



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD
ANTIBIÓTICA Y SU RELACIÓN CON LA FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE *HELICOBACTER
PYLORI* AISLADAS DESDE PACIENTES DE LA REGIÓN
DE LA ARAUCANÍA.**

POR DANIEL SEBASTIÁN HENRÍQUEZ GONZÁLEZ

Trabajo de investigación de internado en sector salud presentado a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía: Apolinaria del Rosario García Cancino
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción
Universidad de Concepción

Profesional guía: BQ Benita Neira Vergara
Laboratorio Clínico
Hospital Penco-Lirquén

Marzo, 2024
Concepción, Chile

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

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	3
2. ÍNDICE DE TABLAS	5
3. INDICE DE ILUSTRACIONES.....	6
4. RESUMEN	7
5. INTRODUCCIÓN	8
Pregunta de investigación	13
Hipótesis.....	14
Objetivo general	15
Objetivos específicos.....	15
6. METODOLOGÍA.....	16
6.1 Obtención de muestras.....	16
6.2 Prueba de susceptibilidad.....	16
6.3 Cuantificación de biopelículas	17
6.4 Prueba de susceptibilidad en biopelículas.....	18
6.5 Análisis de datos.....	18
7. RESULTADOS	19
7.1 Cuantificación biopelículas en cepas de <i>H. pylori</i>	19

7.2 Resistencia a los antibióticos claritromicina, metronidazol, levofloxacin, amoxicilina y tetraciclina	20
7.3 Resistencia antibiótica de bacterias sésiles para claritromicina, metronidazol, levofloxacin, amoxicilina y tetraciclina	21
7.4 Formación de biopelículas entre aislados planctónicos susceptibles y resistentes	22
7.5 Resistencia antibiótica en cepas planctónicas y sésiles	24
7.6 Relación entre formación de biopelículas y resistencia antibiótica	24
8. DISCUSIÓN	26
9. CONCLUSIÓN.....	34
10. BIBLIOGRAFÍA	35

2. ÍNDICE DE TABLAS

7.2 Tabla 1. Perfil de resistencia a los distintos antibióticos en cepas de <i>H. pylori</i> en estado planctónico en cantidad y porcentaje.....	21
7.3 Tabla 2. Perfil de resistencia a los distintos antibióticos en cepas de <i>H. pylori</i> provenientes de biopelículas en cantidad y porcentaje.....	22
7.5 Tabla 3. Comparación de cepas resistentes planctónicas y sésiles para 22 cepas de <i>H. pylori</i>	24
7.6 Tabla 4. Análisis entre 2 variables cualitativas dicotómicas para 22 cepas de <i>H. pylori</i>	25

3. INDICE DE ILUSTRACIONES

4.1	Figura 1. Fases en la formación de biopelículas.....	11
7.1	Figura 2. Formación de biopelículas en 22 cepas de <i>H. pylori</i>	20
7.4	Figura 3. Formación de biopelículas en cepas de <i>H. pylori</i> resistentes y susceptibles.....	23

4. RESUMEN

Helicobacter pylori es una de las bacterias con mayor presencia en el mundo, más aún en países subdesarrollados como lo es Chile. Es responsable de numerosas patologías gastrointestinales y destaca por ser el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico. En los últimos años se ha visto un incremento en su resistencia a las terapias antibióticas, y a pesar de eso, en Chile son escasos los estudios enfocados en el comportamiento de estas bacterias frente a las terapias que se utilizan en el país. Estas bacterias se encapsulan en una matriz extracelular que las envuelve para formar una biopelícula que las protege de amenazas externas. Estas biopelículas pueden influir en el accionar de los antibióticos, haciendo que pierdan su efectividad, lo que podría explicar el aumento en la resistencia de estas bacterias y ofrecer una nueva perspectiva en la manera que se emplean las terapias con antibióticos. Es por esto, que este estudio se enfocó en determinar la resistencia de cepas clínicas aisladas de pacientes de la región de la Araucanía, además de complementar estos estudios con ensayos de formación de biopelículas y establecer una relación entre biopelículas y resistencia antibiótica. Los resultados indican un aumento en la resistencia frente a claritromicina y tetraciclina en bacterias sésiles (aquellas que forman parte de la biopelícula), además se evidenció una tendencia al aumento general en la resistencia a los antibióticos estudiados y un aumento en la producción de biopelículas en las cepas estudiadas.

5. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, microaerófila, muy común y que afecta a aproximadamente la mitad de la población mundial (Gravina, A. *et al*, 2018). En países en vías de desarrollo la prevalencia de *H. pylori* oscila entre un 70 a 90% y, en el caso de Chile, esta infección afecta a más del 70% de la población adulta (Arenas, A. *et al*, 2019).

Entre las patologías más importantes asociadas a la infección de *H. pylori* se encuentran la gastritis crónica, úlcera gástrica, carcinoma gástrico y linfoma MALT (Fischbach, W. *et al*, 2019). Del 1 al 10% de los infectados son propensos a presentar inflamación gástrica progresiva y para evitar su propagación, durante el consenso de Maastricht de 2017 se sugirió adoptar como medida principal el tratamiento inmediato de las infecciones de *H. pylori* diagnosticadas en cuanto fuese posible. Esto representa un cambio importante en el manejo de las infecciones, ya que el tratamiento ya no sería exclusivo para pacientes con manifestaciones clínicas (Malfertheiner, P. *et al*, 2017).

Históricamente la infección de *H. pylori* ha sido difícil de tratar, no existe alguna monoterapia que alcance una eficacia aceptable (nivel de eficacia >80%), solo unos pocos antibióticos (amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina, levofloxacina y rifabutina) son eficaces en la práctica, en general utilizados en terapias combinadas (Tshibangu-Kabamba, E. *et al*, 2021).

En Chile, de acuerdo con la información proporcionada por el ministerio de salud, el tratamiento de primera línea para infecciones por *H. pylori* corresponde a una terapia triple compuesta por un inhibidor de la bomba de protones (IBP), claritromicina y amoxicilina (MINSAL. 2013).

