando el cultivo tenía 24h, 48h, 72h, 96h y 120h. Para la contabilización de células cocoides se realizaron frotis en portaobjetos utilizando asas curvas para luego realizar una tinción de Gram. Se observó al microscopio óptico con aceite de inmersión utilizando el objetivo de aumento 100x. Se cuantificaron 100 células por preparación y se expresó el resultado como porcentaje (%) de células cocoides observadas.

10.5 Ensayo ingreso a levaduras

Para inducir el ingreso a levaduras se utilizó como factor de estrés la ´inanición´. Se realizaron co-cultivos de levaduras de *C. albicans* con las cepas de *H. pylori* en suero fisiológico, ambos preparados con inóculos llevados a una turbidez de 3 en escala Mcfarland a partir de cultivos puros de 48h. Se dispusieron 500 µl de cada suspensión en los pocillos de placas tipo Wells de 6 pocillos, cada uno con 4 ml de suero fisiológico alcanzando un volumen final de 5 ml. Se dejó incubar en condiciones de microaerobiosis y se tomaron puntos a los tiempos 0h, 6h, 12h, 24h y 48h. A continuación, se evaluó el porcentaje de levaduras que contienen cuerpos parecidos a bacterias (CPB) en función del tiempo de incubación. Para cada medición se contabilizó manualmente cubriendo una alícuota de 30 µL con un cubreobjeto sobre un portaobjeto para observación al fresco, bajo microscopio óptico. Se observó un total de 15 campos por cada punto y el resultado se informó mediante el porcentaje promedio de CPB dentro de las levaduras observadas.

Como control negativo se realizó un cultivo de sólo levaduras y se observó al

microscopio en fresco en cada punto tomado para descartar contaminaciones.

10.6 Análisis de resultados

Los resultados fueron recopilados en Excel y dispuestos en tablas para realizar gráficos utilizando el programa Prism 8. El análisis estadístico realizado para procesar los datos de formación de biopelícula entre grupos de distinta susceptibilidad fue utilizando la "Prueba t para dos muestras con varianzas diferentes", este análisis permitió evaluar si hay diferencias significativas entre las medias de los dos grupos en una variable de interés.

XI RESULTADOS

11.1 Cultivo de bacterias y levaduras:

Se cultivaron cepas de *H. pylori* de muestras clínicas y comerciales las cuales formaron colonias pequeñas incoloras y traslucidas en agar Columbia en condiciones de microaerobiosis. Los cultivos de *C. albicans* en agar Sabouraud de la cepa ATCC90028 mostraron colonias de tamaño superior al de las colonias de *H. pylori* con un color entre blanquecino a amarillento y de aspecto cremoso y que en agar Cromogénico se observan con una típica coloración azul que permite la identificación y aislamiento selectivo de la especie *C. albicans*.

A partir del repertorio de cepas de *H. pylori* que posee el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción se seleccionaron aleatoriamente un total de 9 cepas. Unas 3 cepas con susceptibilidad antibiótica a los antibióticos de uso común en Chile para tratamiento de esta infección (claritromicina, levofloxacin, metronidazol, amoxicilina y tetraciclina), 3 cepas con resistencia a uno o dos antibióticos y 3 cepas con multiresistencia (resistencia a 3 o más antibióticos). Todas las cepas corresponden a ejemplares aislados del antro de estómago de pacientes sintomáticos del sur de Chile y se detalla su susceptibilidad determinada por el método Gold estándar de dilución en agar realizada por el mismo laboratorio en la tabla 2.

Tabla 2: CMI de las cepas del estudio por el método de dilución en agar.

Antibiótico	Concentración mínima inhibitoria (ug/ml)									
	Cepa	64A	32 A	84A	129A	240A	83A	219A	239A	780 A
Claritromicina		0,03	0,12	0,125	2	8	2	8	4	> 4
Metronidazol		8	<1	<1	2	2	32	64	32	64
Levofloxacin		0,0625	0,25	0,5	0,0625	0,5	1	8	> 4	> 4
Amoxicilina		<0,0625	0,03	0,5	0,0625	0,0625	<0,0625	0,0625	0,03	0,5
Tetraciclina		<0,0626	<0,0626	<1	0,0625	<0,0626	<0,0626	0,25	<0,0625	0,25

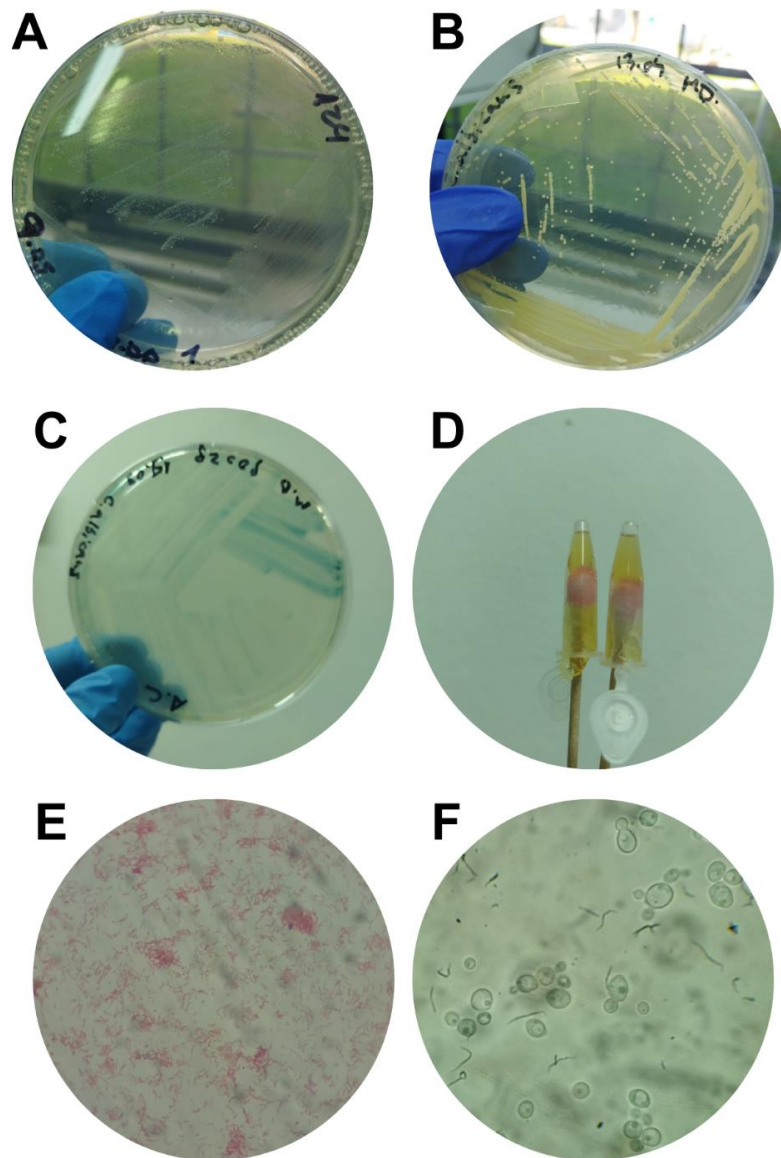


Ilustración 3: Recopilación imágenes de cultivo.

En A se observa placa de agar Columbia con colonias distintivas de *H. pylori* de color transparente. En B se observa placa agar Sabouraud con colonias de *C. albicans* 90028 de color blanco y aspecto cremoso. En C se observa placa agar Cromogénico con cultivo de *C. albicans* 90028 el color azul de las colonias permite reconocer la especie *albicans*. El color rosado en el agar urea (en D) da cuenta de una prueba positiva para el reconocimiento de ureasa en la muestra

de colonias de *H. pylori*. En E se observan bacilos Gram negativos (color rosado) con una forma helicoidal predominante distintiva de una muestra de *H. pylori*. En F se muestra una observación al fresco de cepas de *C.albicans* 90028, se pueden identificar sus vacuolas con ausencia de CPB.