Sin embargo, en los últimos años se ha visto una reducción en la efectividad de estas terapias debido a un aumento en la resistencia a antibióticos en el tratamiento de la infección de *H. pylori*. En particular, la resistencia a claritromicina es la que ha tenido mayor impacto en la baja efectividad de las terapias combinadas (Megraud, F. *et al*, 2013). En Latino América, se ha reportado la resistencia para los antibióticos claritromicina (12%), metronidazol (53%), amoxicilina (4%), tetraciclina (6%) y fluoroquinolonas (15%). En Chile la resistencia asociada a claritromicina y metronidazol están bajo este promedio con un 9% y 31% respectivamente, en un estudio publicado el 2014 (Camargo, M.C. García, A. *et al*, 2014). Sin embargo, estudios más recientes muestran que ha habido un aumento en la resistencia antibiótica a claritromicina con un 31,3% en la zona céntrica (Arenas, A. *et al*, 2019), de un 29,2% en la región del Biobío (Parra, C. *et al*, 2019) y de un 40% en localidades de la zona sur del país (Oporto, M. *et al*, 2019).

De acuerdo con estudios recientes en los cuales se ha intentado incrementar el porcentaje de éxito de los tratamientos, sin mejoras significativas, dejan entrever que aún falta clarificar los mecanismos de resistencia antibiótica. Tener un mejor

entendimiento de estos mecanismos de resistencia antibiótica es clave para mejorar los tratamientos para *H. pylori* (Fauzia, K.A. *et al*, 2020).

Uno de los mecanismos de resistencia que ha adquirido importancia en el último tiempo es la capacidad que tiene *H. pylori* de formar biopelículas.

Las biopelículas son comunidades bacterianas que se adhieren a superficies biológicas o sintéticas, en las cuales se encapsulan en una matriz producida por la misma bacteria; en este estado las células bacterianas se denominan células sésiles. Esto la diferencia de las bacterias planctónicas en varios aspectos. Las células planctónicas están expuestas de manera uniforme a las condiciones ambientales. En cambio, las células contenidas en biopelículas experimentan un gradiente de nutrientes y deshechos, lo que da como resultado bacterias fisiológicamente heterogéneas (Hall, Clayton W, y Thien-Fah Mah, 2017). Estas biopelículas están compuestas por bacterias vivas y muertas, además de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que incluyen polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. La formación de biopelículas está dividida en cuatro fases (figura 1), la primera fase es el anclaje, ocurre gracias a interacciones hidrofóbicas o electroestáticas, junto a las interacciones de las proteínas de superficie bacterianas. En la segunda fase, las bacterias comienzan a formar microcolonias, rodeándose con SPE, en la tercera fase, la estructura madura y se hace resistente, las bacterias que se encuentran dentro de esta están protegidas. Luego de madurar, comienzan a aparecer bacterias muertas,

producto de la falta de nutrientes en la matriz de la biopelícula, y libera bacterias planctónicas que se dispersan a otras locaciones (Yonezawa, Hideo *et al*, 2015) (Hou, Chong *et al*, 2022).

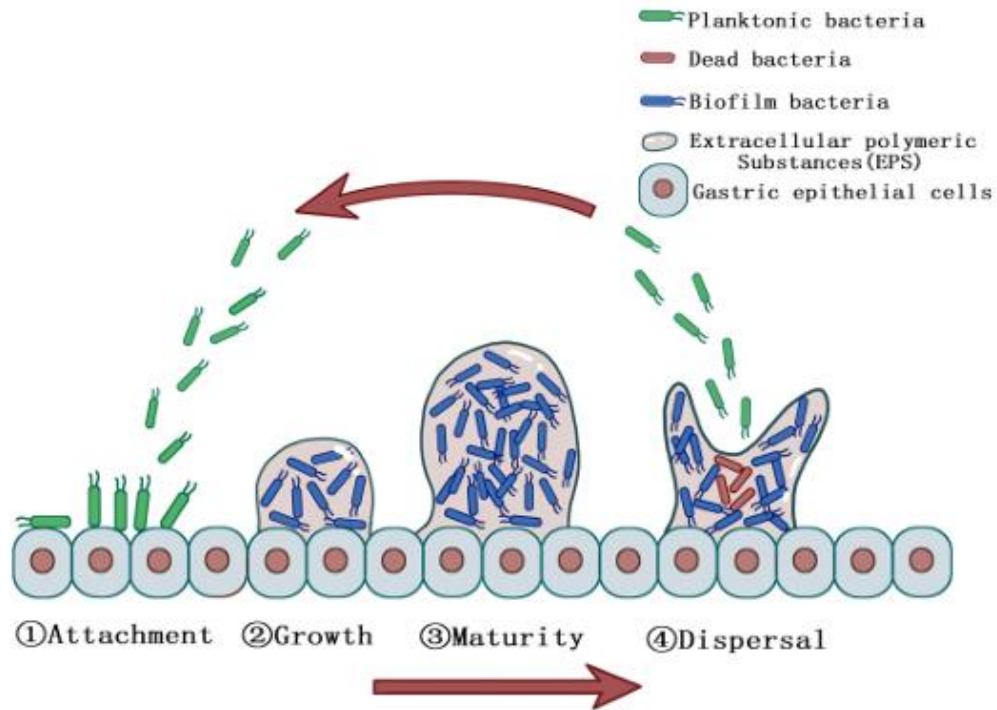


Figura 1 fases en la formación de biopelículas. Se observa el comportamiento cíclico en el proceso de formación de biopelículas (Hou, Chong *et al*, 2022).

La evidencia sugiere que el potencial de *H. pylori* para formar biopelículas tiene un impacto significativo en su patogenicidad y resiliencia (Hathroubi, S. *et al*, 2018). Es posible que la formación de estas biopelículas sea una de las principales barreras para erradicar las infecciones de *H. pylori*, además de

contribuir al aumento en la resistencia a antibióticos en los últimos años (Moghadam, Majid Taati *et al*, 2021).

Para evaluar el impacto que tiene la formación de biopelículas en el tratamiento de la infección de *H. pylori*, es necesario realizar una comparación entre la eficacia de los antibióticos no sólo en cultivos planctónicos, sino también de bacterias sésiles obtenidas de biopelículas.

Pregunta de investigación

Normalmente cuando se evalúa la resistencia antibiótica de un microorganismo, en este caso *H. pylori*, se realiza en cultivos controlados, con una bacteria en estado planctónico, que en general no se condice con la realidad de esta infección.

Hoy en día se sabe que un gran número de microorganismos, *H. pylori* entre ellos, forman biopelículas en el epitelio gastrointestinal, lo que les proporciona una ventaja considerable frente a las terapias recomendadas. Aun si estas terapias muestran una efectividad aceptable en cultivos planctónicos, es posible que, en la práctica, las cepas sean fuertes formadoras de biopelículas y logren sobrevivir dentro de estas matrices y volver a proliferar luego de un tiempo.

Por esto es necesario tener en consideración la capacidad de formar biopelículas al momento de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico y ajustar los tratamientos en base a este parámetro.

Es así, cómo surgió la siguiente pregunta de investigación: ¿Existirá una diferencia entre la CMI de una bacteria en estado planctónico y la CMI de una bacteria proveniente de una biopelícula (bacterias sésiles), y, conocer si existirá una relación entre la cantidad de biopelículas formadas y aumento de la resistencia antibiótica?

Hipótesis

La capacidad de formar biopelículas de cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas, incrementa la resistencia antibiótica a claritromicina, amoxicilina, levofloxacina, tetraciclina o metronidazol.

Objetivo general

Comparar la resistencia antibiótica de cepas de *H. pylori* en condiciones planctónicas y de biopelículas y relacionar estos datos con la cuantificación de la formación de biopelículas.

Objetivos específicos

1. Determinar la susceptibilidad de cepas de *H. pylori* a amoxicilina, levofloxacina, claritromicina, metronidazol y tetraciclina mediante el método de dilución en agar.
2. Determinar la susceptibilidad de cepas de *H. pylori* obtenidas de biopelículas frente a amoxicilina, levofloxacina, claritromicina, metronidazol y tetraciclina mediante el método de dilución en agar.
3. Cuantificar la formación de biopelículas para las cepas de *H. pylori*.
4. Confeccionar una base de datos a partir de los resultados obtenidos y comparar la resistencia antibiótica en ambos estados fisiológicos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de muestras

Las muestras fueron recolectadas de un proyecto titulado “Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* y su susceptibilidad antibiótica en pacientes de la comuna de Nueva Imperial Región de La Araucanía” llevado a cabo en los años 2021 y 2022. La autorización para la utilización de las biopsias gástricas para el desarrollo de esta tesis fue dada por los investigadores principales. Se seleccionaron 22 cepas de *H. pylori* a partir de muestras de biopsias gástricas de manera aleatoria, dentro de aquellas biopsias con resultado positivo para la presencia de *H. pylori*. Estas muestras se encontraban almacenadas en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción.

6.2 Prueba de susceptibilidad

Para determinar la susceptibilidad o resistencia a los diversos antibióticos se utilizó el método de dilución en agar y así determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los antibióticos claritromicina, metronidazol, tetraciclina, levofloxacina y amoxicilina. Se prepararon 5 placas para cada antibiótico, a las cuales se agregó 15 mL de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre

de equino y volúmenes decrecientes de antibiótico en cada placa. Los rangos de concentración utilizados para claritromicina, levofloxacina, tetraciclina y amoxicilina fueron de 4 a 0,25 µg/mL, y para metronidazol fue de 32 a 2 µg/mL. En estas placas son inoculados 2 µL de una solución McFarland 2 compuesta por suero fisiológico y capas con 48-72 horas de incubación. Una vez inoculadas las muestras, estas fueron llevadas a incubación a 37°C en condiciones de microaerobiosis por 48 horas para su análisis. Se determinó como CMI la concentración correspondiente a la placa en la cual ya no había crecimiento. Se definen como cepas resistentes aquellas con una CMI para tetraciclina y levofloxacina >1 µg/mL, >8 µg/mL para metronidazol, >0,5 para claritromicina y >0.25 para amoxicilina.

6.3 Cuantificación de biopelículas

Para medir la formación de biopelículas de las diversas cepas de *H. pylori* se empleó el método de cristal violeta (CV). A partir de cultivos de 48-72 horas, se prepararon soluciones McFarland 2 con caldo brucela suplementado con extracto de levadura al 1% y se sembraron en placas well de 24 pocillos volúmenes de 700 µL en cada pocillo. Posteriormente se llevaron a incubación por 48 horas a 37°C en condiciones de microaerobiosis. Para la cuantificación de las biopelículas se procedió a lavar cuidadosamente los pocillos con solución PBS y a teñir con solución de CV al 1%, luego de lavar el excedente de CV con PBS, se

solubiliza con 800 µL de solución etanol-acetona (80:20). La medición se realizó por densidad óptica a 590 nm.

El criterio utilizado para cuantificar la biopelícula formada es el siguiente: Las cepas con valores superiores al control negativo (DOc) fueron clasificadas como formadoras de biopelículas, las cepas ubicadas entre DOc y 2xDOc como formadoras débiles, entre 2xDOc y 4xDOc como formadoras medias y superiores a 4xDOc como formadoras fuertes.

6.4 Prueba de susceptibilidad en biopelículas

A partir de placas well de 24 pocillos previamente sembradas e incubadas por 48 horas, se removió el medio líquido y se lavó con PBS para retirar el excedente de bacterias sobrenadantes. Posteriormente se resuspendió el material de biopelículas en 700 µL de PBS, y esta solución es inoculada en placas de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de equino y volúmenes decrecientes de antibiótico en cada placa. Los resultados se obtienen de igual manera que en la prueba de susceptibilidad inicial.

6.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos en los ensayos de susceptibilidad antibiótica y cuantificación de biopelículas se analizaron utilizando el test de Mann Whitney U.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación biopelículas en cepas de *H. pylori*

En la figura 2 se recopila el análisis cuantitativo de las cepas de *H. pylori* en orden decreciente desde la más formadora de biopelículas (cepa 547) con una DO_{590 nm} de $2,816 \pm 0,305$, a la menos formadora (cepa 463) con una DO_{590 nm} de $0,196 \pm 0,004$. Según el criterio utilizado, las cepas con valores superiores al control negativo (DOc) fueron clasificadas como formadoras de biopelículas, donde se incluyen las 22 cepas.