11.2 Producción de biopelícula:

Se cuantificó mediante el método de cristal violeta la capacidad de formación de biopelícula de un total de 9 cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes del sur de Chile, con distintos perfiles de susceptibilidad antibiótica, además de dos cepas comerciales: J99 y ATCC 43504.

La D.O. de corte para la clasificación del tipo de productor de biopelícula fue calculado a partir de una media de las mediciones de D.O. del control negativo (sólo caldo Brucella) y su desviación estándar.

$$\begin{aligned} \text{Promedio D.O. control negativo} &= 0,14 \\ \text{Desviación estandar} = S.D. &= 0,03 \\ D.O.c &= 0,23 \end{aligned}$$

Los resultados de la producción de biopelícula se muestran en los gráficos 1, 2 y 3. En el gráfico 1 se observa la evolución en el tiempo de la producción de biopelícula de todas las cepas estudiadas expresadas como D.O. a 590 nm. Al comparar la velocidad de producción de biopelícula entre las cepas se observa un comportamiento similar en todas ellas, salvo la cepa 84A que fue la cepa con mayor producción de biopelícula y con mayor pendiente implicando una alta velocidad de formación.

Producción de biopelícula

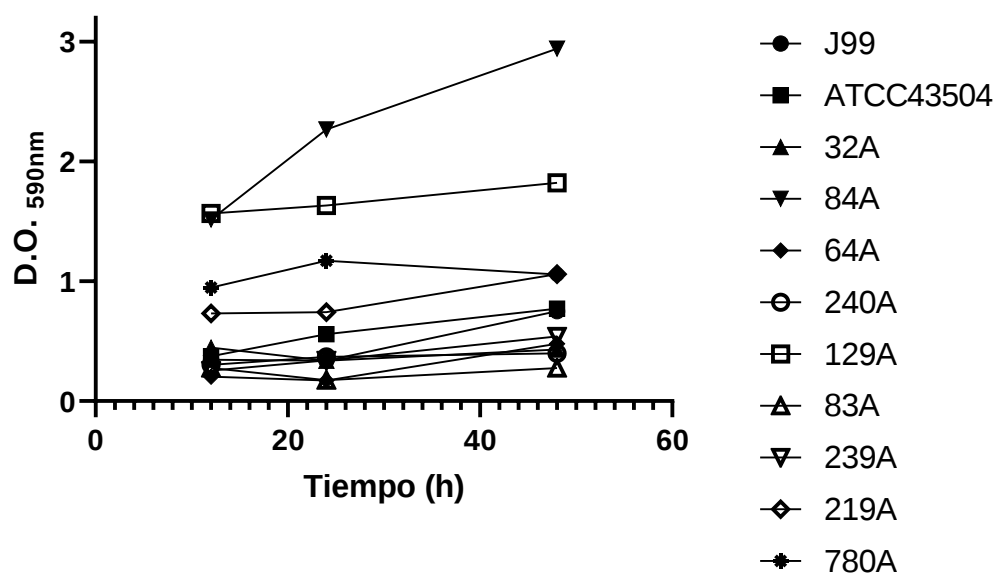


Ilustración 4: Progreso de producción de biopelícula.

Gráfico de progreso de producción de biopelícula expresado como D.O a 590 nm en función del tiempo. Lectura a las 12h, 24h y 48h.

En los gráficos de la ilustración 4 y 5 se observa de manera individualizada la producción de biopelícula a las 24 y 48 h respectivamente de todas las cepas. Se definió un D.O. de corte mediante el promedio de mediciones de los controles. De esta manera se consideró una D.O.c de 0,17, los corte para considerar a una cepa como productora débil, moderada o fuerte de resumen en la tabla 2.

Tabla 3: D.O.c calculados

Cortes definidos	Dato calculado
D.O. c	0,23
2 x D.O.c	0,46
4 x D.O.c	0,92

Tabla 4: Rangos de corte definidos para la clasificación tipo de productor de biopelícula.

Rango de corte	Corte definido	Productor
$D.O. \leq D.O.c$	$D.O. < 0,23$	No productor
$D.O.c < D.O. \leq 2 \times D.O.c$	$D.O. \geq 0,23$	Productor débil
$2 \times D.O.c < D.O. \leq 4 \times D.O.c$	$D.O. \geq 0,46$	Productor moderado
$D.O. > 4 \times D.O.c$	$D.O. \geq 0,92$	Productor fuerte

De acuerdo a la D.O.c definida anteriormente, son consideradas como productoras de biopelícula a las 24h y 48h el 82% y 100% respectivamente. Un 36% (4) de las cepas son formadoras fuertes de biopelícula a las 24h y un 55% (6) lo son a las 48h. Un 45% de las cepas son productoras moderadas a las 24h y un 34% (4) a las 48h. Sólo un 18 % (2) de las cepas son productoras débiles de biopelícula a las 24h, porcentaje que cambia a las 48h ya que una de ellas (cepa 64A) logra generar mayor cantidad a las 48h clasificándose como productora moderada.

La cepa que logra una mayor formación de biopelícula corresponde a la cepa 84A, una cepa de susceptible a todos los antibióticos y que tanto a las 24h como 48h se comporta como productora fuerte de biopelícula.

En el gráfico de la ilustración 6 se puede observar los resultados por grupo (susceptibles y resistentes) de la producción de biopelícula. El análisis estadístico utilizando la Prueba t para dos muestras con varianzas diferentes indica que no hay una diferencia significativa entre ambos grupos.

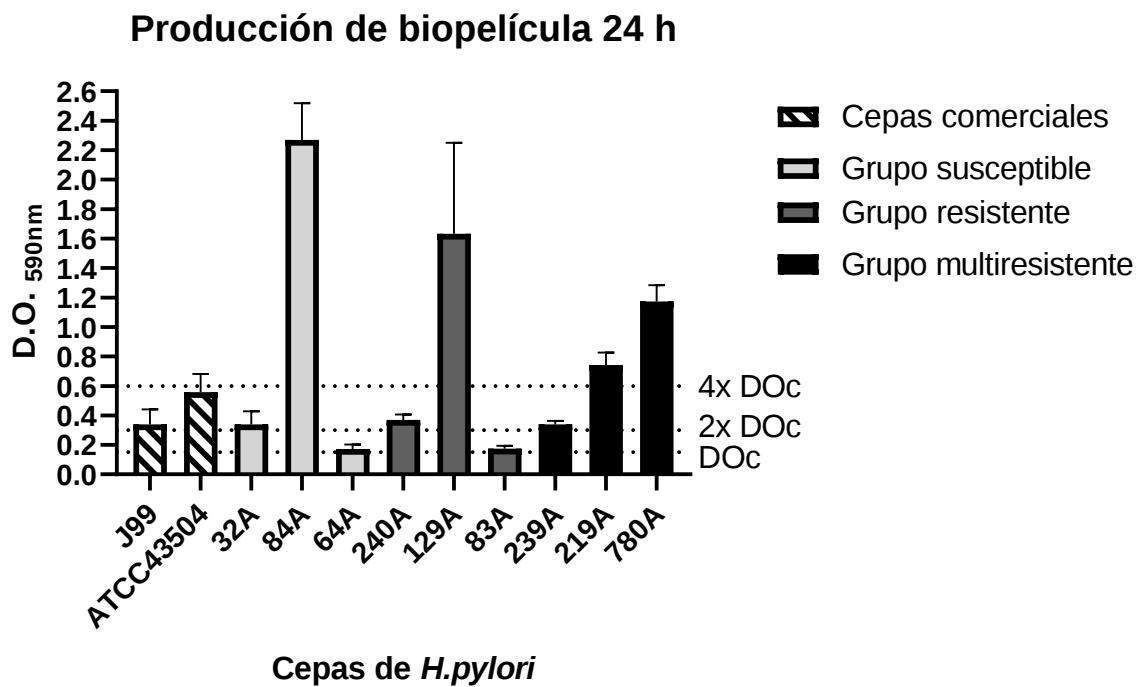


Ilustración 5: Producción de biopelícula a las 24h.