Del total de cepas formadoras de biopelícula, para las formadoras débiles se tiene a las cepas 463, 517 y 537; entre las cepas formadoras medias se tiene a las cepas 538, 502 y 731 y como formadoras fuertes están las cepas 432, 465, 429, 738, 557, 556, 559, 467, 551, 478, 554, 378, 727, 369, 491 y 547.

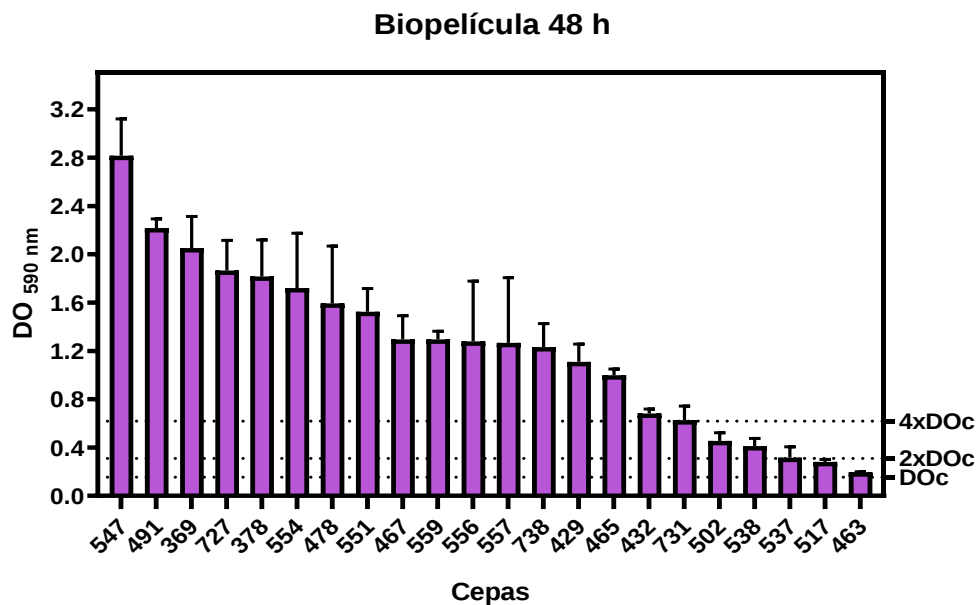


Figura 2 formación de biopelículas en 22 cepas de *H. pylori*. El eje X representa las diversas cepas bacterianas, y el eje Y representa la densidad óptica del ensayo de cristal violeta. DOc representa densidad óptica de control negativo (Elaboración propia).

7.2 Resistencia a los antibióticos claritromicina, metronidazol, levofloxacin, amoxicilina y tetraciclina

De las 22 muestras analizadas por el método de dilución en agar, la resistencia a claritromicina es de 45,5%, a metronidazol es de 54,5%, a levofloxacin es de 22,7%, a amoxicilina es de 77,3% y a tetraciclina es de 9,1%. Las combinaciones de antibióticos que presentaron mayor resistencia fueron CLR-MTZ-AMX-LEV con un 22,7% y CLR-MTZ-AMX con un 13,6%.

Tabla 1. Perfil de resistencia a los distintos antibióticos en cepas de *H. pylori* en estado planctónico en cantidad y porcentaje

Perfil de resistencia antibiótica		
Antibiótico	Total	Porcentaje
Resistencia simple		
CLR	10	45,5
MTZ	12	54,5
LEV	5	22,7
AMX	17	77,3
TET	2	9,1
Resistencia doble		
MTZ-AMX	1	4,5
Resistencia triple		
CLR-MTZ-AMX	3	13,6
Resistencia cuádruple		
CLR-MTZ-AMX-LEV	5	22,7
CLR-MTZ-AMX-TET	2	9,1

CLR: claritromicina; MTZ: metronidazol; AMX: amoxicilina; LEV: levofloxacina; TET: tetraciclina.

7.3 Resistencia antibiótica de bacterias sésiles para claritromicina, metronidazol, levofloxacina, amoxicilina y tetraciclina

De las 22 muestras analizadas por el método de dilución en agar, se observa que la resistencia para claritromicina es de 50,0%, a metronidazol es de 54,5%, a levofloxacina es de 22,7%, a amoxicilina es de 77,3% y a tetraciclina es de 36,4%. Las combinaciones de antibióticos que presentaron mayor resistencia fueron CLR-MTZ-AMX-LEV-TET y CLR-MTZ-AMX-TET con un 13,6%.

Tabla 2. Perfil de resistencia a los distintos antibióticos en cepas de *H. pylori* provenientes de biopelículas en cantidad y porcentaje

Perfil de resistencia antibiótica		
Antibiótico	Total	Porcentaje
Resistencia simple		
CLR	11	50,0
MTZ	12	54,5
LEV	5	22,7
AMX	17	77,3
TET	8	36,4
Resistencia doble		
MTZ-AMX	1	4,5
AMX-TET	1	4,5
Resistencia triple		
CLR-MTZ-AMX	2	9,1
CLR-MTZ-TET	1	4,5
Resistencia cuádruple		
CLR-MTZ-AMX-LEV	2	9,1
CLR-MTZ-AMX-TET	3	13,6
Resistencia quintuple		
CLR-MTZ-AMX-LEV-TET	3	13,6

CLR: claritromicina; MTZ: metronidazol; AMX: amoxicilina; LEV: levofloxacina; TET: tetraciclina.

7.4 Formación de biopelículas entre aislados planctónicos susceptibles y resistentes

Se compararon los niveles de formación de biopelículas entre cepas planctónicas resistentes y sensibles. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos para todos los antibióticos ensayados (Figura 3).

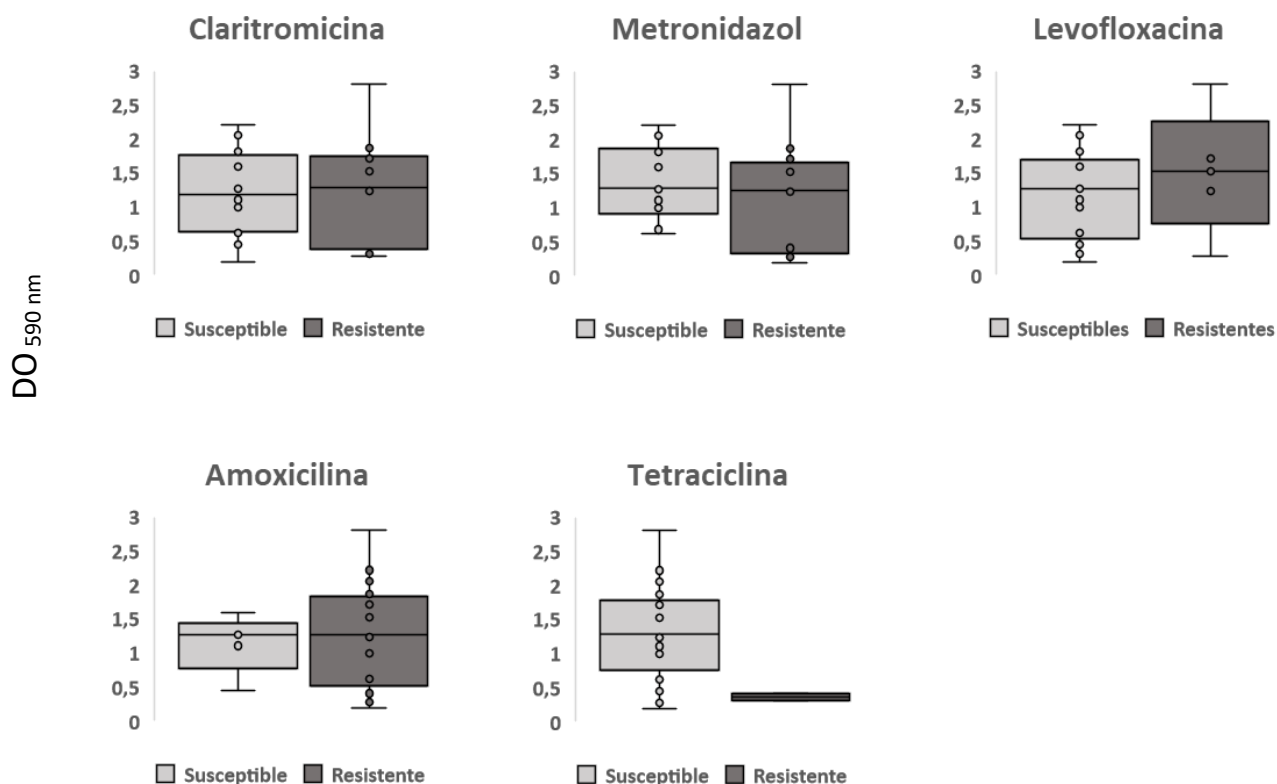


Figura 3. Formación de biopelículas en cepas resistentes y susceptibles. Todos los valores atípicos para levofloxacin y tetraciclina se encuentran en cepas susceptibles. No hubo diferencia significativa entre los grupos susceptibles y resistentes. Los valores p obtenidos del test de Mann-Whitney fueron: claritromicina ($p = 0,87$), metronidazol ($p = 0,38$), levofloxacin ($p = 0,54$), amoxicilina ($p = 0,82$) y tetraciclina ($p = 0,08$).

7.5 Resistencia antibiótica en cepas planctónicas y sésiles

Se comparó el porcentaje de cepas resistentes total entre las cepas planctónicas y las cepas obtenidas de biopelículas. Esta diferencia fue analizada por el test exacto de Fisher y los valores p obtenidos para los antibióticos amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol fueron de 1, y el valor p obtenido para Tetraciclina fue de 0,069. No hubo significancia estadística para estos resultados.

Tabla 3. Comparación de cepas resistentes planctónicas y sésiles para 22 cepas de *H. pylori*

	Proporción de Resistencia (%)				
	AMX	CLR	LEV	MTZ	TET
Planctónica	17/22 (77,3)	10/22 (45,5)	5/22 (22,7)	12/22 (54,5)	2/22 (9,1)
Biopelícula	17/22 (77,3)	11/22 (50,0)	5/22 (22,7)	12/22 (54,5)	8/22 (36,4)
p	1	1	1	1	0,069

p se obtuvo por el test exacto de Fisher entre las proporciones de resistencia en cepas planctónicas y sésiles.

7.6 Relación entre formación de biopelículas y resistencia antibiótica

Mediante un análisis entre 2 variables cualitativas dicotómicas se estableció una relación entre los datos obtenidos de la cuantificación de biopelículas por DO a 590nm con los resultados obtenidos de resistencia antibiótica de bacterias

sésiles. Las cepas se clasificaron en formadoras débiles-moderadas y formadoras fuertes de biopelículas, y en sensibles o resistentes para cada antibiótico. No se obtuvieron resultados con diferencias significativas.

Tabla 4. Análisis entre 2 variables cualitativas dicotómicas para 22 cepas de *H. pylori*

	Clasificación	Sensible	Resistente	Total	Valor p
Claritromicina	Débil-Moderado	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100,0)	0,338
	Fuerte	9 (56,25)	7 (43,75)	16 (100,0)	
	Total	11 (50,0)	11 (50,0)	22 (100,0)	
Metronidazol	Débil-Moderado	1 (16,7)	5 (83,3)	6 (100,0)	0,097
	Fuerte	9 (56,25)	7 (43,75)	16 (100,0)	
	Total	10 (45,45)	12 (54,55)	22 (100,0)	
Levofloxacin	Débil-Moderado	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100,0)	0,678
	Fuerte	12 (75,0)	4 (25,0)	16 (100,0)	
	Total	17 (77,3)	5 (22,7)	22 (100,0)	
Amoxicilina	Débil-Moderado	1 (16,7)	5 (83,3)	6 (100,0)	0,678
	Fuerte	4 (25,0)	12 (75,0)	16 (100,0)	
	Total	5 (22,7)	17 (77,3)	22 (100,0)	
Tetraciclina	Débil-Moderado	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100,0)	0,070
	Fuerte	12 (75,0)	4 (25,0)	16 (100,0)	
	Total	14 (63,6)	8 (36,4)	22 (100,0)	