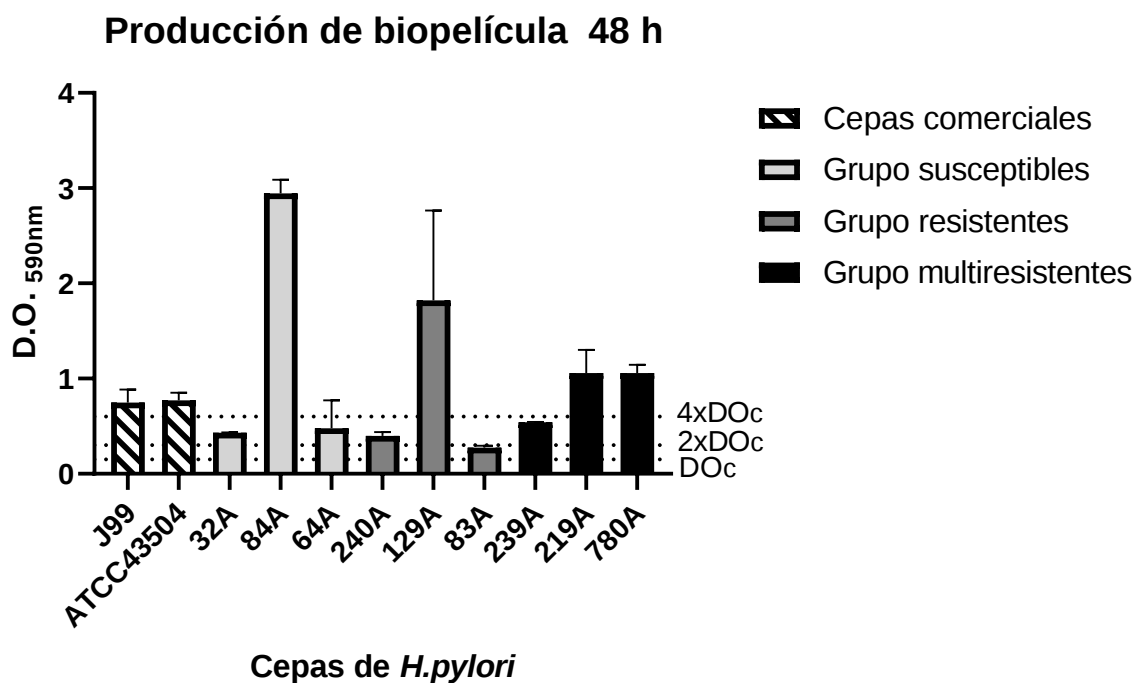


Ilustración 6: Producción de biopelícula a las 48h.

Se agruparon los datos de D.O._{590 nm} de cepas del grupo susceptible y resistente (véase Ilustración 7) de tal manera de comparar ambos grupos. Tras el análisis estadístico entre ambos grupos con la prueba t para dos muestras con varianzas diferentes, esta prueba concluyó que no hay una diferencia significativa entre

ambos grupos.

Producción de biopelícula y resistencia

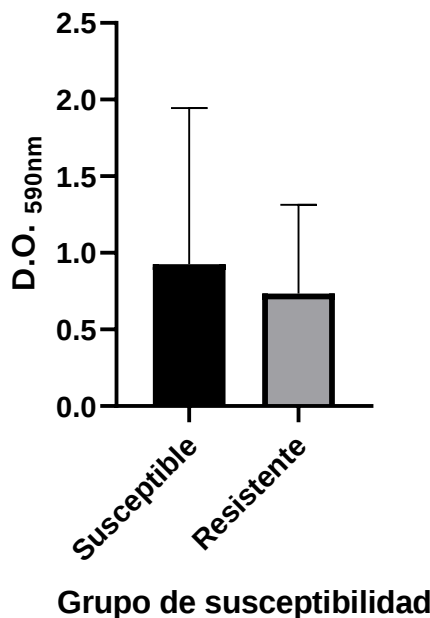


Ilustración 7: Comparación de producción de biopelícula

11.3 Ingreso a levaduras

Se realizaron observaciones en fresco de los co-cultivos de *C. albicans* con las cepas clínicas y comerciales de *H. pylori* a los tiempos 0h, 3h, 6h, 12h, 24h y 48 h. Se observó la presencia evidente de CPB en el co-cultivo de la mayoría (91%) de las cepas de *H. pylori* con el objetivo 100X de un microscopio óptico.

En la Ilustración 8, en A se observa un control negativo, vale decir levaduras sin CPB y en B se observa un campo de observación con una levadura con CPB. Se consideraban CPB cuando se observaba movimiento errático dentro de las vacuolas de levaduras. Para el tiempo 12h, se observa el mayor porcentaje de

CPB en el experimento para un gran número de cepas.

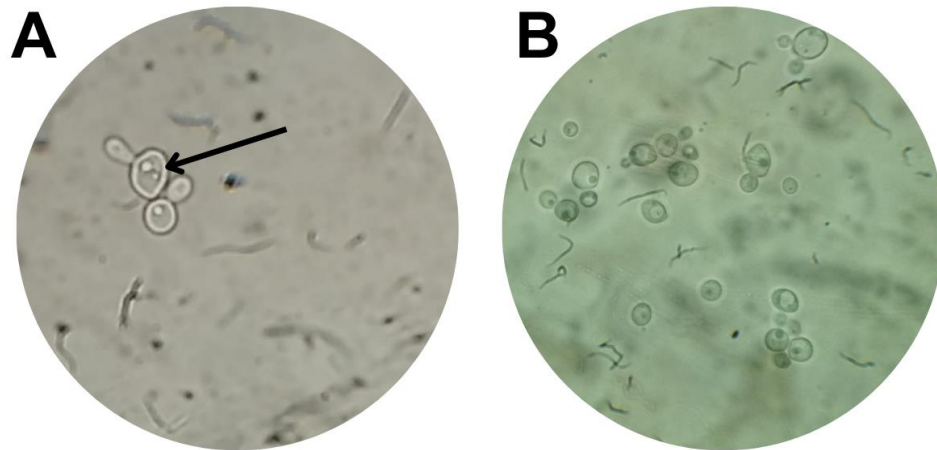


Ilustración 8: *Muestra con levaduras con CPB y control negativo.*

En A se pueden observar tres levaduras, una de ellas indicada por la flecha negra contiene en su vesícula un CPB. En B se observa un control negativo sin CPB.

Se observó que el 100% de las cepas estudiadas mostraron capacidad de ingreso a levaduras en condiciones de inanición. Esta capacidad de ingreso mostró un porcentaje de ingreso entre el 10-20% de levaduras con CPB. Se pudo observar CPB desde las 3h, porcentaje que aumentaba y se hacía evidente a las 24h y 48h. La cepa que mostró una mayor capacidad de ingreso corresponde a la cepa 240A, esta cepa corresponde al grupo de cepas resistentes. La cepa con menos capacidad para hacer ingreso a levaduras es la cepa 780A del grupo resistente.