8. DISCUSIÓN

Este estudio fue realizado con el objetivo de complementar y reforzar el trabajo de investigadores chilenos, que intentan aumentar el escaso número de estudios enfocados en la infección por *H. pylori*, en este caso, en la región de la Araucanía, lugar que registra una de las mayores tasas de mortalidad por cáncer gástrico en Chile (Csendes, A. *et al*, 2017).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, en primera instancia se observa que, de las 22 muestras analizadas por el método de dilución en agar, la resistencia para claritromicina fue del 45,5%, un valor bastante alto considerando que estudios similares en zonas centrales de Chile para este mismo antibiótico pero en décadas pasadas han reportado valores de 2,2% y 20% de resistencia antibiótica (González, C. *et al*, 2001, Vallejos, M. C. *et al*, 2007). Cabe señalar que se tiene conocimiento de que en los últimos años la resistencia de *H. pylori* frente a claritromicina en Chile ha ido en aumento. Así, se tiene que: La resistencia a claritromicina en la región metropolitana informada el 2019 fue de un 26%, este mismo año la resistencia a este antibiótico fue de un 29,2% en la región del Bío-Bío, y en la región de la Araucanía fue de un 40,9% (Arenas, A. *et al*, 2019, Parra-Sepulveda, C. *et al*, 2019, Oporto, M. *et al*, 2019). Esto es de vital importancia, ya que la claritromicina forma parte de la triple terapia, que incluye IB, claritromicina más amoxicilina o nitroimidazoles. Este es

el tratamiento más usado para la erradicación de las infecciones por *H. pylori* y se ha reportado que la efectividad de este desciende entre un 40% hasta un 85% al presentarse resistencia a claritromicina (Lee, J. *et al*, 2013, Khoder, G. *et al*, 2019). El alto porcentaje de resistencia obtenido en esta investigación invita a reevaluar la eficacia de las terapias de primera línea y plantearse un nuevo enfoque terapéutico, que tome en cuenta la variabilidad en los perfiles de resistencia incluso dentro de un mismo país. La evidencia es bastante clara en que, en primer lugar, los perfiles de resistencia pueden variar drásticamente incluso entre ciudades de un mismo país, y, en segundo lugar, el abuso de determinados antibióticos, la claritromicina en este caso contribuye al aumento de la resistencia hacia éste.

En el caso del metronidazol, la resistencia observada fue de 54,5%, un valor igualmente elevado en comparación a otros estudios realizados en Chile, con valores de un 44,9% y 41,8%, en muestras de la región del Bio-Bio (González, C. *et al*, 2001, Vallejos, M. C. *et al*, 2007). Estudios más recientes muestran también un incremento en la resistencia a metronidazol, con datos del 37,5 % en la región del Bio-Bio, y resistencias del 81,8% en la región de la Araucanía (Parra-Sepulveda, C. *et al*, 2019, Oporto, M. *et al*, 2019). Estos valores de resistencia hacen que sea poco aconsejable el uso de metronidazol como terapia efectiva en contra de infecciones por *H. pylori*.

En el caso de la levofloxacin, el porcentaje de resistencia obtenida fue de 22,7%, valor en este caso ligeramente mayor al informado por Parra-Sepúlveda *et al* en la región del Bio-Bio, el que fue de 20,8%, pero inferior al 43,1% informado por Oporto *et al.* en cepas provenientes de la ciudad de Temuco.

Para amoxicilina, la resistencia obtenida fue bastante alta, alcanzando un porcentaje de resistencia del 77,3%, mucho mayor a la reportada por Oporto *et al.* en 2019, donde la resistencia en cepas provenientes de la ciudad de Temuco solo llegaba al 11,3%. Estos datos indicarían un fuerte aumento en la resistencia a este fármaco, que sigue siendo parte de las terapias usadas hoy en día. De igual manera, los datos obtenidos en este trabajo contrastan enormemente con los datos internacionales, donde la resistencia a amoxicilina es casi nula (Camargo, M. *et al*, 2014). De lo anterior es posible afirmar que se necesitan más estudios acerca de la susceptibilidad de *H. pylori* en Chile, ya que, con estos datos, se puede atribuir que el uso de amoxicilina para pacientes de la Araucanía ya no sería viable como alternativa terapéutica.

Finalmente, para tetraciclina se obtuvo una resistencia del 9,1%, un porcentaje menor al reportado por Oporto *et al.* en Temuco el 2019, de 13,6%, lo que va acorde a los datos internacionales. En la región del Bio-Bio el año 2019 se informó de un 1,4% de resistencia a este antibiótico (Parra-Sepúlveda, C. *et al*, 2019). En Europa se han reportado resistencias del 2,5% en Alemania y del 0% en España (Bluemel, B. *et al*, 2020, Fernández-Reyes, M. *et al*, 2019). En el año

2019, en China fue reportada una resistencia a tetraciclina del 15% en la ciudad de Zhuanghe (Wang, D. *et al*, 2019).

De la cuantificación de biopelículas en las cepas estudiadas, se obtuvo resultados en promedio bastante elevados, las 22 cepas resultaron formadoras de biopelículas, 3 de ellas formadoras débiles, 3 formadoras medias y 16 formadoras fuertes. La mediana obtenida fue de 1,272, mucho mayor a la reportada por Kartika A. *et al*. en 2020, donde obtuvieron una mediana de 0,329 en cepas de Indonesia. Es posible que este fuerte aumento en la resistencia antibiótica esté relacionado con estos altos valores en la formación de biopelículas, aunque en este trabajo no se logró concluir, puede ser por el bajo número de muestras analizadas.

En relación con los resultados obtenidos a partir de los ensayos de susceptibilidad en bacterias sésiles, se puede observar que, a pesar de no evidenciar diferencias de significancia estadística entre los datos obtenidos en los ensayos de comparación de resistencia antibiótica entre cepas planctónicas y cepas sésiles, es posible percibir una leve tendencia al aumento en la resistencia antibiótica, especialmente en los ensayos con tetraciclina. Se observó un aumento del 5,5% para claritromicina y un aumento del 27,3% para tetraciclina; sin embargo, los ensayos realizados con amoxicilina, levofloxacina y metronidazol no mostraron diferencias apreciables. Si bien estos resultados son poco concluyentes con respecto a lo esperado, se deja entrever una relación