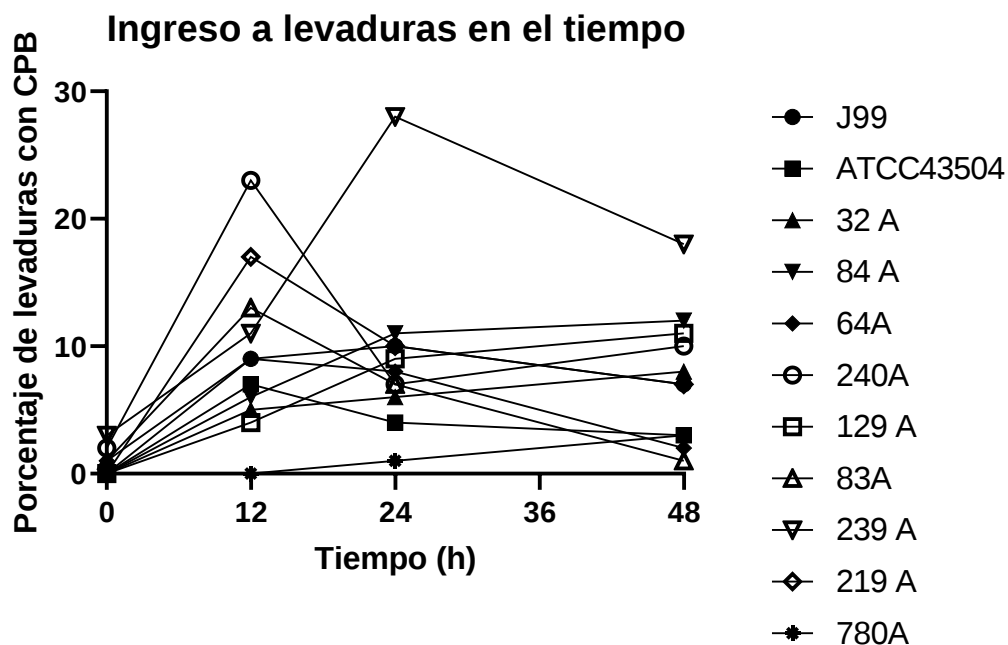


Ilustración 9: *Ingreso a levaduras en el tiempo.*

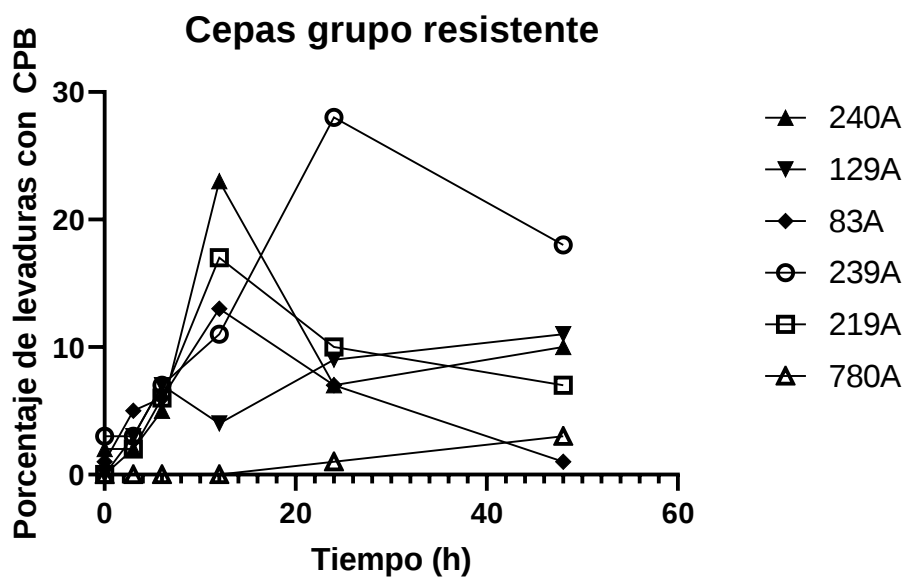


Ilustración 10: *Ingreso a levaduras en el tiempo del grupo resistente.*

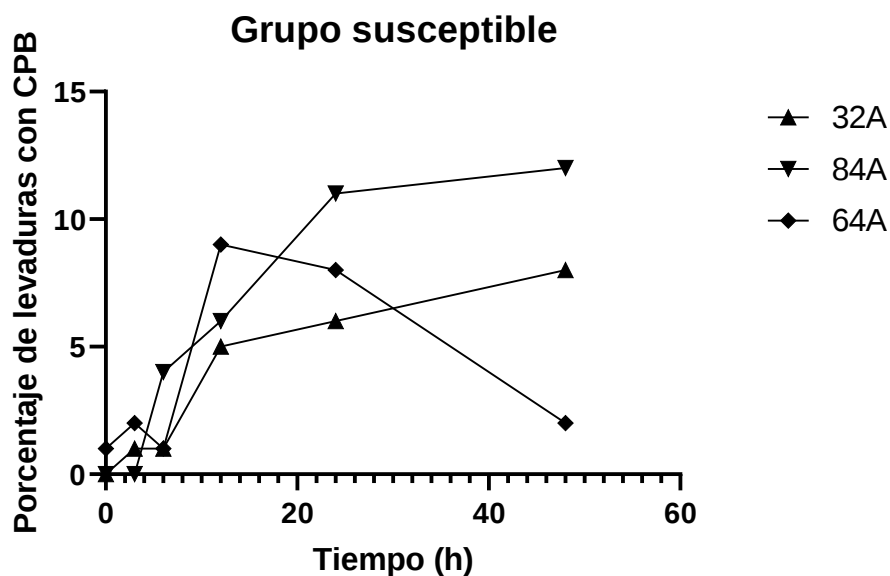


Ilustración 11: *Ingreso a levaduras en el tiempo del grupo susceptible.*

11.4 Morfología cocoide

Se realizó una tinción de Gram por un tiempo indefinido hasta que el 100% de las bacterias observadas en el campo mostraran una morfología cocoide, de esta manera el tiempo máximo de medición fue variable. Se realizó esta observación cada 24h a un total de 11 cepas, de las cuales el 100 % mostró un cambio a la morfología cocoide lo cual se pudo observar desde las 48 h.

Cambio en el tiempo a morfología cocoide

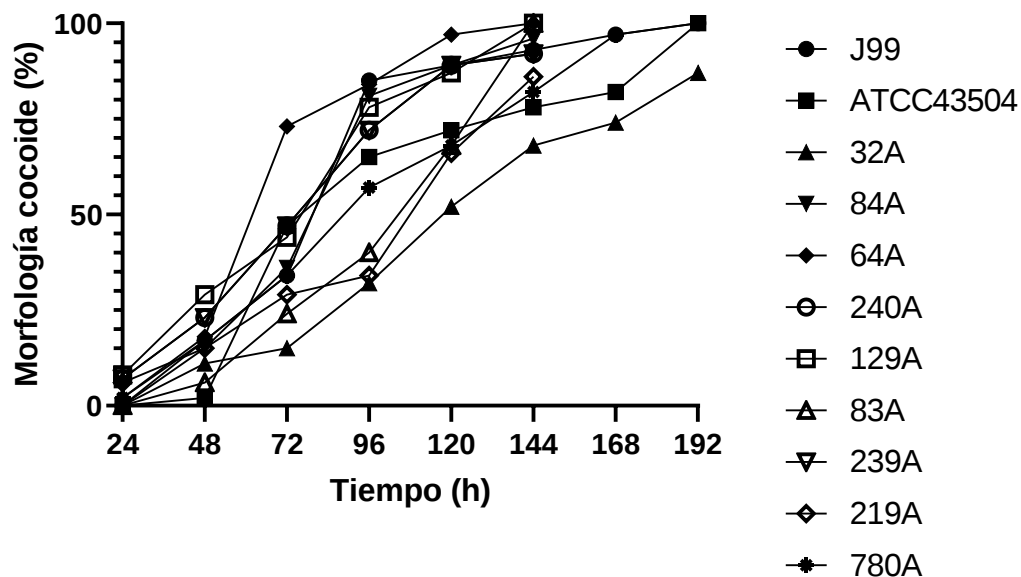


Ilustración 12: Cambio a morfología cocoide en el tiempo.

Cocoide Susceptibles

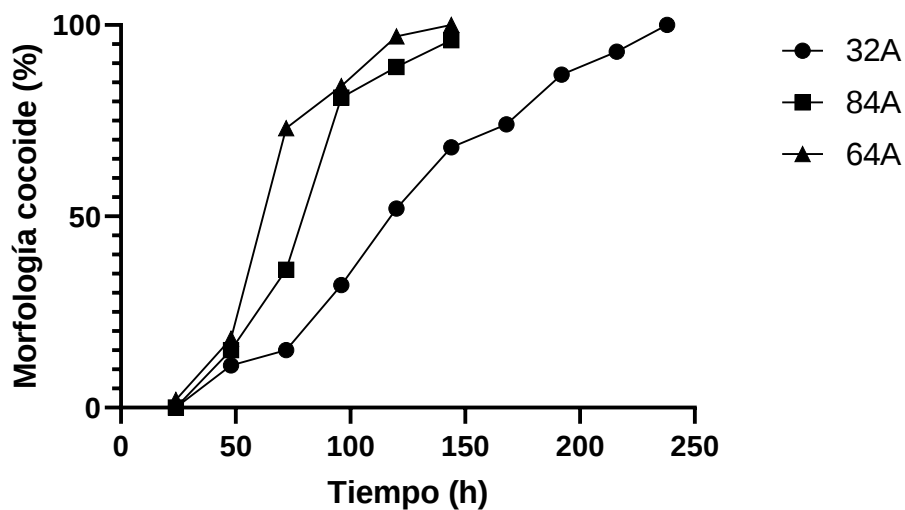


Ilustración 13: Cambio a morfología cocoide grupo susceptible.