positiva entre la formación de biopelículas y el aumento en la resistencia antibiótica, al menos para claritromicina y tetraciclina. El aumento de resistencia antibiótica para la tetraciclina puede ser considerado preocupante, ya que es uno de los antibióticos al cual esta bacteria presenta menor resistencia a nivel global (Blumel, B. *et al*, 2020, Fernández-Reyes, M. *et al*, 2019, Wang, D. *et al*, 2019). En este caso para las bacterias sésiles la resistencia a tetraciclina fue del 36,4%, bastante más elevado a lo reportado por Oporto *et al* en Temuco el 2019, que fue de un 13,6%, para las cepas bacterianas de esta especie, pero en su estado planctónico. De lo anterior se puede inferir que el proceso de formación de biopelícula puede influir en la resistencia de cepas sésiles de distintas maneras, además de la protección física que ofrece la matriz extracelular. Los resultados presentados en este trabajo se condicen con estudios en los cuales se ha analizado la relación entre la formación de biopelículas con el aumento en la resistencia antibiótica en cepas de *H. pylori* (Yonezawa, H. *et al*, 2019, Attaran, B. *et al*, 2017, Yonezawa, H. *et al*, 2013), lo que podría sugerir que la presencia de biopelículas obstaculizaría la acción de los antibióticos sobre las células bacterianas.

Con respecto a la relación entre la capacidad formadora de biopelículas y la resistencia antibiótica, no se obtuvo resultados diferenciadores estadísticamente significativos. Esto podría derivarse de la aproximación experimental empleada en este estudio, ya que para obtener la CMI correspondiente a los antibióticos estudiados mediante dilución en agar, fue necesario obtener las colonias

bacterianas sésiles contenidas dentro de la biopelícula para ser sembradas en agar Müller-Hinton. Es probable que, al romper la matriz sólida de la biopelícula durante la resuspensión de las colonias contenidas en las biopelículas, las bacterias perdieran la función de barrera que caracteriza a las biopelículas. Se ha observado en estudios que esta matriz formada por polisacáridos, proteínas, ADN y lípidos actúa como una barrera protectora ante agentes externos (Olsen, I. *et al*, 2015, Anderl, J.N. *et al*, 2000). Por lo tanto, para obtener resultados más cercanos a la realidad, es necesario tomar una aproximación diferente en la determinación de la resistencia antibiótica en cepas sésiles. En comparación, el método de dilución en agar tiene la ventaja de ser relativamente sencillo y fiable, además de ser el Gold standard en la determinación de susceptibilidad bacteriana, pero para el estudio de la resistencia antibiótica de bacterias sésiles, es necesario evaluar la acción antibiótica sin destruir la matriz extracelular de la biopelícula. Hay estudios que evalúan este aspecto mediante el crecimiento de bacterias en placas well, aplicando concentraciones crecientes de antibiótico en los pocillos posterior a varios días de crecimiento, cuando la biopelícula ya está formada. De esta manera es posible evaluar el efecto bactericida de los antibióticos en las bacterias sésiles y estudiar la capacidad de las biopelículas de aumentar la resistencia antibiótica (Yonezawa, H. *et al*, 2013, Attaran, B. *et al*, 2017).

Sin embargo, a pesar de que nuestra aproximación experimental pudo destruir la matriz extracelular, fue posible observar un aumento en la resistencia de tetraciclina y, en menor medida, en claritromicina. Esto podría tener relación con la expresión de los genes de las bombas de eflujo, cuya presencia pareciese tener relación con el aumento en la resistencia antibiótica en bacterias formadoras de biopelículas (Yonezawa, H. *et al*, 2013). En relación con esto, es una posibilidad que el aumento en la resistencia a los antibióticos claritromicina y, en mayor medida, tetraciclina tenga alguna relación con las mutaciones e intercambio genético presentes dentro de las biopelículas. Estos mecanismos de resistencia han sido descritos en estudios enfocados al aumento de resistencia antibiótica en biopelículas, donde uno de los principales focos de estudio son mutaciones puntuales en el rRNA 23S, las cuales modifican la región objetivo de antibióticos como la claritromicina dificultando su anclaje (Hirata, K. *et al*, 2010).

Por último, en relación con los resultados obtenidos de la capacidad formadora de biopelículas, no se encontró una relación entre la concentración de biopelículas y la resistencia global de las cepas sésiles. Para obtener datos más precisos en este aspecto, quizás una mejor alternativa sería utilizar otros métodos para la determinación de la CMI, ya que, en este caso, se utilizó dilución en agar por ser el Gold standard para determinar susceptibilidad en *H. pylori* (CLSI, 2015). Este método es efectivo al momento de determinar susceptibilidad y resistencia en cepas planctónicas, pero en estudios enfocados a la producción de

biopelículas y su efecto sobre la resistencia antibiótica, resulta poco confiable (Sandoe, J. *et al*, 2006, Brady, A. *et al*, 2017).

9. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en este trabajo establecen que la resistencia antibiótica en *H. pylori* ha aumentado significativamente en relación con lo reportado en años anteriores. Para antibióticos como la claritromicina y amoxicilina, esto es de especial relevancia, puesto que forman parte de los tratamientos de primera línea, por lo que sería aconsejable optar por terapias alternativas. Además, se pudo observar como la variabilidad en los perfiles de resistencia es alta incluso entre ciudades relativamente cercanas.

Las cepas estudiadas demostraron una alta capacidad de formación de biopelículas, donde la mayoría fue catalogada como fuerte formadora de biopelícula. Esto junto con el aumento en la resistencia antibiótica hacia tetraciclina y claritromicina sugiere que hay relación entre la capacidad de formar biopelículas y el aumento en la resistencia antibiótica.

Por último, no fue posible establecer una relación entre el aumento de resistencia antibiótica y el aumento en la capacidad formadora de biopelículas. Es necesario ajustar la metodología implementando técnicas más específicas como el Etest para la determinación de CMI y para bacterias sésiles, la concentración de erradicación de biopelícula mínima (CEBM).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Gravina, Antonietta Gerarda et al. "*Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review." World journal of gastroenterology 24, 29 (2018): 3204-3221.
doi:10.3748/wjg.v24.i29.3204
- Arenas, A., Serrano, C., Quiñones, L., Harris, P., Sandoval, M., Lavanderos, M., ... Riquelme, A. (2019). 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).
- Fischbach, Wolfgang, and Peter Malfertheiner. "*Helicobacter pylori* Infection." Deutsches Arzteblatt international 115,25 (2018): 429-436.
doi:10.3238/arztebl.2018.0429
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 10th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. p. M07.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... & Hunt, R. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. Gut 66(1), 6-30.
- Tshibangu-Kabamba, Evariste, and Yoshio Yamaoka. "*Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications." Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology 18,9 (2021): 613-629.

doi:10.1038/s41575-021-00449-x

Ministerio de Salud. (2013). Tratamiento de erradicación de *Helicobacter pylori* en el paciente con úlcera péptica. Santiago.