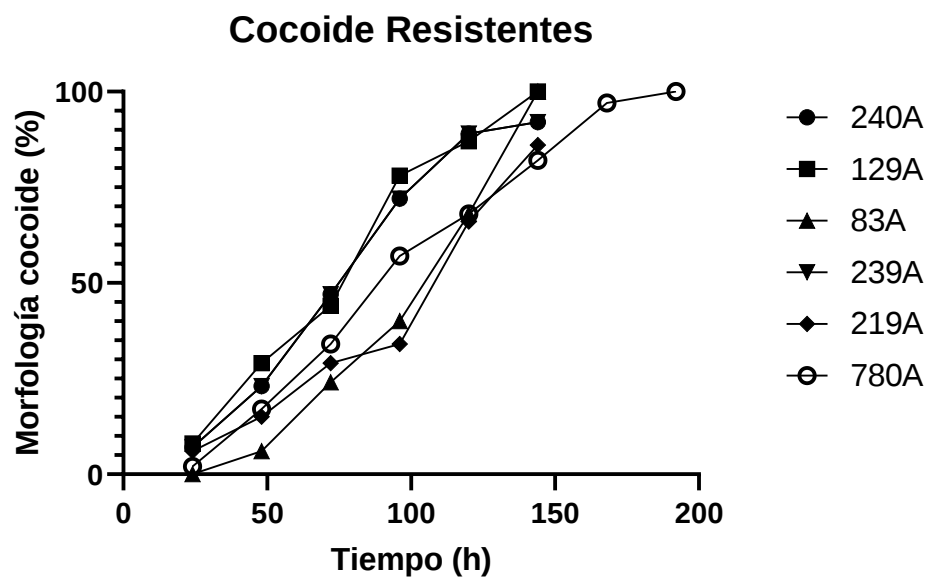


Ilustración 14: *Cambio a morfología cocoide grupo resistente.*

XII DISCUSIÓN

Ante la premisa de que pacientes que requieran el uso de una autovacuna para apoyar las terapias de erradicación impulsando su sistema inmunológico y estos posean cepas que son particularmente resistentes a los antibióticos, surge la necesidad de evaluar si hay diferencias entre grupos de cepas resistentes y susceptibles de *H. pylori* en materia de mecanismos que contribuyan a este fracaso terapéutico. De esta manera fue y es relevante comparar distintas capacidades de la bacteria que le permiten sobrevivir a condiciones estresantes, esto proporcionará una comprensión más completa del problema de resistencia, falla terapéutica y proveerá de información relevante para la toma de decisiones con respecto a las estrategias de tratamiento.

Se analizaron un total de tres capacidades adaptativas de *H. pylori*, estos mecanismos en teoría son empleados por la bacteria en momentos específicos, bajo el mando de ciertas señales del entorno. Si bien analizamos tres de estos mecanismos, es importante destacar que *H. pylori* posee otros mecanismos y herramientas descritos que tienen el potencial de contribuir a persistencia de la infección, como lo es la variación antigénica, la adhesión a la mucosa gástrica, el quorum sensing, entre otros (Anderson *et al.*, 2015; Mahdavi *et al.*, 2002; Yamaoka, 2010). Si comenzamos analizando los resultados de la formación de biopelícula, observaremos que todas las cepas de *H. pylori* estudiadas en este

trabajo mostraron diferentes magnitudes de producción de biopelícula (productor fuerte, moderado o débil). Resultados similares a los encontrados en bibliografía para cepas clínicas de otras localidades como Indonesia y Polonia (Fauzia *et al.*, 2020; Krzyżek *et al.*, 2022).

Surgen ciertas observaciones respecto al criterio utilizado para esta clasificación que son dados por la D.O. de corte calculada en base a los datos medidos con el control negativo. En este estudio la D.O. de corte fueron levemente superiores a los calculados y utilizados por Fauzia y colaboradores. Además, se ha clasificado a las cepas utilizando la categorización de productores fuertes, moderados, débiles y no productores, tal como se ha observado en trabajos que preceden a éste (Cole *et al.*, 2004; Fauzia *et al.*, 2020; Stepanović *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2016b). Sin embargo, es importante mencionar que se ha hecho la observación que otros autores (Hrvat *et al.*, 2021) emplean un término distinto para esta misma clasificación. Utilizando los términos de biopelícula altamente adherente, moderada, débilmente adherente y no adherente, basándose en la adhesión de las células bacterianas y la formación de biopelícula.

Estas variaciones en la terminología podrían reflejar diferentes perspectivas teóricas, enfoques experimentales o incluso diferencias en la interpretación de los resultados. Esta distinción puede ofrecer una interpretación más precisa de los resultados, al considerar no sólo la capacidad de formar biopelícula, sino también la capacidad de adhesión de la biopelícula a la superficie utilizada y la

adhesión entre las propias bacterias. Esto puede influir en el análisis de los resultados obtenidos, considerando que en el proceso de contabilización de la biomasa utilizando el método de cristal violeta se puede desprender una parte de ésta en los lavados, lo que resalta la importancia de considerar tanto la capacidad de formación de biopelícula como la adhesión en los estudios de biopelículas bacterianas.

Siguiendo la comparación de los resultados con la literatura, en el estudio de Fauzia y colaboradores, éstos no encontraron relación al analizar la susceptibilidad fenotípica dada por la CMI con la producción de biopelícula; sin embargo, sí logró establecer una relación entre la cantidad de biopelícula con la resistencia relacionada a la biopelícula y no a las susceptibilidades evaluadas desde células planctónicas. Además, encontraron que la concentración mínima de inhibición de la biopelícula (CMEB por sus siglas en inglés) era muy superior a la CMI reportada para cada cepa en la mayoría de los antibióticos estudiados. De esta manera resulta pertinente determinar la CMEB de las cepas de este estudio, considerando que actualmente se está discutiendo ampliamente la utilidad clínica de los datos obtenidos por la CMI, considerando la actual y creciente evidencia respecto a la CMEB. La información obtenida de la CMI de una cepa, no necesariamente se condicen con el comportamiento que esta tenga *in vivo*. Muchas cepas que mostraron susceptibilidad en su forma planctónica, mostraron resistencia al evaluar la CMEB. De esta manera, algunas cepas catalogadas fenotípicamente como susceptibles podrían llegar a presentar

resistencia antibiótica *in vivo* debido a sus propiedades de formación de biopelícula. Bien podría ser el caso de la cepa 84A que, aun tratándose de una cepa susceptible a todos los antibióticos, al mostrarse como una productora fuerte de biopelícula, podría otorgar resistencia al tratamiento gracias a estas propiedades.

Por otro lado, independiente del criterio de corte definido, y tal como se mencionaba anteriormente, los resultados son similares a los reportados por Fauzia y colaboradores en su estudio de cepas clínicas en el cual tampoco se encontró una correlación entre la susceptibilidad antibiótica dada por la CMI y la formación de biopelícula. Si bien se contaba con este antecedente en donde se consideró un número mucho mayor de muestras (101), en donde no encontraron correlación entre susceptibilidad y biopelícula, no podemos asumir que cepas clínicas de una región diferente a las de aquel estudio se comportarían de manera similar. De hecho, en el estudio realizado el año 2022, Krzyżek y colaboradores encontraron en cepas clínicas procedentes de Polonia que, si hay una relación entre la capacidad de formación de biopelícula y la resistencia a CLA, en donde concluyeron que la resistencia a CLA se asoció con una amplia gama de características fenotípicas que se traducen en la capacidad de formación de biopelícula (Krzyżek *et al.*, 2022).

Las formas en que las biopelículas pueden aumentar la resistencia o tolerancia a los antibióticos son variadas y cada mecanismo afecta en distinto grado a cada

antibiótico según su mecanismo de acción. Se ha reportado por ejemplo que las bombas de eflujo aumentan considerablemente su expresión en biopelícula (Attaran *et al.*, 2017), y se ha relacionado y descrito este mecanismo para la resistencia a CLA y TET (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021). También se ha descrito que en biopelículas aumentan las tasas de mutaciones al exponerse a CLA, este mecanismo se ha descrito para CLA por Fauzia y colaboradores.

En este estudio se observó que todas las cepas analizadas van cambiando su morfología a formas cocoides conforme evoluciona el cultivo prolongado, que implicaría una deficiencia de nutrientes y la acumulación de desechos en el medio. Si bien el hecho de que todas las cepas estudiadas hayan mostrado formas cocoides no sorprende, ya que las formas cocoides se relacionan con un estadio de muerte de la bacteria, evento que sucedería eventualmente considerando un cultivo prolongado. No obstante, se decidió evaluar la velocidad con la que se producían dichos cambios morfológicos, revelando una clara inclinación del grupo susceptible a adoptar formas cocoides de manera más acelerada en comparación con el grupo resistente, lo que podría implicar una mayor sensibilidad al estrés del grupo de cepas susceptibles a antibióticos en comparación a las cepas resistentes.

Por otro lado, es importante destacar que, debido a las metodologías empleadas en este estudio, no podemos determinar con certeza si estas formas cocoides corresponden a estados de muerte bacteriana o si representan un estado de

latencia. El estudio de las formas cocoides en *H. pylori* ha sido objeto de amplias discusiones en la investigación de esta bacteria. Las formas viables, pero no cultivables (VBNC) de *H. pylori* se caracterizan por una estrecha asociación con el estado de muerte de la bacteria. En este sentido, la distinción precisa entre ambos estados se vuelve un desafío a la hora de seleccionar la metodología más adecuada para su identificación y estudio. Lerardi y colaboradores discuten las limitaciones de distintas metodologías para el estudio en particular de formas cocoides (Lerardi *et al.*, 2020), destacando el uso de la citometría de flujo por su capacidad de distinguir correctamente entre morfologías y el estado de viabilidad de la bacteria pudiendo establecer muy bien la proporción de bacterias cocoides dentro de una carga de muestra (Khan *et al.*, 2010; Poursina *et al.*, 2012). Los métodos moleculares como el PCR y qPCR se consideran hoy en día el patrón oro por su viabilidad y fiabilidad, pudiendo ser utilizados como método diagnóstico capaces de detectar bacterias en estado cocoide en cantidades bajas; sin embargo, no podrían distinguir el estado morfológico de la bacteria (Sen *et al.*, 2007).

En cuanto al ingreso de *H. pylori* en levaduras, es relevante destacar el trabajo realizado por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, el cual examinó distintos factores que pueden influir en este proceso. En el presente estudio, se recopilaron datos que permitieron identificar grupos susceptibles y resistentes, revelando una tendencia en el grupo de cepas resistentes a mostrar un mayor

porcentaje de CPB en comparación con el grupo susceptible, en el cual el ingreso no superó el 12%.

Finalmente, se considera relevante mencionar las principales limitaciones del estudio y evaluar los factores que pudieron generar un sesgo para las distintas mediciones. En el caso de la formación de biopelícula, el método del cristal violeta es ampliamente utilizado para contabilización de la biomasa; sin embargo, es dependiente del operador al variar la delicadeza del goteo de PBS al realizar los múltiples lavados. Una manera de disminuir este sesgo sería incluir a más de un operador en experimentos independientes entre sí, y utilizar el término de biopelícula adherente como se mencionaba anteriormente. Para el caso de evaluar el cambio a morfología cocoide, el recuento en el microscopio también es un proceso que depende del operador, de esta manera para reducir el sesgo que aquí se pudo generar, se realizaron más de un conteo por campo y se consideraron 6 campos por muestra, obteniendo un promedio de cada medición, de igual manera se podría incluir a más de un operador para estudios posteriores. Del mismo modo fueron contabilizados los CPB en levaduras para que de esta manera sea estadísticamente relevante. Sin embargo, también es recomendable que varias personas realicen el conteo de manera independiente y luego se promedie para obtener un resultado más preciso. La observación en fresco del ingreso de *H. pylori* a levaduras es una buena aproximación inicial; sin embargo, se puede mejorar la metodología incorporando sondas dirigidas exclusivamente

a *H. pylori* para que con métodos de fluorescencia se pueda contabilizar con mayor certeza al momento de comparar estas capacidades entre cepas.

XIII CONCLUSIONES

Si bien los resultados se limitan a un universo muestral pequeño de 9 cepas clínicas y en vista de que no se encuentran diferencias significativas entre los grupos de estudio en las pruebas estadísticas, se considera este estudio como un estudio piloto. Aun así, es posible concluir que se rechaza la hipótesis que establecía que cepas con distinta susceptibilidad antibiótica presentan distintas capacidades adaptativas. Sin embargo, se observaron tendencias que justificarían el aumento del universo muestral para estudios posteriores.

Se concluye que todas las cepas clínicas de este estudio tienen la capacidad para generar biopelícula, cambiar a morfología cocoide y hacer ingreso a levaduras siendo estos mecanismos transversales que pueden contribuir por si solos y en conjunto a la persistencia de la enfermedad, contribuir a los casos de recrudescencia y aumentar los casos de resistencia a los tratamientos.

XIV BIBLIOGRAFÍA

Anderson, J. K., Huang, J. Y., Wreden, C., Sweeney, E. G., Goers, J., Remington, S. J., & Guillemin, K. (2015). Chemorepulsion from the Quorum Signal Autoinducer-2 Promotes *Helicobacter pylori* Biofilm Dispersal. MBio, 6(4), e00379.

Ardalani, H., Hadipanah, A., & Sahebkar, A. (2020). Medicinal Plants in the Treatment of Peptic Ulcer Disease: A Review. Mini Rev Med Chem, 20(8), 662–702.

Attaran, B., Falsafi, T., & Ghorbanmehr, N. (2017). Effect of biofilm formation by clinical isolates of *Helicobacter pylori* on the efflux-mediated resistance to commonly used antibiotics. World J Gastroenterol, 23(7), 1163–1170.

Awan, A. B., Schiebel, J., Böhm Alexander and Nitschke, J., Sarwar, Y., Schierack, P., & Ali, A. (2019). Association of biofilm formation and cytotoxic potential with multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. EXCLI J, 18, 79–90.

Bernier, S. P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A. S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2013). Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. PLoS Genet, 9(1), e1003144.

Boyanova, L., Hadzhiyski, P., Gergova, R., & Markovska, R. (2023). Evolution of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Topic of Increasing Concern. Antibiotics, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020332>

Bravo, D., Hoare, A., Soto, C., Valenzuela, M. A., & Quest, A. F. (2018). *Helicobacter pylori* in human health and disease: Mechanisms for local gastric and systemic effects. World J Gastroenterol, 24(28), 3071–3089.

Carron, M. A., Tran, V. R., Sugawa, C., & Coticchia, J. M. (2006). Identification of *Helicobacter pylori* Biofilms in Human Gastric Mucosa. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 10(5), 712–717.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.10.019>

Cellini, L., Allocati, N., Angelucci, D., Iezzi, T., Campi, E. Di, Marzio, L., & Dainelli, B. (1994). Coccoid *Helicobacter pylori* Not Culturable In Vitro Reverts in Mice. *Microbiology and Immunology*, 38(11), 843–850.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1994.tb02136.x>

Chen Xi AND Zhou, X. A. N. D. L. B. A. N. D. Z. Y. A. N. D. C. L. A. N. D. R. B. (2021). The cross-kingdom interaction between *Helicobacter pylori* and *Candida albicans*. *PLOS Pathogens*, 17(5), 1–6.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009515>

Chey, W. D., Wong, B. C. Y., & Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. (2007). American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 102(8), 1808–1825.