Megraud, F. et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut 62, 34–42 (2013).

Camargo, M Constanza et al. “The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America.” The American Journal of Gastroenterology 109,4 (2014): 485-95. doi:10.1038/ajg.2014.24.

Oporto, M. et al. Prevalence of Infection and Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*: An Evaluation in Public and Private Health Systems of Southern Chile. Pathogens 8 (4) (2019).

Parra-Sepúlveda, Cristian et al. “Antibiotic resistance surveillance of *Helicobacter pylori* at the Biobío region (Chile) in a decade.” Archivos de Gastroenterología. 56, 4 (2019): 361-366. doi:10.1590/S0004-2803.201900000-72

Fauzia, Kartika Afrida et al. “Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Phenotype of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates.” Toxins 12,8 473, 2020, doi:10.3390/toxins12080473.

Hall, Clayton W, and Thien-Fah Mah. “Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria.” FEMS

microbiology reviews 41,3 (2017): 276-301. doi:10.1093/femsre/fux010.

Yonezawa, Hideo et al. "Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance." *BioMed research international* vol. 2015 (2015): 914791. doi:10.1155/2015/914791.

Hou, Chong et al. "*Helicobacter pylori* Biofilm-Related Drug Resistance and New Developments in Its Anti-Biofilm Agents." *Infection and drug resistance* vol. 15 1561-1571, 2022, doi:10.2147/IDR.S357473.

Hathroubi, Skander et al. "*Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 82,2 e00001-18. 9 May. 2018, doi:10.1128/MMBR.00001-18.

Moghadam, Majid Taati et al. "*Helicobacter pylori* Biofilm and New Strategies to Combat it." *Current molecular medicine* 21,7 (2021): 549-561. doi:10.2174/1566524020666201203165649.

Hideo Yonezawa, Takako Osaki, Fuhito Hojo, Shigeru Kamiya, "Effect of *Helicobacter pylori* biofilm formation on susceptibility to amoxicillin, metronidazole and clarithromycin", *Microbial Pathogenesis* 132, 2019, 100-108, ISSN 0882-4010.

Attaran B, Falsafi T, Ghorbanmehr N. Effect of biofilm formation by clinical isolates of *Helicobacter pylori* on the efflux-mediated resistance to commonly used antibiotics. *World J Gastroenterol* 2017; 23(7): 1163-1170 [PMID: 28275296]

DOI: 10.3748/wjg.v23.i7.1163].

Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Ochiai K, Kamiya S. Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations. PLoS One. 2013, 8(9):e73301. doi: 10.1371/journal.pone.0073301. PMID: 24039906; PMCID: PMC3765302.

Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34(5), 877–886. doi:10.1007/s10096-015-2323-z.

Anderl, J.N.; Franklin, M.J.; Stewart, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother 44, 1818–1824, 2000.

Hirata, K., Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Muraoka, H., Saito, Y., ... Hibi, T. (2010). Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 25, S75–S79. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.06220.x.

Gonzalez C, Garcia A, Daroch F. In vitro antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains: Isolation of strains resistant to clarithromycin. Rev Med Chile 2001. 2001;12–3.

Vallejos M C, Garrido O L, Cáceres L D, Madrid AM, Defilippi C, Defilippi C C, et al. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina

- en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la región metropolitana. Rev Med Chil. 2007;135(3):287–93.
- Lee JW, Kim N, Kim JM, Nam RH, Chang H, Kim JY, et al. Prevalence of primary and secondary antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. Helicobacter. 2013 Jun 1;18(3):206–14.
- Khoder G, Sualeh Muhammad J, Mahmoud I, Soliman SSM, Burucoa C. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its associated factors among healthy asymptomatic residents in the united arab emirates. Pathogens. 2019;8(2).
- Gonzalez-Hormazabal P, Musleh M, Escandar S, Valladares H, Lanzarini E, Castro VG, Jara L, Berger Z. Prevalence of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* in Santiago, Chile, estimated by real-time PCR directly from gastric mucosa. BMC Gastroenterol. 2018 Jun 20;18(1):91. doi: 10.1186/s12876-018-0820-0. PMID: 29925321; PMCID: PMC6011593.
- Csendes A, Figueroa M. Situación del cáncer gástrico en el mundo y en Chile. Rev Chil Cir. 2017;69(6):502–7.
- Bluemel B, Goelz H, Goldmann B, Grüger J, Hamel H, Loley K, et al. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Germany, 2015 to 2018. Clin Microbiol Infect. 2020;26(2):235–9.
- Fernández-Reyes M, Tamayo E, Rojas-Rengifo D, Fischer W, Carrasco-García E, Alonso M, et al. *Helicobacter pylori* pathogenicity and primary antimicrobial

- resistance in Northern Spain. *Eur J Clin Invest.* 2019;49(8):0–2.
- Wang, D.; Guo, Q.; Yuan, Y.; Gong, Y. The antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to five antibiotics and influencing factors in an area of China with a high risk of gastric cancer. *BMC Microbiol.* 2019, 19, 152.
- Sandoe, J.A.; Wysome, J.; West, A.P.; Heritage, J.; Wilcox, M.H. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57, 767–770.
- Brady, A.J.; Lavery, G.; Gilpin, D.F.; Kearney, P.; Tunney, M. Antibiotic susceptibility of planktonic-and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: Should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *J. Med. Microbiol.* 2017, 66, 461–469.
- Fauzia KA, Miftahussurur M, Syam AF, Waskito LA, Doohan D, Rezkitha YAA, Matsumoto T, Tuan VP, Akada J, Yonezawa H, Kamiya S, Yamaoka Y. Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Phenotype of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Toxins* (Basel). 2020 Jul 24;12(8):473. doi: 10.3390/toxins12080473. PMID: 32722296; PMCID: PMC7472329.