Cole, S. P., Harwood, J., Lee, R., She, R., & Guiney, D. G. (2004). Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 186(10), 3124–3132.

Corsaut, L., Martelet, L., Goyette-Desjardins, G., Beauchamp, G., Denicourt, M., Gottschalk, M., & Segura, M. (2021). Immunogenicity study of a *Streptococcus suis* autogenous vaccine in preparturient sows and evaluation of passive maternal immunity in piglets. *BMC Vet Res*, 17(1), 72.

Coticchia, J. M., Sugawa, C., Tran, V. R., Gurrola, J., Kowalski, E., & Carron, M. A. (2006). Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. *J Gastrointest Surg*, 10(6), 883–889.

Cremonini, F., Di Caro, S., Covino, M., Armuzzi, A., Gabrielli, M., Santarelli Luca

and Nista, E. C., Cammarota, G., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2002). Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol*, 97(11), 2744–2749.

Davis, R., & Bryson, H. M. (1994). Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. *Drugs*, 47(4), 677–700.

de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi Silvia and Vignat, J., Bray, F., & Forman David and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*, 13(6), 607–615.

Dimola, S., & Caruso, M. L. (1999). *Helicobacter pylori* in animals affecting the human habitat through the food chain. *Anticancer Res*, 19(5B), 3889–3894.

Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2019). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19(1), 149–183.

Dore, M. P., Lu, H., & Graham, D. Y. (2016). Role of bismuth in improving *Helicobacter pylori* eradication with triple therapy. *Gut*, 65(5), 870–878. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311019>

Ermak, T. H., Giannasca, P. J., Nichols, R., Myers, G. A., Nedrud, J., Weltzin, R., Lee, C. K., Kleanthous, H., & Monath, T. P. (1998). Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med*, 188(12), 2277–2288.

Fauzia, K. A., Miftahussurur, M., Syam, A. F., Waskito, L. A., Doohan, D., Rezkitha, Y. A. A., Matsumoto, T., Tuan, V. P., Akada, J., Yonezawa, H., & Kamiya Shigeru and Yamaoka, Y. (2020). Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Phenotype of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Toxins (Basel)*, 12(8).

Feng, L., Wen, M.-Y., Zhu, Y.-J., Men, R.-T., & Yang, L. (2016). Sequential Therapy or Standard Triple Therapy for *Helicobacter pylori* Infection: An Updated Systematic Review. *Am J Ther*, 23(3), e880–93.

Ferreccio, C., Rollán, A., Harris Paul R and Serrano, C., Gederlini, A., Margozzini, P., Gonzalez, C., Aguilera, X., Venegas, A., & Jara, A. (2007). Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(4), 662–667.

Fischbach, L., & Evans, E. L. (2007). Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 26(3), 343–357.

Gatta, L., Vakil, N., Vaira, D., & Scarpignato, C. (2013). Global eradication rates for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy. *BMJ*, 347. <https://doi.org/10.1136/bmj.f4587>

Graham, D. Y., Lu, H., & Yamaoka, Y. (2007). A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter*, 12(4), 275–278.

Greenberg, E. R., Anderson, G. L., Morgan Douglas R and Torres, J., Chey, W. D., Bravo Luis Eduardo and Dominguez, R. L., Ferreccio, C., Herrero, R., Lazcano-Ponce, E. C., Meza-Montenegro, M. M., Peña, R., Peña Edgar M and Salazar-Martinez, E., Correa, P., Martinez, M. E., Valdivieso, M., Goodman, G. E., Crowley, J. J., & Baker, L. H. (2011). 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: a randomised trial. *Lancet*, 378(9790), 507–514.

Hathroubi, S., Zerebinski, J., & Ottemann, K. M. (2018). *Helicobacter pylori* Biofilm Involves a Multigene Stress-Biased Response, Including a Structural Role for Flagella. *MBio*, 9(5).

Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh,

D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong Vincent W S and Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429.

Hrvat, F., Hasanić, O., Aleta, A., Spahić, A., Džuho, A., Hukić, M. (2021). Comparison of Biofilm Category Determination Using TCP Method Depending on Signal Molecule Adherence. In: Badnjevic, A., Gurbeta Pokvić, L. (eds) CMBEBIH 2021. CMBEBIH 2021. IFMBE Proceedings, vol 84. Springer, Cham.

Ierardi, E., Losurdo, G., Mileti, A., Paolillo, R., Giorgio, F., & Principi Mariabeatrice and Di Leo, A. (2020). The Puzzle of Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*: Beyond Basic Science. *Antibiotics* (Basel), 9(6).

Karczewska, E., Wojtas, I., Sito, E., Trojanowska, D., Budak, A., Zwolinska-Wcislo, M., & Wilk, A. (2009). Assessment of co-existence of *Helicobacter pylori* and *Candida* fungi in diseases of the upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 6, 33–39.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol*, 28(8), 668–681.

Khan, M. M. T., Pyle, B. H., & Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 76(15), 5088–5096.

Kromann, S., Olsen, R. H., Bojesen, A. M., Jensen, H. E., & Thøfner, I. (2021). Protective Potential of an Autogenous Vaccine in an Aerogenous Model of *Escherichia coli* Infection in Broiler Breeders. *Vaccines* (Basel), 9(11).

Krzyżek, P., Grande, R., Migdał, P., Paluch, E., & Gościński, G. (2020). Biofilm Formation as a Complex Result of Virulence and Adaptive Responses of *Helicobacter pylori*. *Pathogens*, 9(12).

Krzyżek, P., Migdał, P., Grande, R., & Gościński, G. (2022). Biofilm Formation of *Helicobacter pylori* in Both Static and Microfluidic Conditions Is Associated With Resistance to Clarithromycin. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 868905.

Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*, 65(9), 3672–3679.

Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Perea Vélez, M., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*, 73(21), 6768–6775.

Li, Y., Chen, Z., Ye, J., Ning, L., Luo, J., Zhang, L., Jiang, Y., Xi, Y., & Ning, Y. (2015). Antibody Production and Th1-biased Response Induced by an Epitope Vaccine Composed of Cholera Toxin B Unit and *Helicobacter pylori* Lpp20 Epitopes. *Helicobacter*, 21(3), 234–248.

Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9(1), 34–39.

Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.-A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.-E., Norberg, T., Lindh, F., ... Borén, T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297(5581), 573–578.

Malfertheiner, P., Megraud, F., Rokkas Theodore and Gisbert, J. P., Liou, J.-M., Schulz Christian and Gasbarrini, A., Hunt, R. H., Leja, M., O'Morain, C., Rugge, M., Suerbaum, S., Tilg, H., Sugano, K., El-Omar, E. M., European Helicobacter, & group, M. S. (2022). Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*.

Marshall, B. J., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach

of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), 1311–1315.

Møller, H., H. E., & V. H. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 61, 1–241.

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334(6058), 982–986.

Nolte, O., Morscher, J., Weiss, H. E., & Sonntag, H. (2001). Autovaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by *Actinomyces pyogenes*. *Vaccine*, 19(23–24), 3146–3153.

Poursina, F., Faghri, J., Moghim, S., Zarkesh-Esfahani, H., Nasr-Esfahani, B., Fazeli, H., Hasanzadeh, A., & Safaei, H. G. (2012). Assessment of *cagE* and *babA* mRNA expression during morphological conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid. *Curr Microbiol*, 66(4), 406–413.

Prosser, B. L., Taylor, D., Dix, B. A., & Cleeland, R. (1987). Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 31(10), 1502–1506.

Ramachandran, L., Baloch, L., Djirdeh Taha Mohamed and Sidhu, Y., Gentile, N., & Affinati, M. (2021). Immune thrombocytopenic purpura secondary to *Helicobacter pylori*. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 35(1), 60–61.

Ramaswamy, K., Correa, M., & Koshy, A. (2007). Non-healing gastric ulcer associated with *Candida* infection. *Indian J Med Microbiol*, 25(1), 57–58.

Riquelme, A., Soza, A., Pedreros, C., Bustamante, A., Valenzuela, F., Otarola Francisco and Abbott, E., Arellano, M., Medina, B., Pattillo, A., Greig, D., Arrese, M., & Rollan, A. (2007). Optimal length of triple therapy for *H. pylori* eradication in a population with high prevalence of infection in Chile. *World J Gastroenterol*,

13(21), 2967–2972.

Rose, M. A., Weigand, B., Schubert, R., Schulze, J., & Zielen, S. (2011). Safety, tolerability, and impact on allergic inflammation of autologous *E.coli* autovaccine in the treatment of house dust mite asthma—a prospective open clinical trial. *BMC Complement Altern Med*, 11, 45.

Roszczenko-Jasińska, P., Wojtyś, M. I., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2020). *Helicobacter pylori* treatment in the post-antibiotics era—searching for new drug targets. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(23), 9891–9905.

Sachs, G., Scott, D. R., & Wen, Y. (2011). Gastric infection by *Helicobacter pylori*. *Curr Gastroenterol Rep*, 13(6), 540–546.

Salehi, B., Sharopov, F., Martorell, M., Rajkovic, J., Ademiluyi, A. O., Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Martins, N., Iriti, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Phytochemicals in *Helicobacter pylori* Infections: What Are We Doing Now? *Int J Mol Sci*, 19(8).

Sánchez-Alonzo, K., Arellano-Arriagada, L., Bernasconi, H., Parra-Sepúlveda, C., Campos, V. L., Silva-Mieres, F., Sáez-Carrillo, K., Smith, C. T., & García-Cancino, A. (2022). An Anaerobic Environment Drives the Harboring of *Helicobacter pylori* within *Candida* Yeast Cells. *Biology (Basel)*, 11(5).

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 (Basel)*, 10(9).

Sánchez-Alonzo, K., Belmar, L., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Campos, V. L., Smith, C. T., Sáez, K., & García-Cancino, A. (2021). Antibiotics as a Stressing Factor Triggering the Harboring of *Helicobacter pylori* J99 within *Candida albicans* ATCC10231. *Pathogens*, 10(3).

Sánchez-Alonzo, K., Parra-Sepúlveda Cristian and Vega, S., Bernasconi, H., Campos, V. L., Smith, C. T., Sáez, K., & Garcia-Cancino, A. (2020). In Vitro Incorporation of *Helicobacter pylori* into *Candida albicans* Caused by Acidic pH Stress. *Pathogens*, 9(6).

Sánchez-Alonzo, K., Silva-Mieres, F., Arellano-Arriagada, L., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Smith, C. T., Campos, V. L., & Garcia-Cancino, A. (2021). Nutrient Deficiency Promotes the Entry of *Helicobacter pylori* Cells into *Candida* Yeast Cells. *Biology (Basel)*, 10(5).

Santiago, P., Moreno, Y., & Ferrús, M. A. (2015). Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter*, 20(4), 252–259.

Sen, K., Schable, N. A., & Lye, D. J. (2007). Development of an internal control for evaluation and standardization of a quantitative PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* in drinking water. *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7380–7387.

Shi, X., Zhang, J., Mo, L., Shi, J., Qin, M., & Huang, X. (2019). Efficacy and safety of probiotics in eradicating *Helicobacter pylori*: A network meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 98(15), e15180.

Sholeh, M., Khoshnood, S., Azimi, T., Mohamadi, J., Kaviar, V. H., Hashemian Marzieh and Karamollahi, S., Sadeghifard, N., Heidarizadeh, H., Heidary, M., & Saki, M. (2023). The prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolates: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*, 11, e15121.

Shukla, V. V, & Shah, R. C. (2018). Vaccinations in Primary Care. *Indian J Pediatr*, 85(12), 1118–1127.

Stark, R. M., Gerwig, G. J., Pitman, R. S., Potts, L. F., Williams, N. A., Greenman, J., Weinzweig, I. P., & Hirst T R and Millar, M. R. (1999). Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Lett Appl Microbiol*, 28(2), 121–126.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić Slobodanka and Cirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899.

Suerbaum, S., & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 347(15), 1175–1186.

Sugimoto, M., Furuta, T., & Yamaoka, Y. (2009). Influence of inflammatory cytokine polymorphisms on eradication rates of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol*, 24(11), 1725–1732.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209–249.

Sutton, P., & Boag, J. M. (2018). Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. *Vaccine*, 37(50), 7295–7299.

Sutton, P., & Chionh, Y. T. (2013). Why can't we make an effective vaccine against *Helicobacter pylori*? *Expert Rev Vaccines*, 12(4), 433–441.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersen, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh Nalini and Theuretzbacher, U., ... WHO Pathogens Priority List Working Group. (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18(3), 318–327.

Tsay, F.-W., & Hsu, P.-I. (2018). *H. pylori* infection and extra-gastrointestinal diseases. *J Biomed Sci*, 25(1), 65.

Tshibangu-Kabamba, E., & Yamaoka, Y. (2021). *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(9), 613–629.

Wang, F., Feng, J., Chen, P., Liu Xiaoping and Ma, M., Zhou, R., Chang, Y., Liu, J., Li, J., & Zhao, Q. (2017). Probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy: Systematic review and network meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 41(4), 466–475.

Wong, E. H. J., Ng, C. G., Chua, E. G., Tay, A. C. Y., Peters, F., Marshall, B. J., Ho, B., Goh, K. L., Vadivelu, J., & Loke, M. F. (2016a). Comparative Genomics Revealed Multiple *Helicobacter pylori* Genes Associated with Biofilm Formation In Vitro. *PLoS One*, 11(11), e0166835.

Wong, E. H. J., Ng, C. G., Chua, E. G., Tay, A. C. Y., Peters, F., Marshall, B. J., Ho, B., Goh, K. L., Vadivelu, J., & Loke, M. F. (2016b). Comparative Genomics Revealed Multiple *Helicobacter pylori* Genes Associated with Biofilm Formation In Vitro. *PLoS One*, 11(11), e0166835.

Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7(11), 629–641.

Yang, J., Dai, L.-X., Pan, X., Wang, H., Li, B., Zhu, J., Li, M.-Y., Shi, X.-L., & Wang, B.-N. (2015). Protection against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice by oral administration of multi-epitope vaccine of CTB-UreI-UreB. *Pathog Dis*, 73(5).

Yang, J.-C., & Lin, C.-J. (2010). CYP2C19 genotypes in the pharmacokinetics/pharmacodynamics of proton pump inhibitor-based therapy of *Helicobacter pylori* infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(1), 29–41.

Yang, J.-C., Lu, C.-W., & Lin, C.-J. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts. *World J Gastroenterol*, 20(18), 5283–5293.

Yang, J.-C., Wang, H.-L., Chern, H.-D., Shun, C.-T., Lin, B.-R., Lin, C.-J., & Wang, T.-H. (2011). Role of omeprazole dosage and cytochrome P450 2C19 genotype in patients receiving omeprazole-amoxicillin dual therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Pharmacotherapy*, 31(3), 227–238.

Yonezawa, H., Osaki, T., & Kamiya, S. (2015). Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int*, 2015, 914791.

Zagólski, O., Stręk, P., Kasprówska, A., & Białecka, A. (2015). Effectiveness of Polyvalent Bacterial Lysate and Autovaccines Against Upper Respiratory Tract Bacterial Colonization by Potential Pathogens: A Randomized Study. *Med Sci Monit*, 21, 2997–3002.

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. *Aliment Pharmacol Ther*, 47(7), 868–876.

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 Zhong-Ming and Liang, H.-Y., Wu, C., Li, D.-H., Luo, P., Zeng, H., Zhang, W.-J., Zhang, J.-Y., Guo Bo-Tao and Zhu, F.-C., & 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. *Lancet*, 386(10002), 1457–1464.